

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko

Renata Godlewska

Nazwisko panięskie: Giletycz

2 Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

• **2002.** Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Funkcjonalna charakterystyka dwóch sierocych genów (HP1285 i HP596) *Helicobacter pylori* kodujących immunodominujące białka”

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Recenzenci: prof. dr hab. Ewa Bartnik (Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski) oraz prof. dr hab. Janusz Siedlecki (Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie).

• **1995.** Tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tytuł pracy magisterskiej: „Analiza aktywności plazmidu pTAV-1 *Thiobacillus versutus* w wybranych gatunkach bakterii gramujemnych”.

Opiekun pracy: prof. dr hab. Mirosława Włodarczyk.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

• Od 01.04.2019 adiunkt w Zakładzie Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

• 01.10.2016-31.03.2019 asystent w Zakładzie Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

• 01.10.2002-30.09.2016 adiunkt w Zakładzie Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

w tym:

02.2004- 09.2004: (7 miesięcy) urlop macierzyński + urlop wychowawczy

03.2006- 12.2006: (8 miesięcy) urlop macierzyński + urlop wychowawczy

08.2008- 09.2008: (8 tygodni) urlop macierzyński

03.2009-09.2009: (6 miesięcy) zwolnienie lekarskie z powodu ciąży wysokiego ryzyka

09.2009- 09.2010: (12 miesięcy) urlop macierzyński + urlop wychowawczy

- 01.10.1997-31.03.2002: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.08.1995-30.09.1997: starszy referent inżynieryjno-techniczny w Zakładzie Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii 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

Ocena przydatności wybranych białek odnajdywanych w pęcherzykach błonowych (OMV) *Campylobacter jejuni* i *Helicobacter pylori* w zwalczaniu infekcji powodowanych przez te mikroorganizmy

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

i. Raczko A.M., Bujnicki J., Pawlowski M. •, **Godlewska R.**, Lewandowska K. •, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2005. Characterization of new DsbB-like thioloxydoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria, *Microbiology* 51, 219-231

IF₂₀₀₅ – 3,173 **IF_{5-letni} – brak**, punktacja MNiSW – **30**; liczba cytowań (wg bazy WoS) – **39**

Wkład habilitantki – **25%**. Współautorstwo koncepcji badań dotyczących *H. pylori*; wykonanie doświadczeń dotyczących genu *dsbI* *H. pylori*, polegających na przygotowaniu konstruktów, uzyskaniu mutantów w genie *dsbI* *H. pylori* J99, charakterystyce tego mutantu; udział w opracowaniu wyników i redagowaniu manuskryptu w części dotyczącej *H. pylori*.

ii. **Godlewska R.**, Dzwonek A., Mikula M., Ostrowski J., Pawlowski M. •, Bujnicki J.M., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2006. *Helicobacter pylori* protein oxidation influences the colonization process, *International Journal of Medical Microbiology* 296, 321-324

IF₂₀₀₆ – 2,76 **IF_{5-letni} – 3,989**, punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy WoS) – **20**

Wkład habilitantki – **70%**. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie oraz przeprowadzenie większości doświadczeń (uzyskanie mutantów w genie *dsbI* w szczepie *H. pylori* SS1; wykonanie doświadczeń na zwierzętach, izolacja DNA ze śluzówki żołądka myszy do analizy RT-PCR); opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu wraz z rycinami; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

iii. **Godlewska R.**, Wisniewska K*, Pietras Z*, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2009. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure,

role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis, FEMS Microbiology Letters 298, 1

IF₂₀₀₉ – 2,199 **IF_{5-letni} – 2,354**, punktacja MNiSW – **25**; liczba cytowań (wg bazy WoS) – **91**

Wkład habilitantki – **65%**. Autorstwo koncepcji; opieka nad studentami (Katarzyna Wiśniewska i Zbigniew Pietras) podczas wykonywania przez nich badań, które weszły w skład manuskryptu; finansowanie tych badań (Grant KBN nr 2P04C 015 27); współautorstwo wszystkich części manuskryptu (Structure of Pal and the Tol--Pal complex, Role of Pal in the process of pathogenesis, Application of Pal in immunoprophylaxis, Application of OMVs in medicine) współprzygotowanie manuskryptu.

iv. Godlewska R., Kuczkowski M., Wszyńska A., Klim J*, Derlatka K.*, Woźniak-Biel A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2016. Evaluation of a protective effect of in ovo delivered *Campylobacter jejuni* OMVs, Applied Microbiology and Biotechnology 100, 8855-8864

IF₂₀₁₆ – 3,42 **IF_{5-letni} – 3,716**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy WoS) – **1**

Wkład habilitantki – **65%**. **Autor korespondencyjny**. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie oraz przeprowadzenie większości doświadczeń (oprócz doświadczenia na zwierzętach); opieka nad studentką (Joanna Klim) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; finansowanie badań (grant FNP POMOST/2012-6/4); opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu wraz z rycinami; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

v. Godlewska R., Klim J*, Dębski J., Wszyńska A., Łasica A. 2019. Influence of environmental and genetic factors on proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*, Polish Journal of Microbiology 68(2)

IF₂₀₁₉ – 0,746; **IF_{5-letni} – 0,938**; punktacja MNiSW – **15**; liczba cytowań (wg bazy WoS) – **0**

Wkład habilitantki – **70%**. **Autor korespondencyjny**. Autorstwo koncepcji badań, zaplanowanie oraz przeprowadzenie większości doświadczeń (oprócz spektrometrii mas); opieka nad studentką (Joanna Klim) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; finansowanie badań (grant FNP POMOST/2012-6/4); opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu wraz z rycinami; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

* Studenci wykonujący pod moim kierunkiem prace dyplomowe w Zakładzie Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

• Studenci wykonujący prace dyplomowe w Zakładzie Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – 12,298

Sumaryczna liczba punktów MNiSW – 140

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, do dnia złożenia wniosku (wg WoS) – 151

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

WPROWADZENIE

Odkrycie antybiotyków i opracowanie wielu skutecznych szczepionek przeciwbakteryjnych spowodowało ogromny postęp w walce z chorobami zakaźnymi i bakteriami patogennymi je wywołującymi. Jednak narastająca oporność bakterii na antybiotyki oraz pojawianie się szczepów wieloopornych zmuszają do poszukiwania nowych strategii zwalczania zakażeń bakteryjnych. Podejmowane są próby wykorzystania do tego celu bakteriofagów, związków pochodzenia bakteryjnego (bakteriocyn), roślinnego i zwierzęcego (przeciwbakteryjne peptydy, AMP) oraz różnorodnych nanocząstek (np. srebra, złota). Jedną ze strategii jest także poszukiwanie nowych leków przeciwbakteryjnych, np. blokujących procesy odpowiadające za zjadliwość bakterii. W przeciwieństwie do antybiotyków, leki antywirulentne hamują procesy wirulencji, a nie wzrost bakterii, co zmniejsza ryzyko selekcji szczepów opornych. Ponadto leki te pozostają obojętne dla większości bakterii wchodzących w skład mikrobioty przewodu pokarmowego, a więc nie zaburzą jej równowagi. Pierwszymi tego typu preparatami były przeciwciała inaktywujące toksyny (antytoksyny), np. jadu kiełbasianego (*Clostridium botulinum*), tężca (*Clostridium tetani*) czy błonicy (*Corynebacterium diphtheriae*) (Keller i Stiehm, 2000). Obecnie badania skupiają się na poszukiwaniu leków blokujących procesy adhezji, sekrecji czynników wirulencji, a także inhibitorów procesów globalnych, np. zjawiska wyczuwania zagęszczenia (*quorum sensing*, QS), regulacji ekspresji genów przez układy dwuskładnikowe czy potranslacyjnych modyfikacji białek.

Oprócz antybiotyków, szczepionki pozostają od wielu lat uzupełniającym sposobem zapobiegania i zwalczania bakteryjnych chorób zakaźnych. Wciąż jednak nie mamy opracowanych szczepionek przeciwko wielu patogenom: m.in. *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* czy *Mycobacterium leprae*. Pomimo narastającego w społeczeństwach krajów wysokorozwiniętych oporu przeciwko stosowaniu szczepionek, pozostają one najskuteczniejszym sposobem zapobiegania chorobom infekcyjnym, dlatego prace nad ich opracowaniem trwają.

Moje główne zainteresowania badawcze skupione były wokół dwóch spokrewnionych ze sobą, patogennych bakterii: *Helicobacter pylori* i *Campylobacter jejuni*, należących do klasy ϵ -*Proteobacteria*.

Helicobacter pylori

H. pylori jest gramujemną, mikroaerofilną pałeczką kolonizującą nabłonek żołądka człowieka. Bakteria ta, pierwotnie nazwana *Campylobacter pylori*, należy do rzędu *Campylobacterales*, rodziny *Helicobacteraceae*. Gatunek *H. pylori* został odkryty i opisany przez dwóch australijskich lekarzy R. Warrena i B. Marshalla w 1983 roku (Marshall i Warren, 1984), za co obaj zostali uhonorowani nagrodą Nobla w 2005 roku.

H. pylori jest najpowszechniejszą przyczyną przewlekłych zakażeń u ludzi. Wywołuje przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka i jest głównym czynnikiem etiologicznym raka żołądka i choroby wrzodowej. W większości regionów świata głównym mechanizmem rozprzestrzeniania się tej bakterii jest transmisja wewnątrzrodzinna. Ostatnie badania, z 2017 roku, wskazują, że w skali globu liczba zainfekowanych osób sięga 4,4 miliarda, co stanowi prawie 60% ludzkiej populacji. Obserwuje się duże zróżnicowanie w poziomie infekcji, w zależności od zamieszkiwanego regionu geograficznego, a także przynależności etnicznej (Hooi i wsp., 2017). W niektórych krajach wskaźnik zakażeń sięga 70-90 % (np. Nigeria - 87,7%, Portugalia 86,4%, Estonia 82,5%). Krajami o niskim rozprzestrzenieniu infekcji są m.in. Szwajcaria – 18,9%, Dania – 22,1% i Szwecja – 26,2% (Hooi i wsp., 2017). W Polsce od dawna nie przeprowadzono dokładnych badań na ten temat, a ostatnie wskazywały na 58% wskaźnik zakażenia (Łaszewicz, 2004).

Zakażenie *H. pylori* powoduje uszkodzenie błony śluzowej żołądka, prowadząc do wystąpienia zanikowego zapalenia żołądka, które postępuje do metaplazji jelitowej, dysplazji, wczesnego raka żołądka i zaawansowanego raka żołądka. Do rozwoju choroby nowotworowej dochodzi u około 5% zakażonych osób, w 50 lub więcej lat od momentu zakażenia (Venerito i wsp., 2017). Już w 1994 roku Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) uznała *H. pylori* za karcynogen I grupy. Obecne badania wskazują, że infekcja jest konieczną, lecz niewystarczającą przyczyną gruczolaka żołądka (adenocarcinoma), której można przypisać około 90% wszystkich nowotworów żołądka (Suzuki i wsp. 2009; Polk i wsp. 2010, Noto i wsp. 2012). Rak żołądka jest czwartym najczęściej występującym typem raka i czwartą, a według innych źródeł trzecią, najczęstszą przyczyną zgonów związanych z rakiem na całym świecie (Ferlay i wsp. 2015, WHO). Zwalczanie raka żołądka jest więc ściśle powiązane ze zwalczaniem infekcji *H. pylori* (Hooi i wsp. 2017).

Mechanizmy patogenezy *H. pylori* nie zostały w pełni poznane. Występowanie konkretnej jednostki chorobowej jest jednak bez wątpienia zależne zarówno od genotypu patogenu, jak i od genotypu gospodarza oraz czynników środowiskowych. *H. pylori* koduje czynniki wirulencji wpływające na funkcjonowanie komórek gospodarza. Czynniki te mogą być związane z błonami komórki bakteryjnej, wydzielane do otoczenia, lub translokowane bezpośrednio do cytoplazmy komórki gospodarza za pośrednictwem IV systemu sekrecji.

Białka błonowe to głównie różne adhezyny: BabA (*blood-group antigen-binding*) – białko wiążące się z antygenami Lewis B na powierzchni komórek nabłonkowych, SabA (*sialylated blood group - related adhesin*), lipoproteina AlpA/B oraz białko błony zewnętrznej OipA, dzięki którym możliwy jest bliski kontakt pomiędzy komórkami bakteryjnymi a komórkami nabłonka żołądka (Ilver i wsp., 1998, Mahdavi i wsp., 2002, Styer i wsp., 2010). Także rzęska (aparatus współpracujących ze sobą kilkudziesięciu różnych białek) i lipopolisacharyd (LPS) odgrywają rolę w patogenezie poprzez aktywację NF- κ B i aktywację produkcji chemokin (Smith i wsp., 2003). Ponadto zdolność ruchu odgrywa ważną rolę w kolonizacji śluzówki żołądka (Gu, 2017).

Czynniki wydzielane do środowiska to głównie rozpuszczalne białka: ureaza i cytotoksyna wakuolizująca (VacA), które pozwalają bakteriom na przeżycie w żołądku oraz wpływają na adhezję międzykomórkową, rozluźniając ściśle połączenia między komórkami nabłonka (Lytton i wsp., 2005, Cover i Blanke, 2005).

Białka translokowane przez IV system sekrecji to m.in. CagA (*Cytotoxin - associated gene A*), uważane za główny czynnik wirulencji. Jest ono przekazywane do komórki

nabłonkowej żołądka, gdzie jest fosforylowane przez obecną tam eukariotyczną tyrozynową kinazę białkową Src, a następnie, po wbudowaniu w błonę komórki, wiąże się z innymi białkami gospodarza m.in. z tyrozynową fosfatazą SHP-2 (*Src homology 2 (SH2) domain containing protein-tyrosine phosphatase*). Proces ten prowadzi do aktywacji wielu szlaków przekazywania sygnału, które powodują zmiany w budowie, polarności i namnażaniu się komórek eukariotycznych. Oddziaływanie komórek *H. pylori* z organizmem gospodarza prowadzi do adhezji, indukcji odpowiedzi prozapalnej (poprzez aktywację produkcji i uwalnianie cytokin), apoptozy lub proliferacji komórek, co skutkuje trwałą kolonizacją, ostrym stanem zapalnym oraz zniszczeniem funkcji bariery nabłonkowej (Suzuki i wsp., 1997, Bruewer i wsp., 2003).

