



UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
W Lublinie
Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dziedzina: **nauki ścisłe i przyrodnicze**

Dyscyplina: **nauki biologiczne**

Bożena Kowalczyk

nr albumu: 261932

**Rola składników powierzchniowych w zwiększonej
wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* serogrupa 1**

**(The role of surface components in the increased virulence
of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains)**

Rozprawa doktorska przygotowywana pod kierunkiem naukowym
dr hab. Marty Palusińskiej-Szysz, prof. UMCS

w Instytucie Nauk Biologicznych

LUBLIN, 2024

PODZIĘKOWANIA

*Składam najserdeczniejsze podziękowania
Promotorowi mojej pracy doktorskiej,
dr hab. Marcie Palusińskiej-Szysz, prof. UMCS,
za nieocenioną pomoc i wsparcie w prowadzeniu badań
i w rozwiązywaniu napotykanym naukowym problemom.*

*Pragnę podziękować także wszystkim
Pracownikom Katedry Genetyki i Mikrobiologii
za życzliwość oraz miłą i przyjazną atmosferę
towarzyszącą na co dzień
w czasie pracy.*

FINANSOWANIE

Wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej są częścią projektu pt. „Bakteryjne determinanty zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* sg 1” (nr 2017/27/B/NZ6/1544) realizowanego pod kierownictwem dr hab. Marty Palusińskiej-Szys, prof. UMCS na Wydziale Biologii i Biotechnologii w Instytucie Nauk Biologicznych, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).



UMCS
MARIA CURIE-SKŁODOWSKA UNIVERSITY



UMCS
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII



UMCS
INSTYTUT NAUK BIOLOGICZNYCH

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów stosowanych w pracy.....	9
Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim	18
Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim	19
I WSTĘP.....	20
1. Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Legionella</i>	20
1.1. Chorobotwórczość bakterii <i>Legionella</i> spp.	21
1.2. Budowa struktur powierzchniowych bakterii <i>L. pneumophila</i>	24
1.3. Struktura lipopolisacharydu <i>L. pneumophila</i>	24
1.3.1. Część O-specyficzna.....	24
1.3.2. Rdzeń oligosacharydowy	26
1.3.3. Lipid A	27
1.4. Biosynteza LPS na przykładzie <i>Escherichia coli</i>	31
1.4.1. Biosynteza Kdo ₂ -lipid A LPS <i>E. coli</i>	32
1.4.2. Biosynteza oligosacharydowego rdzenia LPS <i>E. coli</i>	35
1.4.3. Biosynteza antygeny O LPS <i>E. coli</i>	37
1.5. Genetyczne podstawy biosyntezy LPS <i>L. pneumophila</i>	39
1.5.1. Biosynteza lipidu A LPS <i>L. pneumophila</i>	39
1.5.2. Biosynteza polisacharydowej części LPS <i>L. pneumophila</i>	40
1.6. Budowa i właściwości fosfolipidów bakterii <i>L. pneumophila</i>	45
1.7. Szlaki biosyntezy fosfatydylocholiny	46
1.8. Rola składników lipidowych <i>L. pneumophila</i> w interakcji z komórką gospodarza .	48
1.9. Klasyfikacja serologiczna szczepów <i>L. pneumophila</i> sg 1	49
1.10. Biologiczne znaczenie LPS i fosfolipidów <i>L. pneumophila</i>	51

II HIPOTEZA I CEL PRACY	53
III MATERIAŁY I METODY	54
3.1. Szczepy bakteryjne	54
3.2. Konstrukcja genetyczna szczepu komplementacyjnego	55
3.3. Podłoża hodowlane	55
3.3.1. Wyciąg drożdżowy buforowany węglem drzewnym (BCYE) do hodowli bakterii <i>L. pneumophila</i>	55
3.3.2. Płynne podłoże do hodowli bakterii <i>Legionella</i> spp.	56
3.3.3. Płynne podłoże PYG opracowane przez Banda (1959) w modyfikacji Schlechta i Drożńskiego (1987) do hodowli ameb <i>A. castellanii</i>	56
3.4. Warunki prowadzenia hodowli	56
3.4.1. Hodowla szczepów <i>L. pneumophila</i> na podłożu BCYE	56
3.4.2. Hodowla szczepów <i>L. pneumophila</i> na płynnym podłożu	57
3.4.3. Hodowla ameb <i>A. castellanii</i>	57
3.4.4. Hodowla makrofagów linii THP-1 na podłożu RPMI 1640	57
3.4.5. Hodowla komórek nabłonkowych dróg oddechowych linii A549 i BEAS-2B	58
3.5. Delipidacja masy bakteryjnej	59
3.6. Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (UPLC- MS/MS)	59
3.7. Izolacja LPS z masy bakteryjnej (Westphal i Jann, 1965)	60
3.8. Elektroforeza SDS-PAGE	61
3.8.1. Barwienie żelu poliakrylamidowego azotanem srebra (Tsai i Frasch, 1982)	62
3.9. Elektrodializa LPS (Galanos i Lüderitz, 1975)	63
3.10. Izolacja kwasów tłuszczowych z preparatów LPS	63
3.11. Izolacja węglowodanów z preparatów LPS	64
3.12. Chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS)	64