W terapii zakażenia *H. pylori* stosuje się różne schematy. Na początku lat dziewięćdziesiątych najpowszechniej stosowano terapię trójlekową (kombinację inhibitora pompy protonowej [PPI], klarytromycyny i amoksycyliny), której skuteczność przekraczała wówczas 80% (Misiewicz i wsp., 1997; Fennerty i wsp., 1998; Laine i wsp., 1998). Obecnie skuteczność tej terapii znacznie spadła i jest niezadowolająca (Graham i Fischbach, 2010).

Alternatywny schemat leczenia, stosowany na obszarach częstego występowania szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę (tzn. >20%), polega na stosowaniu czterech leków: inhibitora pompy protonowej, tetracykliny, metronidazolu i soli bizmutu. Pomimo stosowania różnych kombinacji leków około 10 % pacjentów w ogóle nie poddaje się leczeniu. Największym problemem jest narastająca lekooporność szczepów *H. pylori* (zwłaszcza na klarytromycynę i metronidazol), ale także ponowne zakażenie się pacjentów, niewłaściwe schematy leczenia, nieprzestrzeganie zaleceń przez pacjentów oraz zmienność szczepów bakteryjnych (Song i Ang, 2014, Gisbert, 2008), a także współistnienie zakażenia kilkoma szczepami jednocześnie.

Podsumowując, powszechność zakażenia, jego konsekwencje dla zdrowia oraz rosnąca liczba niepowodzeń terapeutycznych przy użyciu dostępnych leków stwarza konieczność poszukiwania nowych leków.

Campylobacter jejuni

Bakterie *Campylobacter jejuni*, gramujemne mikroaerofilne pałeczki, to najczęściej izolowane od ludzi enteropatogeny (Nachamkin, 2002, WHO). Wraz z *H. pylori* zliczono je do rzędu *Campylobacterales*, lecz do odrębnej rodziny – *Campylobacteraceae*. Rezerwuarem *C. jejuni* są ptaki, głównie kury hodowlane, dla których *Campylobacter* jest najczęściej niepatogennym komensalem.

Obok *C. jejuni*, patogenny dla ludzi jest również gatunek *Campylobacter coli*. Dużą liczbę komórek obu gatunków izoluje się na różnych etapach produkcji wyrobów mięsnych, począwszy od żywych zwierząt, a skończywszy na mięsie będącym już w sprzedaży detalicznej. Fakt ten, w połączeniu z względnie niską dawką infekcyjną (10^2 CFU) dla ludzi, tłumaczy dlaczego większość przypadków kampylobakteriozy w krajach rozwiniętych jest wynikiem kontaktu i/lub konsumpcji nieprawidłowo przygotowanego mięsa drobiowego (Silva i wsp., 2011).

Według Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) w 2016 roku w Europie 36,7% badanych świeżych tusz kurzych zawierało pałeczki *Campylobacter* spp.. Odsetek próbek mięsa brojlerów z dodatnim wynikiem badania na obecność tych bakterii był bardzo zróżnicowany w poszczególnych krajach Unii Europejskiej (EFSA 2016, EFSA i ECDC 2017). W Polsce w latach 2009-2013 częstość występowania *Campylobacter* spp. w mięsie brojlerów była wysoka: 50,2% próbek surowego mięsa i

41,6% próbek indyków. Ponadto *C. jejuni* i *C. coli* izolowano także z mięsa wieprzowego (10,6%) i wołowiny (10,1%) (Korsak i wsp., 2015).

Kliniczna manifestacja kamylobakteriozy bywa bardzo różnorodna i zależy zarówno od zdolności patogennych danego szczepu, jak i kondycji układu odpornościowego gospodarza. Spektrum objawów jest szerokie – od przypadków bezobjawowych do ostrych stanów zapalnych żołądka i jelit u ludzi, którym towarzyszy długotrwała, krwawa i śluzowata biegunka. W większości przypadków choroba ogranicza się do stanu zapalnego jelit i ma tendencję do samowyleczenia. Pałeczki *Campylobacter* są również przyczyną ostrych stanów zapalnych obwodowego układu nerwowego (tzw. zespół Guillaina-Barrégo), reaktywnego artretyzmu oraz sporadycznych, ale charakteryzujących się wysoką śmiertelnością infekcji ogólnoustrojowych (Poropatich i wsp., 2010). Ostatnie badania wskazują także na możliwe powiązanie infekcji *C. jejuni* z zespołem jelita drażliwego (IBS, *Irritable Bowel Syndrome*) i rakiem jelita grubego (Kaakoush i wsp., 2015).

Pomimo niezbyt ciężkich objawów chorobowych, tendencji do samowyleczenia i niskiej śmiertelności, infekcje pałeczkami *Campylobacter* pociągają za sobą ogromne koszty ekonomiczne. W 2012 roku szacowany roczny koszt związany z kamylobakteriozą (koszty medyczne, straty wydajności, koszty absencji w pracy, odszkodowania wypłacane w przypadku śmierci) w USA wynosił 1,7 miliarda USD, zaś w Holandii 21 milionów USD (Batz i wsp., 2012, Havelaar i wsp., 2005).

Aby zapobiec ponoszeniu tak wysokich kosztów, wiele krajów inwestuje w opracowanie strategii kontroli rozprzestrzeniania się pałeczek *Campylobacter* w przemyśle drobiarskim (Wagenaar i wsp., 2013). Strategie te dotyczą wielu kluczowych obszarów, w tym zmniejszenia narażenia kurcząt na zakażenie, zmniejszenia liczby lub całkowitej eliminacji pałeczek *Campylobacter* z przewodu pokarmowego kurcząt oraz zwiększenia odporności kurcząt na kolonizację *Campylobacter* (Kaakoush i wsp., 2015).

Ptaki na fermie zakażają się drogą horyzontalną. Pałeczki *Campylobacter* po pojawieniu się w stadzie rozprzestrzeniają się szybko i zajmują przewody pokarmowe większości kurcząt w ciągu 1 tygodnia (Kaakoush i wsp., 2015). Raz zakażone ptaki pozostają takimi aż do uboju. I chociaż są skolonizowane przez dużą liczbę komórek *Campylobacter* (do 10^9 bakterii/g treści jelita), zwykle nie wykazują żadnych klinicznych lub innych niekorzystnych skutków obecności bakterii (Newell i wsp., 2011). Jednak ostatnio pojawiły się doniesienia, że zakażenie *C. jejuni* u niektórych ras kurcząt może prowadzić do długotrwałego zapalenia, uszkodzenia jelit i biegunki (Humphrey i wsp., 2014).

Badania koncentrują się nad różnymi sposobami ograniczenia kolonizacji jelit kurcząt, co będzie miało wpływ na zmniejszenie przypadków kamylobakteriozy u ludzi. EFSA oszacowała, że obniżenie liczebności bakterii o trzy rzędy wielkości w jelicie ptaków przeznaczonych do uboju zmniejszy ryzyko zachorowania o 50% do 90% (EFSA, 2011). Oprócz prac nad użyciem bakteriocyn, bakteriofagów czy probiotyków do ograniczenia i/lub kontroli poziomu kolonizacji bakteriami *Campylobacter*, trwają także próby stworzenia szczepionki anty-*Campylobacter* dla kurcząt.

Wszystkie te działania nabrały ostatnio praktycznego wymiaru, gdyż obniżenie kolonizacji ptaków fermowych staje się koniecznością wymaganą przez regulacje prawne. W 2017 roku weszło w życie Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/1495 dotyczące obecności pałeczek *Campylobacter* w tuszach brojlerów. Wprowadziło ono kryterium *Campylobacter* dla higieny procesu, dla tusz drobiowych po schłodzeniu

na poziomie 1000 jtk/g dla liczby próbek $n=50$ oraz liczby próbek niespełniających kryterium $c=20$. Od 2020 roku wartość c powinna już wynosić 15, a od 2025 roku 10.

Pęcherzyki zewnętrzne błonowe (OMV)

Istotną rolę w procesie patogenezy (przenoszeniu czynników wirulencji do komórek eukariotycznych) odgrywają pęcherzyki błonowe (OMV – *outer membrane vesicles*). Są to zewnątrzkomórkowe struktury, o średnicy od 50 do 250 nm, związane z powierzchnią komórki i uwalniane do środowiska. Otoczone one są podwójną błoną fosfolipidową, która – podobnie jak błona zewnętrzna – zbudowana jest z fosfolipidów, lipopolisacharydu (LPS) i białek. Tworzenie pęcherzyków błonowych jest naturalnym zjawiskiem występującym u bakterii gramujemnych, zwłaszcza patogennych. Zaobserwowano je m.in. u *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus influenzae*, *H. pylori*, *C. jejuni*. Badania składu OMV wykazały, że zawierają one cząsteczki związane z powierzchnią komórki, tj. białka i lipidy błony zewnętrznej, LPS, ale także białka peryplazmatyczne, białka błony wewnętrznej, cytoplazmatyczne, cząsteczki biorące udział w procesie wyczuwania zagęszczenia (*quorum sensing*), a także cząsteczki RNA i DNA (Kuehn i Kesty, 2005).

Mechanizm powstawania pęcherzyków jest wciąż niejasny, nie wiadomo też, w jaki sposób do ich wnętrza dostają się białka cytoplazmatyczne czy cząsteczki DNA. W opublikowanej ostatnio pracy, Toyofuku i wsp. (2019) próbują uporządkować informacje na temat pęcherzyków. Proponują, żeby terminem OMV określać tylko struktury powstałe przez wyrzucenie błony zewnętrznej, zawierające w swoim wnętrzu TYLKO białka periplazmatyczne i zewnątrz błonowe. Pęcherzyki zawierające białka cytoplazmatyczne lub błony wewnętrznej powinny być według autorów określane skrótami OIMVs (*outer-inner membrane vesicles*) i EOMVs (*explosive outer-membrane vesicles*), gdyż ich biogeneza jest inna (Toyofuku i wsp., 2019). W tym autoreferacie używam wymiennie terminów ‘pęcherzyki błonowe’ i ‘OMV’, gdyż opisuję badania, które powstały w czasie, kiedy właśnie tak określano owe struktury, a propozycje Toyofuku i wsp. nie zyskały jeszcze powszechnej akceptacji.

Nawet połowę białek obecnych w pęcherzykach mogą stanowić czynniki wirulencji. W OMV bakterii patogennych wykryto adhezyny, toksyny, enzymy i LPS. Cząsteczki te za pośrednictwem OMV mogą być wyrzucane z komórki lub transportowane bezpośrednio do komórek innych bakterii lub komórek eukariotycznych. Niektórzy badacze uznają tworzenie OMV za kolejny system sekrecji. Ta funkcja OMV może być szczególnie istotna w komórkach *C. jejuni*, które nie mają genów kodujących III system sekrecji.

Oprócz zaangażowania w procesy sekrecji i wirulencji, OMV: (a) pełnią także inne funkcje obronne (jako „przynęta” dla bakteriofagów i przeciwciał), (b) uczestniczą w pozyskiwaniu składników odżywczych (dzięki obecności enzymów degradujących wielkocząsteczkowe związki), (c) pozwalają na oddziaływanie pomiędzy komórkami tego samego gatunku (tworzenie biofilmu) oraz z innymi bakteriami i komórkami eukariotycznymi, (d) biorą udział w odpowiedzi na warunki stresowe środowiska, oraz (e) usuwają z komórki niepotrzebne związki bądź źle zwinięte białka (Schwechheimer i Kuehn, 2015)

Zważywszy na ich właściwości immunogenne, zdolność do stymulacji układu odpornościowego i do wnikania do komórek eukariotycznych, pęcherzyki zewnętrzne błonowe mają potencjał do wykorzystania ich jako wektory szczepionek (Mashburn i Whiteley, 2005; Collins, 2011). Od 2014 roku w Unii Europejskiej, Kanadzie, Australii i niektórych krajach Ameryki Łacińskiej dostępna jest już

szczepionka (4CMenB) przeciwko *Neisseria meningitidis* serotyp B składająca się z 5 antygenów białkowych w połączeniu z OMV (Serruto i wsp., 2012). Prowadzone są także badania nad szczepionkami z użyciem OMV, skierowanymi przeciw kolejnym patogenom: *Bordetella pertusis*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydia trachomatis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Acinetobacter baumannii*, czy *Pseudomonas aeruginosa* (Klim i Godlewska, 2017).

Celem naukowym prac wchodzących w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego, było: (i) scharakteryzowanie i dokonanie oceny przydatności białka DsbI odnajdwanego w OMV, jako potencjalnego celu dla nowych leków anti-*H. pylori*, (ii) zbadanie procesu tworzenia OMV *C. jejuni* oraz identyfikacja środowiskowych i genetycznych czynników wpływających na ten proces, (iii) ocena przydatności pęcherzyków zewnątrzblonowych w immunoprofilaktyce anti-*Campylobacter*. Badania przeprowadzono na modelu dwóch spokrewnionych gatunków bakterii należących do rzędu *Campylobacterales*: *C. jejuni* i *H. pylori*. Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 4 powiązanych tematycznie prac oryginalnych i 1 pracy przeglądowej, opublikowanych w latach 2005-2019.

A. Charakterystyka genu *dsbI* *H. pylori* i ocena przydatności białka DsbI jako potencjalnego celu dla nowych leków anti-*H. pylori*

Publikacje:

Raczko A.M., Bujnicki J., Pawlowski M., **Godlewska R.**, Lewandowska K., Jagusztyn-Krynicka E.K. **2005**. Characterization of new DsbB-like thioloxydoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria, *Microbiology* 51, 219-231

Godlewska R., Dzwonek A., Mikula M., Ostrowski J., Pawlowski M., Bujnicki J., Jagusztyn-Krynicka E.K. **2006**. *Helicobacter pylori* protein oxidation influences the colonization process, *International Journal of Medical Microbiology* 296, 321-324

W komórkach bakterii gramujemnych tworzenie mostków disiarczkowych, stabilizujących prawidłową trzeciorzędową i czwartorzędową strukturę białek, zachodzi w utleniającym środowisku peryplazmy. Proces ten polega na utlenianiu grup tiolowych dwóch reszt cysteinowych. W komórkach *Echerichia coli* za wprowadzanie mostków disiarczkowych odpowiedzialne są białka z rodziny Dsb (***disulfide bond***), które tworzą dwa odrębne szlaki metaboliczne: (a) szlak utleniania, w którym biorą udział białka DsbA oraz DsbB, oraz (b) szlak izomeryzacji/redukcji, w którym biorą udział białka DsbC, DsbD, DsbE, DsbF i DsbG (Berkmen, 2012).