3.13. Rozdział LPS na frakcję wysokocząsteczkową i niskocząsteczkową na kolumnie G50	65
3.16. Metody biologiczne	69
3.16.1. Test adhezji <i>L. pneumophila</i> do komórek <i>A. castellanii</i> oraz makrofagów linii THP-1	69
3.16.2. Test infekcji <i>A. castellanii</i> i makrofagów linii THP-1 przez <i>L. pneumophila</i>	70
3.16.3. Test inwazji <i>A. castellanii</i> i makrofagów linii THP-1 przez <i>L. pneumophila</i>	70
3.16.4. Test adhezji <i>L. pneumophila</i> do komórek linii A549 i BEAS-2B	71
3.16.5. Test infekcji komórek linii A549 i BEAS-2B przez <i>L. pneumophila</i>	72
3.17. Badanie poziomu cytokin prozapalnych w płynie pochodzonym z makrofagów linii THP-1 stymulowanych <i>L. pneumophila</i>	72
3.18. Badanie poziomu cytokin prozapalnych w komórkach linii THP-1 indukowanych LPS wyizolowanymi z komórek <i>L. pneumophila</i>	73
3.18.1. Oznaczenie poziomu TNF- α	73
3.18.2. Oznaczenie poziomu IL-6	74
3.18.3. Oznaczenie poziomu IFN- γ	74
3.18.4. Analiza statystyczna	75
IV WYNIKI BADAŃ	76
4.1. Analiza struktury LPS <i>L. pneumophila</i>	76
4.1.1. Elektroforeza SDS-PAGE	76
4.1.2. Skład kwasów tłuszczowych LPS <i>L. pneumophila</i>	78
4.1.3. Skład węglowodanów LPS <i>L. pneumophila</i>	80
4.1.4. Struktura wysokocząsteczkowego polisacharydu <i>L. pneumophila</i>	81
4.2. Oznaczenie profilu lipidowego szczepów <i>L. pneumophila</i> z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UPLC- MS/MS)	87
4.2.1. Analiza struktury lipidów <i>L. pneumophila</i> szczep Heysham-1 i T6-K13	89

4.2.2. Profil molekularny lipidów syntetyzowanych przez <i>L. pneumophila</i> szczepy 130b i 16D12.....	96
4.3. Oddziaływanie bakterii <i>L. pneumophila</i> z komórkami gospodarza.....	103
4.3.1. Pomiar stopnia polarności powierzchni bakterii <i>L. pneumophila</i>	103
4.3.2. Oddziaływanie <i>L. pneumophila</i> z <i>A. castellanii</i> oraz makrofagami linii THP-1 techniką bezpromistego przekazu energii	105
4.3.3. Adhezja <i>L. pneumophila</i> do makrofagów linii THP-1 oraz komórek <i>A. castellanii</i>	110
4.3.4. Adhezja <i>L. pneumophila</i> do komórek linii nabłonkowych A549 i BEAS-2B.....	111
4.3.5. Test infekcji <i>A. castellanii</i> i makrofagów linii THP-1 przez <i>L. pneumophila</i>	113
4.3.6. Infekcja komórek linii nabłonkowych A549 i BEAS-2B przez <i>L. pneumophila</i>	115
4.3.7. Test inwazji komórek <i>A. castellanii</i> i makrofagów linii THP-1 bakteriami <i>L. pneumophila</i>	118
4.4. Oznaczenie poziomu indukcji cytokin prozapalnych w makrofagach linii THP-1 stymulowanych komórkami <i>L. pneumophila</i>	119
4.4.1. Oznaczenie poziomu indukcji cytokin prozapalnych w makrofagach linii THP-1 indukowanych LPS <i>L. pneumophila</i>	120
V Dyskusja	125
VI Podsumowanie i wnioski	138
VII Bibliografia	140
VIII Aneks	162