Główną oksydoreduktazą w komórkach *E. coli* jest peryplazmatyczne białko DsbA, zawierające charakterystyczny motyw CXXC oraz domenę tioredoksynową. DsbA po utworzeniu wiązania disiarczkowego w substracie znajdującym się w peryplazmie staje się białkiem zredukowanym. Za jego reoksydację, a co za tym idzie, powrót do aktywnej formy, odpowiedzialne jest DsbB – białko zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej, składające się z czterech transmembranowych helis (Kishigami i wsp., 1996).

Szlak izomeryzacji i redukcji reprezentują białka DsbC, DsbD i DsbG. Peryplazmatyczne białko DsbC naprawia błędnie wprowadzone mostki disiarczkowe

(Berkmen, 2012). Podobne działanie wykazuje białko DsbG, choć jego rola nie jest jeszcze do końca wyjaśniona. Sekwencja aminokwasowa DsbG jest w 24% identyczna z sekwencją DsbC i białko to może komplementować brak DsbC w komórce. Obydwa białka, oprócz aktywności izomeryzacyjnej, mają cechy białek opiekuńczych (chaperonowych).

Za utrzymanie w formie zredukowanej obu wspomnianych izomeraz jest odpowiedzialne białko DsbD zawierające transmembranowe helisy, zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej, oraz dwie domeny peryplazmatyczne. Znanymi substratami białka DsbD są trzy tioredoksyny: DsbC, DsbG oraz białko CcmG (DsbE) odpowiedzialne za proces dojrzewania cytochromu c – białka wchodzącego w skład łańcucha oddechowego (Łasica i wsp., 2007). Jak dotąd najmniej wiadomo na temat białka DsbF. Gen *dsbF* zidentyfikowano dzięki mutagenезie transpozycyjnej, w zmutowanym szczepie wykazującym zwiększoną wrażliwość na ditiotreitol (DTT) (Missiakas i wsp., 1993).

Białka Dsb są niezbędne do prawidłowego zwinięcia wielu białek, w tym białek będących czynnikami wirulencji – m.in. toksyn, adhezyn, składników III systemu sekrecji i wielu innych. Mutacje w genach systemu Dsb zmniejszają kinetykę tworzenia wiązań disiarczkowych i bardzo często powodują atenuację patogenów (Peek i Taylor, 1992; Yu, 1998; Yu i Kroll, 1999; Stenson i Weiss, 2002). Z powodu swojej komórkowej lokalizacji (w peryplazmie i błonie wewnętrznej) białka Dsb są prawie zawsze odnajdywane w pęcherzykach błonowych. Podobnie jest w przypadku OMV *H. pylori* (Mullaney, 2009; Zavan, 2019).

Praca „*Characterization of new DsbB-like thioloxydoreductases of Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria*” opisuje badania, których celem była identyfikacja, charakterystyka i klasyfikacja dwóch nowych oksydoreduktaz tiolowych związanych z systemem Dsb *C. jejuni* i *H. pylori*. W skład mojego osiągnięcia wchodzi badania dotyczące jedynie białka DsbI *H. pylori*, dlatego w opisie skupiłam się głównie na nich, pomijając inne wątki tej pracy, dotyczące białka DsbI *C. jejuni*.

Geny *dsbI* z obu gatunków bakterii zostały wcześniej niezależnie zidentyfikowane w trakcie immunoprecypitacji bibliotek genomowych szczepów *Campylobacter coli* 72Dz/92 i *Helicobacter pylori* (mieszanka szczepów klinicznych) (Łazowska, 2000). Dalsze badania były prowadzone z wykorzystaniem dobrze scharakteryzowanych szczepów: *H. pylori* J99 i *C. jejuni* 81-176. Przeprowadzone przez nas analizy porównawcze sekwencji aminokwasowych umożliwiły zaklasyfikowanie obu białek do rodziny białek DsbI (występujących w proteomach bakterii z rodzaju ϵ -*Proteobacteria*). Białka tej rodziny są homologiczne białkom z rodziny DsbB, z jej głównym przedstawicielem – białkiem DsbB *E. coli*. Charakterystycznymi cechami białek DsbI jest obecność pięciu helis transmembranowych w domenie katalitycznej, motywu CXXC umiejscowionego w pętli peryplazmatycznej i struktury β -śmigła na C-końcu białka.

Żeby zbadać rolę białka DsbI *H. pylori* w procesie wprowadzania mostków disiarczkowych do białek transportowanych poza cytoplazmę, uzyskałam mutant w tym genie. Mutacja w locus *dsbI* chromosomu *H. pylori* została wprowadzona dzięki rekombinacji homologicznej. Uzyskany szczep *H. pylori* z mutacją w genie *dsbI* został nazwany RG1. Nie zaobserwowałam znaczących różnic fenotypowych pomiędzy uzyskanym mutantem, a szczepem dzikimi. Analogiczne badania zostały wykonane dla genu *dsbI* *C. jejuni*.

Żeby określić wpływ mutacji w genach *dsbI* w komórkach *H. pylori* i *C. jejuni* na tworzenie wiązań disiarczkowych w białkach pozacytoplazmatycznych, wykonaliśmy ilościowy pomiar wolnych grup tiolowych obecnych w peryplazmie komórki (wg metody Missiakas i in., 1993). Uzyskane wyniki wykazały, że produkty genów *dsbI* obu gatunków są rzeczywiście zaangażowane w tworzenie wiązań disiarczkowych. Inaktywacja genu *dsbI* w komórkach *H. pylori* (szczep RG1) doprowadziła do akumulacji białek z wolnymi grupami tiolowymi w przestrzeni peryplazmatycznej. Po komplementacji uzyskanej mutacji za pomocą genów *dsbI* *H. pylori* oraz *dsbB* z *C. jejuni*, wprowadzonych w plazmidach, poziom białek z wolnymi grupami tiolowymi spadł do obserwowanego w szczepie dzikim. Przeprowadzony eksperyment potwierdził, że gromadzenie się w peryplazmie szczepu *H. pylori* RG1 białek z wolnymi grupami tiolowymi jest spowodowane brakiem białka DsbI, a ponadto, że białko DsbI *H. pylori* może być zastąpione przez DsbB *C. jejuni*. Wyniki analogicznego eksperymentu z użyciem mutantu *dsbI* *C. jejuni* nie były tak jednoznaczne z powodu obecności w tych komórkach białka DsbB. Dopiero podwójna mutacja w genach *dsbI* i *dsbB* spowodowała nagromadzenie w peryplazmie komórek białek z wolnymi grupami tiolowymi.

Przeprowadzone bioinformatyczne analizy porównawcze pozwoliły na zaproponowanie nowego drzewa filogenetycznego rodziny białek DsbI/DsbB. Zaproponowaliśmy podział rodziny DsbB na dwie główne klasy TM4 i TM5: białek z odpowiednio czterema i pięcioma domenami transmembranowymi, z jednym wyjątkiem, który stanowi białko DsbB *C. jejuni*, homologiczne białkom TM4, ale zawierające dodatkową, piątą domenę TM. Wykazaliśmy także, że DsbI jest nowym składnikiem systemu Dsb u *H. pylori* i *C. jejuni*.

Nasza analiza wskazała znaczące różnice w systemie Dsb między dwoma badanymi patogenami. Aktywne białko DsbI jest niewątpliwie istotne dla tworzenia wiązań disiarczkowych w białkach peryplazmatycznych *H. pylori*, w których komórkach brakuje „klasycznego” białka DsbB. W przypadku *C. jejuni*, aktywność DsbI jest wykrywana tylko wtedy, gdy białko DsbB obecne w komórkach tego gatunku jest inaktywowane. Najprawdopodobniej DsbI ma większą specyficzność substratową niż DsbB i działa tylko na małym podzbiórze substratów DsbB.

Ponieważ udowodniono, że prawidłowa struktura trzeciorzędowa wielu pozacytoplazmatycznych czynników wirulencji patogennych bakterii gramujemnych wymaga działania białek systemów Dsb (Kadokura, 2003), postanowiłam zbadać, czy scharakteryzowane białko DsbI *H. pylori* także ma znaczenie w procesach patogenezy tej bakterii.

W tym celu przeprowadziłam doświadczenie, w którym porównałam poziom kolonizacji śluzówki żołądka myszy linii C57BL/6 szczepem *H. pylori* SS1 (Sydney Strain) oraz tym samym szczepem z wprowadzoną mutacją w genie *dsbI*. Szczep *H. pylori* SS1 jest jednym z niewielu szczepów dobrze kolonizujących śluzówkę myszy. Niektóre objawy chorobowe różnią się od tych wywoływanych przez infekcję w organizmie ludzkim, ale szczep SS1 i wraz z liniami C57BL/6 lub BALB/c stanowi znormalizowany model myszy do opracowywania szczepionek, do badań przesiewowych i badań nad patogenezą *H. pylori* (Lee i wsp., 1997).

Mutanta w genie *dsbI* w szczepie SS1 uzyskałam analogicznie jak w przypadku szczepu J99, metodą wymiany alleli. Mysiom C57BL/6 podawano dwukrotnie, w odstępach tygodniowych, $\sim 4 \times 10^8$ komórek odpowiednich szczepów *H. pylori*: dzikiego szczepu SS1 oraz szczepu SS1 z mutacją w genie *dsbI*. Poziom kolonizacji

śluzówki żołądka myszy oceniano 3 tygodnie po ostatnim podaniu bakterii metodą jakościową (test urazowy CLO) oraz ilościową (RealTime PCR).

Ekstrapolowana ilość bakteryjnego DNA, określona ilościowo za pomocą RT-PCR, odpowiadała od 2230 do 18975 komórek bakteryjnym na 100 ng DNA myszy izolowanego z wycinków z żołądka pobranych od siedmiu myszy zakażanych przez szczep typu dzikiego SS1, oraz od 0 do 183 komórek bakteryjnych / 100 ng mysiego DNA w próbkach od siedmiu myszy zakażanych przez izogenicznego mutantą w *dsbI*. Obecność pałeczek *Helicobacter* w wycinkach błony śluzowej myszy wykrywałam także za pomocą jakościowego szybkiego testu ureazowego, który potwierdził wyniki uzyskane za pomocą RT-PCR. Wszystkie wycinki pobrane od zwierząt zakażonych szczepem SS1 typu dzikiego dawały wynik pozytywny w teście urazowym, zaś wszystkie testy były ujemne w przypadku wycinków pobranych od myszy zainfekowanych szczepem zmutowanym.

Przeprowadzone badanie wykazało, że mutacja w genie *dsbI* prawie całkowicie uniemożliwiła kolonizację żołądka myszy przez szczep SS1. Białka, na które bezpośrednio ma wpływ mutacja *dsbI*, pozostają nieznanne. Podobnie jak w przypadku wielu bakterii patogennych, brak białka DsbI może mieć niekorzystny wpływ na konformację wielu determinantów wirulencji, powodując ich niewłaściwe fałdowanie i niestabilność.

Przeprowadziliśmy analizę białek pozacytoplazmatycznych *H. pylori* (kryterium wyszukiwania była obecność helisy transbłonowej i/lub obecność sekwencji sygnałnej typu SpI lub SpII). Spośród 366 znalezionych białek 211 zawiera w swojej sekwencji co najmniej dwie cysteiny potencjalnie mogące tworzyć mostek disiarczkowy. Liczba ta jest górną granicą zbioru potencjalnych substratów białka DsbI. Analiza danych eksperymentalnych z testów dwuhybrydowych *H. pylori* dostępnych na stronie tajwańskiego *National Health Research Institutes* [<http://dpi.nhri.org.tw/hp/>] (Lin i wsp., 2005) ujawniła kilka białek, z którymi oddziałuje produkt genu HP0595, czyli białko DsbI szczepu 26695. Są to białka: HP0025 (Omp2), HP0060, HP0870 (FlgE), HP1052 (EnvA), HP1173 i HP1430.

Najbardziej interesujące pod względem patogeny jest białko HP1173, które jest najprawdopodobniej peryplazmatycznym białkiem, zakotwiczonym N-końcem w błonie wewnętrznej. HP1173 ma dwie reszty Cys, które – zgodnie z naszym wstępnym przewidywaniem struktury – najprawdopodobniej znajdują się na powierzchni białka, co sugeruje, że mogą być utleniane przez HP0595. Samo HP1173 wchodzi w interakcje z kolejnymi czterema białkami, które mogą brać udział w patogenyzie *Helicobacter*.

Kolejne interesujące białko oddziałujące z HP0595 to Omp2 (HP0025). Czterdzieści paralogów tego białka odnaleźliśmy w genomie *H. pylori*, 35 z nich nie miało homologa w żadnym dotychczas zsekwencjonowanym genomie. Białka z rodziny HP0025 mają charakterystyczne reszty Cys, których obecność sprawia, że są możliwymi substratami dla HP0595. Ponadto 27 z tych białek, podobnie jak HP0595, to białka pozacytoplazmatyczne, a ich funkcja pozostaje nieznana.

Na uwagę zasługuje także białko FlgE (HP0870), budujące hak rzęski czyli elastyczny łącznik pomiędzy włóknem rzęski a jej podstawą. Brak FlgE w komórkach najczęściej prowadzi do utraty ruchliwości. Co prawda, FlgE posiada w swej sekwencji tylko jedną cysteinę, ale możliwe jest, że uczestniczy ona w tworzeniu wiązań disiarczkowych między dwoma cząsteczkami białka (stabilizacja czwartorzędowej struktury homodimeru). Być może brak DsbI powoduje zaburzenie tego procesu, co skutkuje gorszym funkcjonowaniem rzęski bakteryjnej, która w przypadku *H. pylori* jest jednym z głównych czynników warunkujących wirulencję.

Przy użyciu PSI-BLAST poszukiwaliśmy także w genomach *ε-Proteobacteria* ortologów genów *dsbA*, *dsbB* i *dsbI*. Obecność białek DsbA i DsbB w genomach jest ze sobą silnie skorelowana. Jedynym wyjątkiem jest brak ortologa DsbB w *Campylobacter lari*. Co ciekawe, genom tej bakterii zawiera dodatkową kopię ortologa DsbI. Być może drugi ortolog DsbI w *C. lari* przejął funkcję utraconego białka DsbB i nabył zdolność interakcji z DsbA.

Analiza genomów obu szczepów *H. pylori* (26695, J99) wykazała obecność genów białek DsbI przy braku *dsbA*, co sugeruje, że białka DsbI pozostałych bakterii najprawdopodobniej oddziałują z innymi substratami niż u *H. pylori*. W komórkach *H. pylori* najprawdopodobniej funkcjonuje jeszcze jakiś dodatkowy, nieznanym mechanizmem, przeprowadzający utlenienie pary cystein w białkach docelowych. Nasze obserwacje wskazują na różnice w interakcjach pomiędzy białkami Dsb działającymi w dwóch blisko ze sobą spokrewnionych mikroorganizmach – *Campylobacter* i *Helicobacter* – i zdecydowanie sugerują wiodącą rolę DsbI w oksydacyjnym zwijaniu białek *Helicobacter*.

Podsumowując, białko DsbI *H. pylori* jest zaangażowane w jeden z procesów potranslacyjnej modyfikacji białek, który dodatkowo, co udowodniły przeprowadzone przeze mnie badania – ma wpływ na zjadliwość tej bakterii. Z tego względu DsbI jest potencjalnym celem tzw. leków antywirulentnych, blokujących proces wprowadzania mostków disiarczkowych w białkach peryplazmatycznych.

Główne osiągnięcie poznawcze

- Zaklasyfikowanie produktu genu *hp0595 H. pylori* do białek systemu Dsb na podstawie analiz bioinformatycznych i funkcjonalnych. Zaproponowanie nowego drzewa filogenetycznego białek rodziny DsbI/DsbB.
- Wykazanie, że brak białka DsbI *H. pylori* powoduje akumulację białek zawierających wolne grupy tiolowe w peryplazmie komórki.
- Wykazanie, że brak białka DsbI pozbawia bakterie *H. pylori* zdolności kolonizacji śluzówki żołądka myszy.

B. Analiza procesów tworzenia OMV *C. jejuni* oraz identyfikacja środowiskowych i genetycznych czynników wpływających na ten proces.

Publikacja:

Godlewska R., Wisniewska K., Pietras Z., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2009. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis, FEMS Microbiology Letters 298, 1

Godlewska R., Klim J., Dębski J., Wszyńska A., Łasica A. 2019. Influence of environmental and genetic factors on proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*, Polish Journal of Microbiology, 68(2)

Zewnętrzna błona (OM) bakterii gramujemnych może naturalnie wybrzuszać się, tworząc sferyczne formy o średnicy 50-250 nm, które w swym wnętrzu zawierają białka związane z błoną zewnętrzną, białka peryplazmatyczne, ale także białka błony wewnętrznej, białka cytoplazmatyczne oraz cząsteczki DNA i RNA. Uwalniane z powierzchni komórki pęcherzyki są jednym z środków oddziaływania bakterii na

środowisko, organizm gospodarza i inne mikroorganizmy (Schwechheimer i wsp., 2015). Zmiany rozmiaru, składu czy liczby OMV są często uważane za reakcję komórki bakteryjnej na zmiany zachodzące w środowisku (np. zmiany pH, temperatury, siły jonowej czy obecność antybiotyków), a także na stres endogenny (Mcbroom i wsp., 2007; Schwechheimer i wsp., 2015).

Obecność polimyksyny B (cyklicznego kationowego peptydu przeciwdrobnoustrojowego zmieniającego przepuszczalność błony) lub cyprofloksacyny (antybiotyku uszkadzającego DNA i aktywującego system SOS) powoduje zwiększenie produkcji OMV przez komórki *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Macdonald i wsp., 2013). Także nadekspresja peryplazmatycznego białka imitującego nieprawidłowo sfałdowane białko błony zewnętrznej w komórkach *E. coli* powodowało zwiększoną produkcję pęcherzyków oraz dziesięciokrotny wzrost ilości tego białka w OMV (Mcbroom i wsp., 2007). Znane są także geny uczestniczące w odpowiedzi na stres komórkowy (*degS*, *depP*, *rseA*), które są zaangażowane w tworzenie pęcherzyków (Mcbroom i wsp., 2006). Mutacja w *degP*, genie kodującym dwufunkcyjne peryplazmatyczne białko (o aktywności opiekuńczej oraz protezowej) odpowiedzialne za degradację nieprawidłowo sfałdowanych białek w *E. coli*, także zwiększa produkcję OMV (Macdonald i wsp., 2013). Zatem bakterie mogą używać OMV także do selektywnego usuwania źle sfałdowanych białek, szczególnie tworzących duże agregaty odporne na proteolizę (Mcbroom i wsp., 2007).

Ponieważ planowałam użycie pęcherzyków błonowych do immunizacji zwierząt, postanowiłam najpierw przeprowadzić badania dotyczące procesu ich tworzenia przez komórki *C. jejuni*. Badań dotyczących OMV *C. jejuni* jest niewiele. Znany jest skład białkowy pęcherzyków (Elmi i wsp., 2012), różnice w ich składzie w zależności od temperatury ciała gospodarza (ptaki 42°C, człowiek 37°C) (Taheri i wsp., 2019), zmiana składu pod wpływem działania soli żółciowych (Taheri i wsp., 2018) oraz znaczenie OMV w oddziaływaniu z komórkami nabłonkowymi (Elmi i wsp., 2016; Elmi i wsp., 2018; Taheri i wsp., 2018).

Sprawiłam więc, czy na tworzenie OMV przez komórki *C. jejuni* wpływa obecność polimyksyny B w podłożu, a także stres oksydacyjny wywołany przez zwiększoną zawartość tlenu w atmosferze z 6% do 15%. Zbadałam proteom pęcherzyków powstałych w tych warunkach i porównałam go z proteomem pęcherzyków uzyskanych od bakterii hodowanych w optymalnych warunkach, w celu wykrycia ewentualnych różnic. Zbadałam także wpływ mutacji w genach *htrA* (homolog *degP*) i *dsbI* na tworzenie i skład pęcherzyków w analogicznych eksperymentach.

Obecność polimyksyny B w podłożu znacząco zwiększyła produkcję OMV przez szczep *C. jejuni* 81-176. Także stres tlenowy spowodował zwiększone uwalnianie pęcherzyków. Wyniki są zgodne z danymi uzyskiwanymi dla innych gatunków bakterii. Nie zaobserwowałam natomiast wpływu mutacji w genach *htrA* i *dsbI* *C. jejuni* na liczbę uwalnianych przez komórki pęcherzyków. Ten wynik jest zaskakujący, gdyż mutacja w genie *htrA* w komórkach różnych gatunków powodowała zwiększenie produkcji OMV (Mcbroom i wsp., 2006; Macdonald i wsp., 2013).

Przeprowadziliśmy także identyfikację i ilościową analizę zawartości białek w OMV *C. jejuni* przy użyciu spektrometrii mas LC-MS-MS/MS. Proteom pęcherzyków uzyskanych od bakterii hodowanych w warunkach optymalnych nie różnił się znacząco pod względem jakościowym od wcześniej opisanych proteomów (Elmi i wsp., 2012). Odkryłam jednak liczne różnice w jego składzie ilościowym w pęcherzykach uzyskanych z bakterii hodowanych w warunkach stresowych oraz z hodowli mutantów w genie *dsbI*.

W OMV izolowanych z hodowli poddanej działaniu polimyksyny B poziom czterech białek był zwiększony, a jednego obniżony. Najwyższy wzrost odnotowano dla głównego białka błony zewnętrznej (MOMP) kodowanego przez gen *porA*. Nadekspresja MOMP zmienia przepuszczalność błony i odgrywa rolę w oporności *Campylobacter* na antybiotyki, prawdopodobnie także na polimyksynę B. Pozostałymi nadreprezentowanymi białkami są oksydaza 5'-fosforanu pirydoksaminy (Cj1613c) oraz dwa białka rzęski FlaB i FlgE. Destabilizacja osłon komórkowych może wpływać na integralność rzęski i spowodować zwiększoną obecność białek rzęski w OMV. Warto także pamiętać, że synteza białek rzęski i zdolność do jej tworzenia wpływa na produkcję OMV przez komórki *E. coli* W3110 (Manabe i wsp., 2013). Zaobserwowałam także zmniejszoną ilość białka HtrA, co jest zaskakujące, ale zgodne z obserwowanym brakiem wpływu mutacji *htrA* na produkcję i skład OMV.

Stres tlenowy spowodował zwiększoną zawartość trzech białek w OMV (MOMP, FlaA i białka transportującego żelazo – Cjj81176_0211) oraz zmniejszoną jednego – lipoproteiny o nieznannej funkcji. Na uwagę zasługuje białko związane z transportem żelaza – co prawda zwiększenie jego zawartości w pęcherzykach nie było duże (mniej niż dwukrotne), ale należy pamiętać, że poziom żelaza powinien być ściśle kontrolowany przez komórkę. W obecności żelaza z tlenu mogą powstawać jego reaktywne formy, takie jak nadtlenki i rodniki hydroksylowe, które uszkadzają białka, lipidy i DNA. Zatem absorpcja i asymilacja żelaza muszą być ściśle kontrolowane, aby uniknąć związanego z żelazem uszkodzenia wywołanego stresem oksydacyjnym w komórce i stąd być może eliminacja transportera żelaza do OMV przez bakterie pod wpływem stresu tlenowego.

Pierwszym genem, którego wpływ na OMV badałam w moich pracach, był *htrA*. Jest to homolog genu *degP* *E. coli*, jednego z pierwszych zidentyfikowanych genów, którego mutacje wiązały się ze zwiększoną produkcją pęcherzyków. Białka z rodziny HtrA są niezbędne dla inwazji komórek eukariotycznych, przemieszczania się bakterii z komórki do komórki oraz przeżycia bakterii w podwyższonej temperaturze (Backert i wsp., 2018). HtrA jest białkiem o aktywności proteolitycznej i opiekuńczej i uczestniczy w odpowiedzi komórek na stres (Boehm i wsp., 2018). Nieoczekiwanie ilość HtrA była zmniejszona w OMV izolowanych z komórek *Campylobacter* poddanych presji polimyksyną B. Wydaje się zatem, że HtrA nie bierze w tym udziału w odpowiedzi na stres związany z destabilizacją osłon komórkowych w *C. jejuni*. Nie zauważyłam również różnic w składzie białkowym w OMV izolowanych z mutantu *htrA*⁻.

Drugim przeanalizowanym genem był *dsbI*, rzadko spotykany paralog DsbB, opisany przez nas (Raczko i in. 2005) i należący do systemu Dsb *C. jejuni*, katalizującego tworzenie mostków disiarczkowych w białkach pozacytoplazmatycznych. Ponieważ mutacje w genach systemu Dsb powodują nieprawidłowe fałdowanie i tworzenie nierozpuszczalnych agregatów gromadzących się w peryplazmie, spodziewałam się, że mutacja w tym genie będzie miała wpływ na produkcję OMV. Chociaż wcześniej udowodniliśmy, że aktywność DsbI w *C. jejuni* manifestuje się tylko wtedy, gdy DsbB jest inaktywowany (Raczko i wsp., 2005), oczekiwałam że przeprowadzone badanie pozwoli na zidentyfikowanie nieznanymi wciąż substratów białka DsbI. Wykazałam, że mutacja w genie *dsbI* nie wpływa na ilość produkowanych pęcherzyków przez *C. jejuni*, ale wpływa na zawartość ośmiu białek w OMV. Większość z tych białek ma jedną lub więcej reszt cysteinowych, które mogą tworzyć mostki disiarczkowe wewnątrz bądź między cząsteczkami. Na szczególną uwagę zasługuje zwiększenie ilości białek rzęski (FlgC, FlgE i FlgL), obserwowane również w odpowiedzi na stres środowiskowy. Należy tu przypomnieć, że wśród potencjalnych partnerów białka DsbI *H. pylori* było także

białko FlgE, budujące hak rzęski. Taka zbieżność uzyskanych wyników jest silną przesłanką, że FlgE jest substratem białka Dsbl.

Zawartość białek GroL, enolazy i oksydazy koproporfirynogenu-III była także zmieniona w badanych pęcherzykach, ale przyczyna tych zmian jest obecnie trudna do wytłumaczenia.

Wyniki opisanych powyżej badań zostały zawarte w pracy „*Influence of environmental and genetic factors on proteomic profiling of outer membrane vesicles from Campylobacter jejuni*” przyjętej do druku w Polish Journal of Microbiology. Praca ukaże się w drugim zeszycie tomu 69.

W proteomie pęcherzyków uzyskanych od bakterii *C. jejuni* hodowanych w warunkach optymalnych zidentyfikowałam obecność kilku antygenów, które mogą zostać użyte jako antygeny podjednostkowej szczepionki. Białka te silnie reagują z surowicami zakażonych zwierząt, a także z surowicami pobranymi od 1-2 dniowych kurcząt. Przeciwciała w surowicy tak młodych ptaków mają pochodzenie matczyne. Ich obecność świadczy o dużej immunogenności tych białek. Na szczególną uwagę zasługują białka błonowe: CjaA, CjaC, CjaD, Dsbl, a także cytoplazmatyczne Eftu i Cj0092. Niektóre z nich były już obiektem moich badań.