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

A549	Linia komórkowa nabłonka pęcherzyków płucnych człowieka pochodząca z gruczolaka płuc (<i>Adenocarcinoma human lung epithelial cell line</i>)
A5P	5-fosforan- <i>D</i> -arabinozy (<i>D-Arabinose-5-Phosphate</i>)
ABC	Kaseta wiążąca ATP (<i>ATP-Binding Cassette</i>)
ABC-HRP	Kompleks awidyna/biotyna sprzężony z peroksydazą chrzanową (<i>Avidin-Biotin-Complex - Horseradish Peroxidase</i>)
ACN	Acetonitryl (<i>Acetonitrile</i>)
ACP	Białko będące donorem grup acylowych (<i>Acyl Carrier Protein</i>)
ANOVA	Analiza wariancji (<i>Analysis of Variance</i>)
API	Izomeraza 5-fosforanu- <i>D</i> -arabinozy (<i>D-Arabinose-5-Phosphate Isomerase</i>)
APS	Nadsiarczan amonu (<i>Ammonium Persulfate</i>)
ATCC	A amerykańska kolekcja hodowli komórkowych (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan (<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
<i>bcerS</i>	Gen kodujący bakteryjną syntazę ceramidową (<i>bacterial ceramide Synthase</i>)
BCFA	Rozgałęzione łańcuchy kwasów tłuszczowych (<i>Branched-Chain Fatty Acids</i>)
BCYE	Wyciąg drożdżowy zbuforowany węglem drzewnym (<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>)
BEAS-2B	Linia komórkowa nabłonka oskrzeli człowieka (<i>human bronchial epithelial cell line</i>)

Bufor SorC	Bufor Sörensena C (<i>Sörensens C Buffer</i>)
C1q	Składowa układu dopełniacza (<i>Component 1q</i>)
CAP	Zapalenie płuc nabyte w środowisku zamieszkania (<i>Community Acquired Pneumonia</i>)
CD14	Kompleks różnicowania 14/antygen różnicowania komórkowego 14 (<i>Cluster of Differentiation 14</i>)
CDP	Difosforan cytydyny (<i>Cytidine Diphosphate</i>)
Cer	Ceramidy (<i>Ceramides</i>)
<i>cerR</i>	Gen kodujący reduktazę ceramidową (<i>ceramide Reductase</i>)
CL	Kardiolipina (<i>Cardiolipin</i>)
CMP	Monofosforan cytydyny (<i>Cytidine Monophosphate</i>)
COSY	Spektroskopia korelacyjna (<i>Correlation Spectroscopy</i>)
COVID-19	Choroba koronawirusowa z roku 2019 (<i>Coronavirus Disease 2019</i>)
CR1	Receptory dopełniacza typu 1 (<i>Complement Receptor type 1</i>)
CR2	Receptory dopełniacza typu 2 (<i>Complement Receptor type 2</i>)
DAG	Diacyloglicerol (<i>Diacylglycerol</i>)
DG	Dwuglicerydy (<i>Diglycerides</i>)
DMEM	Modyfikowana pożywka Eagle'a Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
dMePE	Dimetylofosfatydyloetanolamina (<i>Dimethyl-Phosphatidylethanolamine</i>)
DMSO	Dimetylosulfotlenek (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DNaza	Deoksyrybonukleaza (<i>Deoxyribonuclease</i>)
Dot/Icm	Defekt w transporcie organelli/wewnątrzkomórkowym namnażaniu (<i>Defect in organelle trafficking/Intracellular multiplication</i>)
dsDNA	Dwuniciowy DNA (<i>double-stranded DNA</i>)

ECDC	Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EDTA	Kwas wersenowy (kwas etylenodiaminotetraoctowy) (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Test immunoenzymatyczny/immunoenzymosorpcyjny (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EU/EEA	Unia Europejska/Europejski Obszar Gospodarczy (<i>European Union/European Economic Area</i>)
FCS	Płodowa surowica cielęca (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Izotiocyanian fluoresceiny (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FLIM	Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>)
FRET	Transfer energii rezonansu Förstera (<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
GAG	Glukozyloaminoglikan (GAG, <i>Glycosaminoglycan</i>)
GC/MS	Chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
GlcN	Glukozamina (2-amino-2-deoksy-D-glukopiranoza)
GlcN3N	2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukopiranoza (<i>2,3-diamino-2,3-dideoxy-α-D-glucopyranose</i>)
GlcNAc	<i>N</i> -acetyloglukozamina (2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranoza)
GlcNAc3N	2-acetamido-3-amino-2,3-dideoksy-D-glukopiranoza
GTP	Guanozyno-5'-trifosforan (<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>)
HAP	Zapalenie płuc związane z hospitalizacją (<i>Hospital Acquired Pneumonia</i>)
HEPES	Kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)