Gen *cjaD* został zidentyfikowany w trakcie przeszukiwania biblioteki genomowego DNA *C. jejuni* przy użyciu króliczej surowicy anty-*Campylobacter*. CjaD reaguje także z surowicą pacjentów zakażonych różnymi serotypami *C. jejuni* (Burnens i wsp., 1995; Pawelec i wsp., 2000). Gen *cjaD* koduje 18-kDa białko obecne we wszystkich przebadanych pod tym kątem szczepach *Campylobacter*. Analizy *in silico* wskazują na jego przynależność do rodziny białek Pal. Inna pojawiająca się w literaturze nazwa tego białka to Omp18. Na badanie białka CjaD i innych lipoprotein *Campylobacter* uzyskałam finansowanie w postaci grantu KBN (2 P04C 015 27). Sekwencja aminokwasowa CjaD zawiera peptyd sygnałowy charakterystyczny dla prekursorów lipoprotein. Wykazałam, że CjaD jest zlokalizowane w błonie zewnętrznej komórki oraz że oddziałuje z białkiem TolB (metodami pull-down i cross link), co wskazuje że jest jednym z białek odpowiedzialnych za utrzymanie integralności osłon komórkowych (system Tol-Pal). Immunizacja kurcząt drogą pokarmową awirulentnym szczepem *Salmonella* produkującym rekombinowane CjaD wywołała indukcję produkcji swoistej klasy IgG i IgA odpowiednio w surowicy krwi i śluzu. Niestety, nie udało się przeprowadzić kompleksowych badań funkcji CjaD *C. jejuni*, gdyż wielokrotne próby uzyskania mutantu w genie *cjaD* nie powiodły się, co wskazuje, że białko Pal jest niezbędne do przeżycia komórek. Opisane wyniki zostały zawarte w napisanej przez nas pracy przeglądowej dotyczącej funkcji, struktury i udziału białek Pal w procesach patogenezы bakterii gramujemnych oraz ich potencjalnego zastosowania w immunoprofilaktyce.

Główne osiągnięcie poznawcze

- Scharakteryzowanie zmian zachodzących w proteomie pęcherzyków błonowych wydzielanych przez komórki *C. jejuni* 81-176 hodowane w warunkach stresowych wywołanych przez obecność polimyksyny B i zwiększony poziom tlenu w atmosferze.
- Wykazanie, że stres antybiotykowy i tlenowy powoduje zwiększoną produkcję pęcherzyków przez komórki *C. jejuni* 81-176.
- Wstępne scharakteryzowanie białka CjaD (lokalizacja w komórce, potwierdzenie oddziaływania z TolB)

C. Ocena przydatności pęcherzyków zewnątrzblonowych w immunoprofilaktyce anty-*Campylobacter*.

Publikacja:

Godlewska R., Kuczkowski M., Wyszyńska A., Klim J., Derlatka K., Woźniak-Biel A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2016. Evaluation of a protective effect of in ovo delivered *Campylobacter jejuni* OMVs, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 8855-8864

Pęcherzyki błonowe (OMV) ze względu na swoje właściwości immunostymulujące i adjuwantowe oraz zdolność do wnikania do komórek ssaków są atrakcyjnymi kandydatami na wektory szczepionkowe. Skład OMV (LPS, glicerofosfolipidy, błona zewnętrzna i białka peryplazmatyczne) powoduje, że są zdolne do pośredniczenia zarówno w odpowiedzi pro-, jak i przeciwzapalnej prowadzącej do usunięcia zakażenia lub do rozległego zapalenia (Mashburn-Warren i wsp., 2008; Mashburn i Whiteley, 2005). Dlatego OMV są przydatne jako szczepionki i adjuwanty stymulujące ogólnoustrojową i służówkową humoralną odpowiedź immunologiczną (Collins, 2011). Dodatkowym atutem jest możliwość manipulacji składem pęcherzyków za pomocą technik rekombinacyjnych. Tę możliwość postanowiłam wykorzystać w swoich badaniach. Pierwotnie moim kandydatem do wzbogacenia pęcherzyków było białko CjaD z powodu pełnionej przez nie funkcji i wpływu na stan komórki. Niestety niemożliwość uzyskania mutantu ze zinaktywowanym genem *cjaD*, do którego zamierzałam następnie wprowadzać plazmidy zawierające różne warianty tego genu, wymusiła zmianę antygeny. Również późniejsze próby uzyskania mutantu warunkowego w tym genie się nie powiodły i w rezultacie wciąż nie dysponujemy szczepem *C. jejuni* z mutacją w genie *cjaD*.

Ostatecznie pęcherzyki błonowe *C. jejuni* wzbogaciłam w białko CjaA, także naturalnie w nich występujące. CjaA jest glikozylowaną, silnie immunogenną lipoproteiną, zakotwiczoną w błonie wewnętrznej komórki. Gen *cjaA* został sklonowany i scharakteryzowany w naszym laboratorium (Pawelec i wsp., 1997; Wyszyńska i wsp., 2008), występuje we wszystkich szczepach *Campylobacter* przebadanych pod tym kątem. Analizy krystalograficzne rekombinowanego CjaA produkowanego przez *E. coli* wykazały, że ligandem dla CjaA jest cysteina oraz że jest ono składnikiem systemu transportu typu ABC (Muller i wsp., 2005).

W celu zwiększenia zawartości białka CjaA w OMV zastosowałam dwie strategie: (1) do komórek *C. jejuni* wprowadziłam dodatkową kopię genu *cjaA* w plazmidzie wahadłowym (pUWM639, 639-OMV), (2) do komórek *C. jejuni* wprowadziłam gen *cjaA* z mutacją punktową C20A (cysteina na alaninę) zmieniającą lokalizację CjaA z błonowej (IM) na peryplazmatyczną (plazmid pUWM1405, 1405-OMV). Spodziewałam się, że mutacja ta zwiększy ilość białka CjaA w peryplazmie komórek, a następnie także w OMV. Użyłam szczepu *C. jejuni* ze zmutowaną (inaktywowaną) chromosomalną kopią genu CjaA, co umożliwiło mi łatwe wykrycie i monitorowanie ekspresji wprowadzonego genu.

Ilościowy pomiar zawartości białka CjaA w pęcherzykach wykazał znaczne (prawie dwukrotne) zwiększenie zawartości antygeny CjaA w OMV izolowanych ze zmodyfikowanych szczepów w porównaniu z pęcherzykami szczepu dzikiego.

Kolejnym etapem badań była ocena skuteczności immunizacji kurcząt za pomocą pęcherzyków błonowych. Ptaki podzieliliśmy na 4, liczące po 50 osobników, grupy: kontrolną (nieimmunizowaną), immunizowaną wtOMV oraz rekombinowanymi pęcherzykami: 639-OMV i 1405-OMV. Pęcherzyki zostały podane oralnie, 18-dniowym embrionom, poprzez wstrzyknięcie OMV *in ovo* do worka owodniowego. Dwa tygodnie po wykluciu połowa piskląt z każdej grupy została zakażona pałeczkami *Campylobacter* (10^5 CFU). Po kolejnym tygodniu i dwóch (w 3 i 4 tygodniu życia zwierząt) oceniłam poziom kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt poprzez wysiew na szalki zawartości jelita ślepego. Immunizacja pęcherzykami błonowymi zapewniła umiarkowaną ochronę przeciwko zakażeniu *Campylobacter* w siódmym dniu po infekcji ptakom z dwóch zaszczepionych grup. Zaobserwowałam zmniejszenie liczby pałeczek *C. jejuni* w jelitach ptaków o niecałe dwa rzędy wielkości. W grupie kontrolnej poziom kolonizacji sięgał 2×10^9 CFU/g zawartości jelita. Dwa tygodnie po infekcji, poziom kolonizacji jelit immunizowanych ptaków nadal wydawał się niższy niż w grupie kontrolnej, ale różnice te nie były już istotne statystycznie.

Zbadałam także, za pomocą testu ELISA, poziomy przeciwciał IgY (z krwi kurcząt) i IgA (ze śluzówki jelit) anty-*Campylobacter*. Analiza ta wykazała indukcję swoistych przeciwciał anty-*Campylobacter* w obu klasach.

Uzyskane przeze mnie zmniejszenie poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt dzięki szczepieniu OMV nie wydaje się imponujące. Jednakże jego znaczenie biologiczne jest już istotne. Eksperti oszacowali, że obniżenie kolonizacji jelita ptaków o trzy rzędy wielkości (do ok. 10^6) zmniejszy ryzyko rozwoju kampylobakteriozy u ludzi o 50% (EFSA 2011), uzyskane przeze mnie zmniejszenie o prawie dwa rzędy wielkości jest zatem obiecujące.

Przeprowadzone badania potwierdziły potencjał OMV *C. jejuni* jako nowej szczepionki. Po raz pierwszy wykorzystywałam pęcherzyki jako nośniki antygenów i podałam je *in ovo*. Ta droga podania może być alternatywną metodą immunizacji kurcząt przeciwko *C. jejuni*. Dostarczanie antygeny *in ovo* stymuluje zarówno wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź immunologiczną. Droga *in ovo* jest już często wykorzystywana w szczepionkach przeciwwirusowych, a także do podawania preparatów, które korzystnie modyfikują mikrobiom układu pokarmowego kurcząt, stymulują odpowiedź immunologiczną i rozwój embrionalny, a ponadto do testowania efektów teratogennych (Bande i wsp., 2015; Negash i wsp., 2004).

Zastosowany przeze mnie pojedynczy schemat szczepienia z podaniem antygenów 18-dniowym zarodkom wywołał ochronę przed infekcją *C. jejuni*, ale była ona zbyt krótka.

Badania opisane w tej pracy były finansowane z grantu FNP POMOST/2012-6/4 „Analysis of the potential use of *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles (OMVs) for the immunization of chickens”

Główne osiągnięcia poznawcze

- Uzyskanie zmodyfikowanych pęcherzyków błonowych wzbogaconych w antygen CjaA. Dzięki opracowaniu tej metody możliwe będzie wzbogacanie OMV w kolejne antygeny.
- Opracowanie skutecznego schematu podawania OMV *in ovo*.
- Wykazanie, że podanie pęcherzyków 18-dniowym zarodkom kurcząt powoduje obniżenie kolonizacji układu pokarmowego kurcząt przez pałeczki *Campylobacter*.

- Wykazanie, że poziom przeciwciał IgG i IgA odpowiednio we krwi i śluzówce jelita był wyższy u zwierząt zakażonych *C. jejuni* w porównaniu ze zwierzętami niezakażanymi.
- Wykazanie, że wykorzystanie OMV jako nośnika antygenów w szczepionce anty-*Campylobacter* może doprowadzić do opracowania skutecznej szczepionki, choć konieczne jest wzmocnienie i wydłużenie czasu trwania odpowiedzi układu odpornościowego

PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszym wniosku prace koncentrują się na poszukiwaniu skutecznych sposobów zwalczania infekcji wywoływanych przez dwa spokrewnione ze sobą patogeny bakteryjne: *Helicobacter pylori* i *Campylobacter jejuni*. Bakterie te wywołują zupełnie inne, ale ważne z punktu widzenia zdrowia publicznego choroby.

Wciąż nie mamy skutecznej szczepionki zapobiegającej infekcjom *H. pylori*, a dostępne terapie tracą swoją skuteczność m.in. z powodu narastającej antybiotykooporności. Scharakteryzowane w badaniach białko DsbI uczestniczy w procesie tworzenia mostków disiarczkowych w białkach pozacytoplazmatycznych. Wykazałam, że zaburzenie tego procesu, poprzez usunięcie białka DsbI, ma wpływ na patogenność *H. pylori* i powoduje atenuację bakterii, która manifestuje się niezdolnością patogena do kolonizacji śluzówki żołądka myszy. Analizy bioinformatyczne pozwoliły na wytypowanie białek, które potencjalnie są substratami dla DsbI, ale wyniki te wymagają potwierdzenia eksperymentalnego. Podsumowując, uważam, że wytypowane przeze mnie białko DsbI może być potencjalnym celem nowych leków anti-*H. pylori*, choć należy pamiętać, że dalsze badania i poszukiwania innych białek systemu Dsb są konieczne do wyjaśnienia funkcjonowania systemu wprowadzającego mostki disiarczkowe w białkach tego gatunku.

Kampylobakterioza, wywoływana przez infekcję *C. jejuni*, jest również poważnym problemem zdrowia publicznego. Choć najczęściej konsekwencje infekcji nie są bardzo groźne i mają tendencje do samoczynnego ustępowania, to straty ekonomiczne wywoływane przez kampylobakteriozę nakazują zaliczyć *C. jejuni* do grupy patogenów o największym znaczeniu epidemiologicznym. Moje badania wykazały, że produkcja i zawartość OMV zmienia się, gdy komórki bakteryjne poddawane są stresowi oksydacyjnemu lub działaniu polimyksyny B. Także czynniki genetyczne wpływają na skład pęcherzyków. Wykazałam, że mutacja w genie *dsbI* również prowadzi do zmian w proteomie OMV. W mojej ocenie najważniejszym osiągnięciem jest jednak uzyskanie pęcherzyków wzbogaconych w antygen CjaA oraz wykazanie, że mogą one być wykorzystane do skutecznej immunizacji kurcząt.

Prowadzone przeze mnie badania, oprócz aspektu poznawczego, mają także aspekt aplikacyjny, ponieważ mogą zostać wykorzystane do opracowania nowych strategii zwalczania *H. pylori* i *C. jejuni*. Istotnie, zainteresował się nimi francuski potentat weterynaryjny CEVA i zaproponował współpracę (zob. niżej).

Realizacja niniejszego osiągnięcia była możliwa dzięki wykorzystaniu zarówno klasycznych, jak i nowoczesnych metod badawczych z zakresu fizjologii bakterii, biologii molekularnej, genetyki, immunologii i bioinformatyki. Wymagało to ode mnie między innymi wiedzy i doświadczenia w konstrukcji mutantów delecyjnych, wektorów ekspresyjnych, oczyszczania białek, jak również analiz *in silico* na poziomie sekwencji

DNA oraz umiejętności uzyskiwania pozwoleń i przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach. Przeprowadzenie badań było możliwe dzięki pozyskanym i kierowanym przeze mnie grantom finansowanym przez KBN oraz FNP.

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję:

- Kontynuację badań, dotyczących opracowania szczepionki anty-*Campylobacter* dla drobiu. Badaniami moimi i dr Agnieszki Wyszyńskiej zainteresowała się francuska firma CEVA, będąca jedną z 10 największych firm weterynaryjnych na świecie. W marcu 2019 roku zaprosiła nas do Bordeaux na spotkanie z grupą specjalistów zajmujących się w CEVA szczepionkami dla drobiu. Spotkanie zaowocowało propozycją współpracy, którą przyjęliśmy i obecnie ustalamy jej podstawy formalne i zakres merytoryczny. Planujemy badanie skuteczności nowych antygenów, zastosowanie pęcherzyków błonowych jako wektorów szczepionkowych, zastosowanie liposomów jako wektorów do przenoszenia antygenów, wykorzystanie adiuwantów dla wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej oraz przeprowadzenie badań na zwierzętach w warunkach jak najbardziej zbliżonych do tych panujących na kurzych fermach.

- Badania szczepów *Lactobacillus* pod kątem właściwości probiotycznych. Nasza grupa badawcza dysponuje kolekcją kilkudziesięciu szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych od kur zagrodowych. Przygotowałam projekt, który zgłosiłam do konkursu ogłoszonego przez NCN, mający na celu charakterystykę tych szczepów oraz wybór szczepu o najlepszych właściwościach probiotycznych dla drobiu. Nadrzędnym celem jest wybór bezpiecznych probiotyków przeznaczonych dla drobiu fermowego, które będą zapobiegały kolonizacji przewodu pokarmowego przez patogeny oraz wspomagały utrzymanie homeostazy przewodu pokarmowego. Produkt taki może wspomagać działanie opracowywanej przez nas szczepionki anty-*Campylobacter* lub nawet stać się, po modyfikacji, żywym nośnikiem takiej szczepionki.

- Chciałabym również rozwijać współpracę naukową z Katedrą Stomatologii Zachowawczej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (opisaną w części 5 wniosku). Planujemy stworzenie kolekcji szczepów *Streptococcus mutans* izolowanych od pacjentów z próchnicą zębów, ich charakterystykę oraz m.in. poszukiwanie skutecznych metod zablokowania adhezji tej bakterii do powierzchni zębów.

BIBLIOGRAFIA

1. Backert S., Bernegger S., Skorko-Glonek J., Wessler S. 2018. Extracellular HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 20: e12845
2. Bande F., Arshad S.S., Bejo M.H., Moeini H., Omar A.R. 2015 Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J Immunol Res* 2015:424860
3. Batz M.B., Hoffmann S., Morris J.G. 2012. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *J. Food Protect.* 75, 7, 1278-1291
4. Berkmen M. 2012. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* Mar;82(1):240-51
5. Boehm M., Simson S., Escher U., Schmidt A-M., Bereswill S., Tegtmeyer N., Backert S., Heimesaat M.M. 2018. Function of serine protease HtrA in the lifecycle of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Eur J Microbiol Immunol.* 28; 8(3): 70–77
6. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. 2003. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol.* 171:6164–6172
7. Burnens A., Stucki U., Nicolet J., Frey J. 1995 Identification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 33: 2826–2832
8. Collins B.S. 2011. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov. Med.* 12, 7–15
9. Cover TL, Blanke SR. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol.* 3:320–332
10. EFSA. 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* 9: 2105
11. EFSA. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 4634
12. EFSA, and ECDC 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 15(12)(5077), 228
13. Elmi A., Watson E., Sandu P., Gundogdu O., Mills D.C., Inglis N.F., Manson E., Imrie L., Bajaj-Elliott M., Wren B.W., Smith D.G., Dorrell N. 2012. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 80: 4089-4098
14. Elmi A., Nasher F., Jagatia H., Gundogdu O., Bajaj-Elliott M., Wren B., Dorrell N. 2016. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle-associated proteolytic activity promotes bacterial invasion by mediating cleavage of intestinal epithelial cell E-cadherin and occludin. *Cell Microbiol.* (4):561-72
15. Elmi A., Dorey A., Watson E., Jagatia H., Inglis N.F., Gundogdu O, Bajaj-Elliott M., Wren B.W., Smith D.G.E., Dorrell N. 2018. The bile salt sodium taurocholate induces *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle production and increases OMV-associated proteolytic activity. *Cell Microbiol.* ;20(3)
16. Fennerty M. B., Kovacs T. O., Krause R., Haber M., Weissfeld A., Siepmann N. 1998. A comparison of 10 and 14 days of lansoprazole triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Arch. Intern. Med.* 158, 1651–1656

17. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 1;136(5):E359-86
18. Gisbert J.P. 2008. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J Gastroenterol*. 14(35): 5385–5402
19. Graham, D. Y., Fischbach, L. 2010. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*, 59(8), 1143–1153
20. Gu H. 2017. Role of flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol*.74(7):863-869.
21. Havelaar AH, Nauta MJ, Mangen MJJ, de Koeijer AG, Bogaardt M-J, Evers EG, Jacobs-Reitsma WF, van Pelt W, Wagenaar JA, de Wit GA, van der Zee H. 2005. Costs and benefits of controlling *Campylobacter* in the Netherlands—integrating risk analysis, epidemiology and economics. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Netherlands.
22. Hoo, J.K.Y., La, W.Y., Ng W.K., Suen M.M.Y., Underwood F.E., Tanyingoh D., Ng S.C. 2017. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 153(2), 420–429).
23. Humphrey S., Chaloner G., Kemmett K., Davidson N., Williams N., Kipar A., Humphrey T., Wigley P. 2014. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio*. 5(4):e01364-14
24. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 279:373–377
25. Kaakoush N.O., Castano-Rodriguez N., Mitchell H.M., and Man S.M. 2015. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev* 28(3), 687-720
26. Kadokura H. 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 111–135.
27. Keller M.A., Stiehm E.R. 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. Oct;13(4):602-14
28. Kishigami S., Ito K. 1996. Roles of cysteine residues of DsbB in its activity to reoxidize DsbA, the protien disulphide bond catalyst of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 1, 201-208.
29. Klim J., Godlewska R. 2017. Zastosowanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrz błonowych w konstrukcji szczepionek. *Post. Mikrobiol.* 56, 1, 39–51
30. Korsak, D., Mackiw, E., Rozynek, E., and Zylowska, M. (2015). Prevalence of *Campylobacter* spp. in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef Meat in Poland between 2009 and 2013. *J Food Prot* 78(5), 1024-1028
31. Kuehn M.J. and N.C. Kesty 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*. 19: 2645-2655.
32. Laine L., Suchower L., Frantz J., Connors A., Neil G. 1998. Twice-daily, 10-day triple therapy with omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin for *Helicobacter pylori* eradication in duodenal ulcer disease: results of three multicenter, double-blind, United States trials. *Am. J. Gastroenterol*. 93, 2106–2112
33. Lee, A., O'Rourke, J., DeUngria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G. and Dixon, M.F. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: inducing the Sidney Strain. *Gastroenterology* 112 (1997) 1386- 1397.
34. Lytton SD, Fischer W, Nagel W, Haas R, Beck FX. 2005. Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology*.151:3267–3276
35. Łasica A.M., Staroń A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2007. Charakterystyka białek Dsb organizmów prokariotycznych, *Post. Mikrobiol.* 46, 3, 223-235.

36. Łaszewicz W. 2004. Raport z realizacji projektu celowego zamawianego Ministerstwa Zdrowia i Komitetu Badań Naukowych „Zakażenie *Helicobacter pylori* w Polsce – badania epidemiologiczne” Wydawnictwo Uniwersyteckie Trans Humana, Białystok).
37. Macdonald I.A., Kuehn M.J. 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 195: 2971-2981.
38. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, et al. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science.* 297:573–578
39. Manabe T., Kato M., Ueno T., Kawasaki K. 2013. Flagella proteins contribute to the production of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* W3110. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 151-156
40. Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 8390: 1311-5
41. Mashburn L.M., Whiteley M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437, 422–425
42. Mashburn-Warren L., Howe J., Garidel P., Richter W., Steiniger F., Roessle M., Brandenburg K., Whiteley M. 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* 69(2):491–502
43. McBroom A.J., Kuehn M.J. 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol.* 63: 545-558
44. Misiewicz J., Harris A., Bardhan K., Levi S., O'Morain C., Cooper B. 1997. One week triple therapy for *Helicobacter pylori*: a multicentre comparative study. *Gut* 41, 735–739
45. Missiakas D., Georgopoulos C., Raina S. 1993. Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl. Acad. Sci, USA*, 90, 7084-7088
46. Mullaney E., Brown P.A., Smith S.M., Botting C.H., Yamaoka Y.Y., Terres A.M., Kelleher D.P., Windle H.J. 2009. Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics Clin Appl.* Jul;3(7):785-96
47. Muller A., Thomas G.H., Horler R., Brannigan J.A., Blagova E., Levnikov V.M., Fogg M.J., Wilson K.S., Wilkinson A.J. 2005. An ATP-binding cassette type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Mol Microbiol* 57(1):143–155
48. Negash T., SO a-G., Gruys E. 2004) Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. *Areview. Vet Q* 26(2):76–87
49. Newell D.G., Elvers K.T., Dopfer D., Hansson I., Jones P., James S., Gittins J., Stern N.J., Davies R., Connerton I., Pearson D., Salvat G., Allen V.M. 2011. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl Environ Microbiol.* 77(24):8605-14
50. Noto JM, Peek RM. 2012. *Helicobacter pylori*: an overview. *Methods Mol Biol.* 921:7–10
51. Pawelec D., Rozynek E., Popowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. 1997 Cloning and characterization of a *Campylobacter jejuni* 72Dz/92 gene encoding a 30 kDa immunopositive protein, component of the ABC transport system; expression of the gene in avirulent *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19(2):137–150
52. Pawelec D.P., Korsak D., Wyszynska A.K., Rozynek E., Popowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2000 Genetic diversity of the *Campylobacter* genes coding immunodominant proteins. *FEMS Microbiol Lett* 185: 43–49
53. Peek, J. A. & Taylor, R. K. (1992). Characterization of a periplasmic thiol : disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6210–6214

54. Polk DB, Peek RM. 2010. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 10:403–414
55. Poropatich K.O., Fischer-Walker C.L., Black R.E. 2010. Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: a systematic review. *J Health Popul Nutr*. 28(6): 545–552
56. Raczko A.M., Bujnicki J.M., Pawlowski M., Godlewska R., Lewandowska M., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2005. Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria. *Microbiology* 151: 219-231
57. Schwechheimer C., Kuehn M.J. 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*. Oct;13(10):605-19
58. Serruto D., Bottomley M.J., Ram S. 2012. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, Bexsero®: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, 30, 87–97
59. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., and Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* 2, 200
60. Smith MF, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem*. 278:32552–32560
61. Song M. i Ang T.L. 2014. Second and third line treatment options for *Helicobacter pylori* eradication. *World J Gastroenterol*. 20(6): 1517–1528
62. Stenson, T. H. & Weiss, A. A. (2002). DsbA and DsbC are required for secretion of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 70, 2297–2303
63. Styer CM, Hansen LM, Cooke CL, Gundersen AM, Choi SS, Berg DE, Benghezal M, Marshall BJ, Peek RM, Borén T. 2010. Expression of the BabA adhesin during experimental infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 78:1593–1600.
64. Suzuki M, Mori M, Miyayama A, Iwai N, Tsunematsu N, Oonuki M, Suzuki H, Hibi T, Ishii H. 1997. Enhancement of neutrophil infiltration in the corpus after failure of *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol*. 25 Suppl 1:S222–S228
65. Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. 2009. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastric Cancer*. 12:79–87
66. Taheri N, Mahmud AKMF, Sandblad L, Fällman M, Wai SN, Fahlgren A. 2018. *Campylobacter jejuni* bile exposure influences outer membrane vesicles protein content and bacterial interaction with epithelial cells. *Sci Rep*. 16996.
67. Toyofuku M., Nomura N., Eberl L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol.*; Jan;17(1):13-24
68. Venerito M., Vasapolli R., Rokkas T., Delchier J.C., Malfertheiner P. 2017. *Helicobacter pylori*, gastric cancer and other gastrointestinal malignancies. *Helicobacter*. Sep;22 Suppl 1
69. Wagenaar J.A., French N.P., Havelaar A.H. 2013. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? *Clin Infect Dis*. 57(11):1600-6
70. Wyszynska A., Zycka J., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2008 The *Campylobacter jejuni/coli* cjaA (cj0982c) gene encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane. *Curr Microbiol* 57(3):181–188.
71. Zavan L, Bitto NJ, Johnston EL, Greening DW, Kaparakis-Liaskos M. 2019. *Helicobacter pylori* growth stage determines the size, protein composition, and preferential cargo packaging of outer membrane vesicles. *Proteomics*. Jan;19(1-2)
72. Yu, J. 1998. Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 66, 3909–3917.
73. Yu, J. & Kroll, J. S. 1999. DsbA: a protein-folding catalyst contributing to bacterial virulence. *Microbes Infect* 1, 1221–1228

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

Łazowska I., Trzeciak L., **Godlewska R.**, Hennig E., Jagusztyn-Krynicka E.K., Popowski J., Reguła J, Ostrowski J. 2000. In search of immunogenic *Helicobacter pylori* proteins by screening of expression library, *Digestion* 61, 14-21

Pracę naukową w Zakładzie Genetyki Bakterii rozpoczęłam w 1995 roku od badań dotyczących *Helicobacter pylori*. Były one prowadzone we współpracy z zespołem prof. Jerzego Ostrowskiego z Kliniki Gastroenterologii CMKP mieszczącej się w warszawskim Centrum Onkologii. W tamtym czasie wciąż niewiele było wiadomo o mechanizmach patogenezы tej bakterii. Dopiero w 1997 roku została opublikowana pierwsza pełna sekwencja genomu *H. pylori* (szczepu 26695). Jednakże już wtedy pojawiały się sygnały o nieskuteczności stosowanych terapii i konieczności poszukiwania innych rozwiązań terapeutycznych, np. szczepionki.

W trakcie naturalnej infekcji *H. pylori* aktywuje układ odpornościowy gospodarza, ale wygenerowana odpowiedź immunologiczna nie jest wystarczająca, aby usunąć bakterie. Badania na zwierzętach pokazywały, że doustne podanie różnych antygenów *H. pylori*, takich jak ureaza, białka szoku cieplnego, katalaza, VacA i CagA lub kombinacji różnych oczyszczonych antygenów wywołuje wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej, doprowadzając do eliminacji infekcji.

Celem naszych badań była poszukiwanie i identyfikacja białek *H. pylori* zdolnych do wywoływania humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Skonstruowaliśmy genomową bibliotekę ekspresyjną *H. pylori*, wykorzystując DNA wyizolowane ze szczepów bakteryjnych pobranych od 18 pacjentów cierpiących na chorobę wrzodową dwunastnicy. Bibliotekę przeszukiwaliśmy surowicami od zakażonych ludzi i od immunizowanych królików. Pozytywne klony częściowo zostały zsekwencjonowane, a geny w nich zawarte – zidentyfikowane na podstawie podobieństwa sekwencji.

Wyizolowaliśmy 114 pozytywnych klonów: 79 przy użyciu surowic ludzkich i 35 przy użyciu surowicy od immunizowanych królików. Analiza Western blot wykazała, że wybrane klony kodują jedno lub więcej silnie immunoreaktywnych białek. Znalezione przez nas geny kodujące immunopoztywne białka można było podzielić na trzy kategorie: (1) geny kodujące białka o znanej już funkcji (np. ureaza, flagelina lub białko wiążące penicylinę), (2) geny kodujące białka o znaczącym podobieństwie do białek innych bakterii o znanej funkcji, oraz (3) geny kodujące białka bez homologii do znanych białek. Szczególne zainteresowanie wzbudzały białka zawierające sekwencje sygnałne świadczące o ich pozacytoplazmatycznej lokalizacji. Charakterystyką trzech ze znalezionych w tym badaniu genów zajmowałam się w kolejnych latach (*hp1285*, *hp0596* i *hp0595*).

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Publikacja:

Godlewska R., Bujnicki J., Ostrowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2002. The *hppA* gene of *Helicobacter pylori* encodes the class C acid phosphatase precursor, FEBS Letters 525, 39-42

Godlewska, R., Pawlowski M., Dzwonek A., Mikula M., Ostrowski J., Drela N., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2008. Tip-alpha (*hp0596* gene product) is a highly immunogenic *Helicobacter pylori* protein involved in colonization of mouse gastric mucosa, Current Microbiology 56, 279-286

Badania, które prowadziłam w trakcie studiów doktoranckich, dotyczyły charakterystyki dwóch sierocych genów *H. pylori*: *hp0596* i *hp1285*. Część tych badań weszła w skład dwóch publikacji.

Obydwa geny zostały znalezione przez nas podczas przeszukiwania biblioteki genomowego DNA *H. pylori* surowicami od zakażonych pacjentów.

Białko Hp0596 nazywane Tip- α jest wysoce immunogennym, 18 kDa białkiem homodimerycznym, zakotwiczonym w błonie wewnętrznej komórki. Białko posiada charakterystyczny dla lipoprotein peptyd sygnałowy. Stworzony na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej model sugeruje, że Tip- α jest białkiem rozpuszczalnym. Większość hydrofobowych łańcuchów bocznych znajduje się w strukturalnym rdzeniu modelu, podczas gdy reszty hydrofilowe są zlokalizowane na powierzchni. Za pomocą RACE-PCR wyznaczyłam punkt startu transkrypcji (TSP) oraz skonstruowałam mutanta w genie *hp0596* w szczepach *H. pylori* N6 i SS1. Inaktywująca mutacja w genie *hp0596* spowodowała znaczący spadek poziomu kolonizacji śluzówki żołądka myszy przez *H. pylori*. Ponadto rekombinowane białko Tip- α stymuluje komórki makrofagów do wytwarzania IL-1 α i TNF- α . Oba wyniki sugerują, że białko Tip- α może być luźno połączone z błoną wewnętrzną komórki i uwalniane podczas infekcji.

Drugi z genów opisany w pracy „*The hppA gene of Helicobacter pylori encodes the class C acid phosphatase precursor*” koduje białko (25 kDa) zlokalizowane w błonie zewnętrznej komórki. Analizy porównawcze sekwencji aminokwasowej z sekwencjami zdeponowanymi w bazach danych wykazały podobieństwo białka HP1285 do białek o aktywności kwaśnej fosfatazy klasy C z nadrodziny fosfohydrolaz DDDD. Białko zostało nazwane HppA. Potwierdziłam jego aktywność enzymatyczną (w teście hydrolizy *pNPP*) i wyznaczyłam optymalne pH, przy którym enzym osiąga maksymalną aktywność (pH 5,5). Testy enzymatyczne prowadziłam zarówno przy użyciu rekombinowanego białka, jak i przy użyciu lizatów komórkowych uzyskanych z dzikiego szczepu *H. pylori* oraz ze szczepu z wprowadzoną mutacją w genie *hppA*. Analiza bioinformatyczna wskazała aminokwasy hipotetycznie znajdujące się w centrum aktywnym enzymu. W celu weryfikacji uzyskanego modelu białka przeprowadziłam mutagenezę specyficzną wobec miejsca w dwóch resztach kwasu asparaginowego: D73A i D192A, a następnie ekstrakty z ich komórek przeanalizowałam pod kątem aktywności kwaśnej fosfatazy. Mutanty wykazywały aktywność w przybliżeniu na tym samym poziomie, co kontrola negatywna.

Publikacje:

Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2003. Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki, *Postępy Mikrobiologii* 42, 2

Jagusztyn-Krynicka E.K., **Godlewska R.**, Łaniewski P. 2005. *Helicobacter pylori* – patogen roku 2005, *Kosmos* 54, 4

Wronowska W., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2005. Wpływ bakteryjnych patogenów układu pokarmowego na szlaki apoptyczne komórek eukariotycznych, *Postępy Biochemii* 51, 3

Jagusztyn-Krynicka E.K., **Godlewska R.** 2008. New approaches for *Helicobacter* vaccine development-difficulties and progress, *Polish Journal of Microbiology* 57, 1, 3-9

Nikoronow E., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2008. Oddziaływanie *Helicobacter pylori* na komórki systemu odporności wrodzonej, *Postępy Mikrobiologii* 47, 137-148

Ponieważ, przez kilka lat prowadziłam badania *Helicobacter pylori*, to jestem także współautorką kilku publikacji przeglądowych dotyczących tej bakterii. Prace dotyczą procesów patogenezy, oddziaływania bakterii z układem immunologicznym gospodarza, a także problemów związanych z opracowaniem skutecznej szczepionki przeciw *Helicobacter*. Zostały opublikowane w języku polskim i angielskim.

Publikacje:

Jagusztyn-Krynicka E.K., Szewczyk A., **Godlewska R.** 2001. Genomika – nowa strategia badania właściwości bakterii chorobotwórczych, *Postępy Mikrobiologii* 40, 1

Łaniewski P., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2006. Funkcje i sortowanie lipoprotein u bakterii Gram-ujemnych, *Postępy Mikrobiologii* 45, 3

Kolejne prace przeglądowe dotyczyły genomiki jako strategii badania właściwości bakterii oraz funkcji i mechanizmów sortowania lipoprotein u bakterii gramujemnych.

Publikacje:

Wyszyńska A., Zycka J., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2008. The *Campylobacter jejuni/coli* cjaA (cj0982c) gene encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane, *Current Microbiology* 57, 181-188

Łaniewski P., Lis M., Wyszyńska A., Majewski P., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2012. Assessment of chicken protection against *Campylobacter jejuni* infection by immunization with avirulent *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain producing *Campylobacter* CjaD/Pal protein, *Vaccine: Development and Therapy* 2012:2 43–50

Kobierecka P., Wyszyńska A., Gubernator J., Kuczkowski M., Wiśniewski O., Maruszewska M., Wojtania A., Derlatka K., Adamska I., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2016. Chicken anti-*Campylobacter* vaccine – comparison of various carriers and routes of immunization, *Frontiers in Microbiology* 7, 740

Po uzyskaniu stopnia doktora rozpoczęłam badania nad termotolerancyjnymi gatunkami z rodzaju *Campylobacter*: *C. jejuni* i *C. coli*. *Campylobacter* spp, zwłaszcza gatunek *Campylobacter jejuni*, są ważnymi ludzkimi enteropatogenami odpowiedzialnymi o roku za miliony przypadków chorób żołądkowo-jelitowych na całym świecie. *C. jejuni* jest odzwierzęcym patogenem, a mięso drobiowe, które zostało skażone mikroorganizmami, jest uznawane za kluczowe źródło zakażeń u ludzi. Opisano różne antygeny i opracowano liczne strategie zmierzające do stworzenia szczepionki dla drobiu, ale wciąż nie udało się uzyskać satysfakcjonujących wyników. Celem naszych badań była (i jest) charakterystyka mechanizmów patogenyzy oraz wybór odpowiednich antygenów, które mogą posłużyć do stworzenia skutecznej szczepionki anty-*Campylobacter* dla drobiu.

W wyniku przeprowadzonych badań scharakteryzowano gen *cjaA*. Koduje on silnie immunogenne białko, które wykazuje homologię do białek będących składnikami transportu ABC. Analiza Western-blot, przy użyciu specyficznej anty-rCjaA surowicy wykazała, że białko CjaA występuje w komórkach szczepu *C. coli* 72Dz w dwóch immunoreaktywnych formach o wielkości około 30 i 32 kDa. Taką samą analizę przeprowadzono także przy użyciu ekstraktów z całych komórek 10 klinicznych ludzkich izolatów należących do 2 gatunków: *C. jejuni* i *C. coli*. Wszystkie badane szczepy wytwarzały białko CjaA w dwóch formach. Analiza bioinformatyczna wykazała, że sekwencja aminokwasowa CjaA zawiera dwa motywy (108-NFT-110 i 139-NIS-141), których reszty asparaginowe mogą być potencjalnie N-glikozylowane. Aby ustalić, czy CjaA podlega glikozylacji, skonstruowano mutanta w genie *pglB*, w *C. jejuni* 81176. PglB jest homologiem podjednostki Stt3p - składnika eukariotycznego kompleksu transferazy oligosacharydu, odgrywającego kluczową rolę w N-glikozylacji. Utrata produktu genu *pglB* spowodowała pojawienie się tylko jednej formy CjaA o zwiększonej mobilności, co dowodzi że CjaA jest jego celem. Dodatkowo przeprowadzona mutagenesa specyficzna wobec miejsca dwóch potencjalnych miejsc glikozylacji (NIS i NFT) wykazała, że w CjaA jest glikozylowany tylko motyw NIS.

Zbadano także lokalizację białka CjaA w komórkach *Campylobacter*. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność sekwencji sygnałnej, która może być procesowana przez peptydazę sygnałową I, jak również przez peptydazę sygnałową II, specyficzną dla prekursorów lipoprotein. Przebadano lokalizację CjaA w *C. coli*, *E. coli* i *S. enterica* sv. Typhimurium. Lokalizacja białka CjaA jest zależna od gospodarza. W komórkach *Campylobacter* CjaA zlokalizowane jest w błonie wewnętrznej, podczas gdy w *E. coli* lub w *S. enterica* – w błonie wewnętrznej i peryplazmie. W komórkach *Campylobacter* CjaA jest modyfikowane jak lipoproteina. Lipoproteinowy charakter białka został także potwierdzony za pomocą znakowanego trytem kwasu palmitynowego, który jest przyłączany do pierwszego aminokwasu dojrzałego białka, tj. reszty cysteinowej.

Przedstawione badania finansowane były, między innymi, z grantu KBN: 2 P04C 015 27 „Charakterystyka lipoprotein *Campylobacter jejuni* funkcja fizjologiczna, mechanizmy transportu, interakcje z układem immunologicznym gospodarza”.

Kolejne badania dotyczyły białka CjaD (homologa Pal peptidoglycan-associated lipoprotein), które jest wysoce immunogennym antygenem. Przeprowadzone doświadczenia dowiodły, że jest ono zlokalizowane w błonie, głównie w błonie zewnętrznej. Gen *cjaD* został sklonowany w wysokokopijnym plazmidzie i wprowadzony do awirulentnego szczepu *S. enterica* sv. Typhimurium. Szczep ten został użyty do immunizacji kurcząt w celu ochrony przed infekcją *Campylobacter*. Komórki

Salmonella produkujące białko CjaD podano zwierzętom w 1 i 14 dniu życia. W 28 dniu życia ptaki były zakażane pałeczkami *Campylobacter*, a po kolejnym tygodniu i dwóch oceniano poziom kolonizacji jelita ślepego pałeczkami *Campylobacter*. Immunizacja bakteriami *S. enterica*/CjaD nie miała znaczącego wpływu na poziom kolonizacji *C. jejuni* w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano jednak, że ptaki w grupie immunizowanej różniły się między sobą znacznie poziomami kolonizacji, zwłaszcza 2 tygodnie po podaniu *C. jejuni*. Obserwowane różnice można tłumaczyć różną odpowiedzią pojedynczych osobników na zakażenie.

Kolejne badania, realizowane były we współpracy z zespołem prof. dr hab. Anny Wieliczko z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zbadano potencjalne zastosowanie nieżywych nośników antygenów *Campylobacter* do zwalczania infekcji tymi bakteriami u drobiu. Antygenami użytymi w tych badaniach były opisane powyżej dwa białka CjaA i CjaD.

Oceniono skuteczność immunizacji dostarczonymi doustnie lub podskórnie cząstkami GEM (Gram-positive Enhancer Matrix) niosącymi dwa antygeny CjaA i CjaD. Cząstki GEM powstają w wyniku gotowania komórek bakterii mlekowych (np. *Lactobacillus*) w kwasie trójchlorooctowym (TCA). Są testowane jako nośniki antygenów w immunizacji przeciwko niektórym chorobom zakaźnym, np. pneumokokowemu zapaleniu płuc, grypie, dżumie czy infekcjom *Shigella*. Te dwie drogi immunizacji z użyciem GEM jako wektora nie chroniły kurcząt przed kolonizacją pałeczkami *Campylobacter*.

W dalszej części badania oceniono skuteczność immunizacji *in ovo* różnymi systemami dostarczania antygenów: cząstkami GEM i liposomami. Jako antygeny użyto hybrydowe białko rCjaAD. Modelowanie strukturalne CjaA pozwoliło wyznaczyć miejsca, w które można wstawić dodatkowe epitopy bez naruszania struktury białka nośnikowego i jednocześnie zapewnić powierzchnią lokalizację epitopów drugiego immunogennego białka – CjaD. Stworzona następnie fuzja translacyjna rCjaAD z domeną LysM umożliwiła jego prezentację na powierzchni cząstek GEM.

Immunizacja hybrydowym białkiem rCjaAD podawanym *in ovo*, w 18 dniu rozwoju embrionalnego zarówno za pośrednictwem cząstek GEM jak i liposomów, spowodowała znaczne obniżenie poziomu kolonizacji jelit kurcząt po zakażeniu szczepem *C. jejuni*.

W praktyce szczepienie kurcząt *in ovo* jest wykorzystywane przez przemysł drobiarski do ochrony ptaków przed kilkoma chorobami wirusowymi. Nasza praca wykazała, że ten sposób podania jest również skuteczny w odniesieniu do bakterii komensalnych, takich jak *Campylobacter*.

Publikacje:

Grabowska A., Wandel M., Łasica A., Nesteruk M., Roszczenko P., Wyszyńska A., **Godlewska R.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2011. *Campylobacter jejuni dsb* gene expression is regulated by iron concentration in a Fur-dependent manner and by a translational coupling mechanism, BMC Microbiology 11: 166

Grabowska A.D., Wywiał E., Dunin-Horkawicz S., Lasica A.M., Wosten M.M.S.M., Nagy-Staron A., **Godlewska R.**, Bocian-Ostrzycka K., Pienkowska K., Laniewski P., Bujnicki J.M., van Putten J.P.M., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2014. Functional and bioinformatics analysis of two *Campylobacter jejuni* homologs of the thiol-disulfide oxidoreductase, DsbA, PLoS One 9, 9

Bocian-Ostrzycka K., Łasica A., Dunin-Horkawicz S.A., Grzeszczuk M., Drabik K., Dobosz A., **Godlewska R.**, Nowak E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2015. Functional and evolutionary analyses of *Helicobacter pylori* HP0231 (DsbK) protein with strong oxidative and chaperone activity characterized by a highly diverged dimerization domain, Frontiers in Microbiology 6, 1065

Uczestniczyłam również w badaniach, których głównym obiektem były białka systemu Dsb *H. pylori* i *C. jejuni*.

Wiele pozacytoplazmatycznych białek bakteryjnych jest stabilizowanych przez wewnątrzcząsteczkowe mostki disiarczkowe, które są wprowadzane post-translacyjnie pomiędzy ich resztami cysteinowymi. Taka modyfikacja białek jest katalizowana przez rodzinę białek redoks Dsb i odgrywa ważną rolę w patogenezie bakterii. Białka Dsb działają w przestrzeni peryplazmatycznej, w dwóch równoległych szlakach: w szlaku utleniania i ścieżce izomeryzacji. Nasze badania wykazały, że szlak oksydacyjny Dsb w *C. jejuni* jest bardziej złożony niż w komórkach *E. coli* K-12.

Przeprowadzona analiza sekwencji genomu *C. jejuni* 81-176 wykazała, że geny *dsb* szlaku oksydacyjnego są rozmieszczone w trzech jednostkach transkrypcyjnych: *dsbA2-dsbB-astA*, *dsbA1* i *dba-dsbl*. Ich transkrypcja reaguje na bodziec środowiskowy, jakim jest dostępność żelaza. Analizę aktywności promotorów poszczególnych jednostek transkrypcyjnych przeprowadzono przy użyciu β -galaktozydazy jako genu reporterowego. W komórkach hodowanych w warunkach ograniczonego dostępu do żelaza, aktywność $P_{dsbA2dsbBastA}$ była 10 razy niższa, aktywność P_{dsbA1} była o około 30% niższa, zaś aktywność $P_{dbadsbl}$ była czterokrotnie wyższa w porównaniu z komórkami hodowanymi w warunkach optymalnej zawartości żelaza w środowisku. W komórkach bakterii gramujemnych w regulacji ekspresji genów zależnych od żelaza często pośredniczy regulator wychwyty żelaza – białko Fur. W celu zbadania wpływu Fur na ekspresję genów *dsb*, skonstruowano izogenicznego mutantą w genie *fur* *C. jejuni* 480. Brak białka Fur powoduje derepresję $P_{dbadsbl}$ w środowisku bogatym w żelazo. W środowisku o niskiej zawartości żelaza aktywność białka Fur doprowadza do represji promotorów $P_{dsbA2dsbBastA}$ i P_{dsbA1} . Represja ta została zniesiona w szczepie z mutacją w genie *fur*. Test EMSA potwierdził, że analizowane geny należą do regulonu Fur, ale każdy z nich jest regulowany w inny sposób. Zarówno białko Fur nie związane z żelazem, jak i Fur w kompleksie z żelazem mogą wiązać się *in vitro* do regionów promotorowych *C. jejuni*.

Nasze badania pokazały, że stężenie żelaza jest istotnym czynnikiem wpływającym w transkrypcję genów *dsb*, a co za tym idzie wpływa na ilość białek zewnątrzkomórkowych produkowanych przez komórkę, w różnych stadiach zakażenia. Ponadto wykazaliśmy, że

synteza oksydoreduktazy błony DsbI jest sprzężona z syntezą Dba. Ekspresja *dba* jest nie tylko niezbędna do translacji kolejnego genu *dsbI*, ale także białko Dba, które może regulować aktywność i/lub stabilność DsbI.

Kolejne badania dotyczyły dwóch homologów głównej oksydazy Dsb *E. coli* (EcDsbA), które są obecne w komórkach *C. jejuni*. Organizacja genetyczna (opisana w poprzedniej pracy) sugeruje funkcjonalną analogię następujących par redox: CjDsbA1 do EcDsbA oraz CjDsbA2-CjDsbB do EcDsbL-EcDsbI. Celem naszych badań było wyjaśnienie mechanizmów funkcjonowania systemów Dsb ϵ -Proteobacteria. Zaproponowaliśmy drzewo filogenetyczne białek DsbA, DsbB i AstA, z którego wynika, że cały system DsbA1-2 / DsbB2 / AstA został przeniesiony drogą transferu horyzontalnego z rodzaju *Campylobacter* do wspólnego przodka gatunków należących do γ proteobakterii, a następnie jego późniejszą utratę w większości organizmów tego kladu.

Otrzymaliśmy różne warianty mutantów w badanych genach w celu przeprowadzenia obserwacji fenotypowych (ruchliwość i autoaglutynacja komórek *C. jejuni*) oraz testów enzymatycznych (test redukcji insuliny, wpływ CjDsbA na enzymatyczną aktywność dwóch substratów Dsb: arylosulfotransferazy CjAstA i alkalicznej fosfatazy CjPhoX). Przeprowadzone testy sugerują, że dwa DsbA *C. jejuni* pełnią różne role w komórce i mają inne substraty. Białko CjDsbA1 jest istotne w zdolności do ruchu i autaglutynacji komórek, podczas gdy CjDsbA2 nie ma wpływu na te procesy. CjDsbA1 odgrywa kluczową rolę w zwijaniu oksydacyjnym, które zapewnia aktywność fosfatazy alkalicznej CjPhoX, podczas gdy CjDsbA2 jest kluczowe dla aktywności arylosulfotransferazy CjAstA, kodowanej w operonie *dsbA2-dsbB-astA*.

Uzyskane wyniki pokazują, że CjDsbA1 jest główną oksydoreduktazą tiolową wpływającą na procesy życiowe związane z rozprzestrzenianiem się bakterii i kolonizacją gospodarza, jak również zapewnia oksydacyjne zwijanie niektórych substratów białkowych. Natomiast białko CjDsbA2 nie ma wpływu na te procesy. Jak dotąd wykazano aktywność zwijania oksydacyjnego dla jednego substratu – arylosulfotransferazy CjAstA. Wyniki sugerują współpracę między CjDsbA2 i CjDsbB. Białko CjDsbA1 ma najprawdopodobniej innego partnera redox w komórce, który je ponownie utlenia.

System białek Dsb *H. pylori* jest także odmienny od systemu *E. coli*. *H. pylori* nie koduje klasycznych oksydoreduktaz DsbA/DsbB, które są kluczowe dla wprowadzania mostków disiarczkowych w białkach pozacytoplazmatycznych. W komórkach *H. pylori* obecne są inne dwa, nietypowe białka odgrywające tę rolę: peryplazmatyczne HP0231, którego struktura przypomina EcDsbC / DsbG, oraz jego partner redoks, opisywane już przeze mnie, białko błonowe HpDsbI (HP0595) o strukturze β -śmigła. Celem naszych badań była ocena zależności między strukturą i funkcją HP0231.

Przeprowadzona analiza filogenetyczna wykazała, że białko HP0231 jest najściślej spokrewnione ewolucyjnie z domeną katalityczną DsbG, chociaż posiada motyw katalityczny typowy dla kanonicznych białek DsbA. Podobnie, N-końcowa domena odpowiedzialna za dimeryzację białka HP0231 jest homologiczna z domeną dimeryzacji DsbG. Aby lepiej zrozumieć funkcjonowanie tej nietypowej oksydoreduktazy, zbadano jej aktywność za pomocą eksperymentów *in vivo* i *in vitro*. Stwierdzono, że HP0231 wykazuje aktywność utleniającą, a także opiekuńczą, ale nie ma aktywności izomeryzującej. Badania wskazują także, że HP0231 nie bierze udziału we wprowadzaniu wiązań disiarczkowych do HcpC (bogatego w cysteinę białka *C. Helicobacter*), białka biorącego udział w modulacji interakcji *H. pylori* z organizmem gospodarza.

Ponadto skonstruowano również skróconą wersję HP0231 pozbawioną domeny dimeryzacji, oznaczoną HP0231m, i wykazano, że działa ona w komórkach *E. coli* w sposób zależny od DsbB. Jednak, w komórkach *H. pylori*, HP0231m i klasyczne monomeryczne EcDsbA (białko DsbA *E. coli*) nie były w stanie komplementować mutacji w genie *hp0231*, mimo pozostawania w stanie utlenionym. HP0231m jest nieaktywny w teście redukcji insuliny i wykazuje wysoką aktywność opiekuńczą, w przeciwieństwie do EcDsbA. Podsumowując, wykazano że HP0231 wykazuje zarówno aktywność oksydazy charakterystyczną dla białek DsbA i aktywność białka opiekuńczego charakterystyczną dla DsbC/DsbG, nie wykazuje natomiast aktywności izomeryzacyjnej.

Publikacje:

Prażmo E., **Godlewska R.**, Kwaśny M., Mielczarek A. 2016. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* in relation to pulp diseases and periapical infections, *Postępy Mikrobiologii* 55, 3

Prażmo E., **Godlewska R.**, Mielczarek A. 2017. Effectiveness of repeated photodynamic therapy in the elimination of intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm: an in vitro study, *Lasers in Medical Science* 32, 655-661

Prażmo E., **Godlewska R.**, Sałkiewicz M., Mielczarek A. 2016. Evaluation of Photodynamic Therapy Efficacy in Eliminating *Enterococcus faecalis* Biofilm: A Preliminary Study, *Dental and Medical Problems* 53, 490-495

Badania prowadzone były we współpracy z zespołem dr hab. Agnieszki Mielczarek z Zakładu Stomatologii Zachowawczej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Ich celem była ocena skuteczności terapii fotodynamicznej (PDT) w eliminacji biofilmu *Enterococcus faecalis* z kanałów zębowych. *Enterococcus faecalis* jest powszechnie obecny w postaci przetrwałej, w kanałach zębowych uprzednio leczonych przez ekstrakcję korzenia zęba. Powoduje tam bezobjawowe infekcje endodontyczne z tworzeniem zmian okołowierzchołkowych. Eliminacja konwencjonalnymi metodami chemomechanicznymi jest najczęściej nieskuteczna, a długotrwała infekcja grozi wysiewami bakterii do krwi (z możliwością rozwoju zapalenia wsierdza, a nawet posocznicy), a lokalnie – nadkażeniem, zgorzelą i koniecznością ekstrakcji zęba.

Celem tego badania było zbadanie skuteczności pojedynczego i powtórzonych cykli terapii fotodynamicznej w eliminacji biofilmu *E. faecalis*. Istotą terapii fotodynamicznej jest współdziałanie fotouczulacza, światła o odpowiedniej długości fali oraz tlenu. W badaniu użyliśmy roztworu błękitu toluidyny jako fotouczulacza i lasera diodowego o długości fali 635 nm jako źródła światła. Wykorzystaliśmy 46 jedno-korzeniowych zębów ludzkich. Po przygotowaniu chemomechanicznym, zęby zakażono klinicznym szczepem *E. faecalis* i inkubowano przez tydzień w warunkach mikroaerobowych. Zęby podzielono na 5 grup: (1) pojedynczy cykl terapii fotodynamicznej, (2) dwa cykle PDT, (3) sterylizacja 5,25% wodnym roztworem NaOCl, (4) kontrola negatywna (nie zakażana bakteriami) i (5) kontrola pozytywna (zakażana i traktowana solą fizjologiczną). Liczbę bakterii (CFU / ml) w kanałach korzeniowych określono metodą płytkową na podstawie wysiewu. Płukanie kanałów korzeniowych roztworem NaOCl, powodowało całkowitą eliminację *E. faecalis*. Pojedynczy cykl PDT spowodował zmniejszenie liczby bakterii o 45%, natomiast podwójna PDT spowodowała prawie całkowitą eliminację bakterii z kanałów zębowych (95%).

Nasze badanie wykazało, że terapia fotodynamiczna ma duży potencjał w eliminacji biofilmu *E. faecalis* z kanałów zębowych. Fotoindukowana dezynfekcja może być stosowana jako wspomaganie konwencjonalnego leczenia endodontycznego, które pozostaje najbardziej efektywne. Należy jednak pamiętać, że typowe chemiczne irygatory endodontyczne (np. NaOCl) wykazują działanie cytotoksyczne i neurotoksyczne.

Publikacja:

Klim J., Godlewska R. 2017. Zastosowanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzłonowych w konstrukcji szczepionek, Postępy Mikrobiologii 56, 43-55

Praca przeglądowa dotycząca wykorzystania pęcherzyków zewnątrzłonowych do produkcji szczepionek.

6. Dane bibliometryczne.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitantki, zgodnie z rokiem opublikowania – 37,783

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitantki – 541

Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitantki (wg bazy Web of Science) – 230

Indeks Hirscha habilitantki (wg WoS) – 8