HESI	Podgrzewana jonizacja przez elektrorozpylanie (<i>Heated-Electrospray Ionization</i>)
HGT	Horizontalny transfer genów (<i>Horizontal Gene Transfer</i>)
HMBC	Korelacja heterojądrowa wielokrotnych wiązań (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HMDS	1,1,3,3,3-Heksametylodisilan (<i>1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane</i>)
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
Hsp60	Białko szoku cieplnego 60 (<i>Heat shock protein 60</i>)
HSQC	Koherencja heterojądrowa pojedynczego kwantu (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
IFN-γ	Interferon – gamma (<i>Interferon – gamma</i>)
IgG	Immunoglobulina G (<i>Immunoglobulin G</i>)
IgM	Immunoglobulina M (<i>Immunoglobulin M</i>)
IL-6	Interleukina – 6 (<i>Interleukin-6</i>)
IM	Membrana wewnętrzna (<i>Inner Membrane</i>)
Kdo	Kwas 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy (<i>3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid</i>)
Kdo-8P	8-fosforan dezoksy-D-manno-oktulozonian (<i>Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate</i>)
LadC	Cyklaza adenylanowa bakterii <i>Legionella</i> (<i>Legionella adenylate Cyclase</i>)
LaiA	Cząsteczka adhezyjna <i>L. pneumophila</i> , homologiczna z analogiem integryny <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
LBP	Białko wiążące lipopolisacharyd (<i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>)

Lcl	Białko kolagenopodobne bakterii <i>Legionella</i> (<i>Legionella collagen-like</i>)
LCV	Wakuola zawierająca bakterie <i>Legionella</i> (<i>Legionella-Containing Vacuole</i>)
Leg5Ac7Ac	Kwas 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeksoxy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowy
Leg5Am7Ac	Kwas 5-acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradeksoxy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowy
Leg5AmNMe7Ac	Kwas 5-E/Z-N-(N-metylacetylimido-7-acetamidino-3,5,7,9-tetradeksoxy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowy
LPS	Lipopolisacharyd (<i>Lipopolysaccharide</i>)
LPS-R	Lipopolisacharyd typu szorstkiego (<i>Lipopolysaccharide-Rough type</i>)
LPS-S	Lipopolisacharyd typu gładkiego (<i>Lipopolysaccharide-Smooth type</i>)
LPS-SR	Lipopolisacharyd typu pośredniego (<i>Lipopolysaccharide-Semi Rough type</i>)
Lpt	Kompleks transportujący LPS (<i>Lipopolysaccharide transport</i>)
mAb	Przeciwciało monoklonalne (<i>monoclonal Antibody</i>)
Man	Mannoza (<i>Mannose</i>)
MAPK	Kinazy aktywowane mitogenami (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MMPE	Monometylofosfatydyloetanolamina (<i>Monomethyl Phosphatidylethanolamine</i>)
MOI	Wielkość/mnogość infekcji (<i>Multiplicity of Infection</i>)
MOMP	Główne białko błony zewnętrznej (<i>Major Outer Membrane Protein</i>)
MQ	Ultraczysta woda Milli-Q (<i>Milli-Q</i>)

MWCO	Odcięcie masy cząsteczkowej (<i>Molecular Weight Cut-Off</i>)
MyD88	Czynnik 88 różnicowania białaczki szpikowej (<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>)
NB	Błękit Nilu (<i>Nile Blue</i>)
NBD	Domena wiążąca nukleotyd (<i>Nucleotide-Binding Domain</i>)
NF-κB	Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa B (<i>Nuclear Factor-kappa B</i>)
NHS	<i>N</i> -hydroksysukcynimid (<i>N-Hydroxysuccinimide</i>)
NMR	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NulOs	Cukry nieulozonianowe (<i>Nonulosonate sugars</i>)
OM	Membrana zewnętrzna (<i>Outer Membrane</i>)
OmpS	Białko błony zewnętrznej S (<i>Outer membrane protein S</i>)
OMV	Pęcherzyki membrany zewnętrznej (<i>Outer Membrane Vesicles</i>)
OPS	polisacharyd O (<i>O-Polysaccharide</i>)
ORF	Otwarta ramka odczytu (<i>Open Reading Frame</i>)
PA	Kwas fosfatydowy (<i>Phosphatidic Acid</i>)
PAF	Czynnik aktywujący płytki krwi (<i>Platelet Activating Factor</i>)
PAMP	Wzorce molekularne związane z patogenami (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Roztwór soli fizjologicznej (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Fosfatydylocholina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PCR	Łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pcs	Syntaza fosfatydylocholiny (<i>Phosphatidylcholine synthase</i>)
PE	Fosfatydyloetanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)

PEP	Fosfoenolopirogronian (<i>Phosphoenolpyruvate</i>)
PG	Fosfatydyloglicerol (<i>Phosphatidylglycerol</i>)
PilY1	Białko związane z powierzchnią komórki <i>L. pneumophila</i> homologiczne do białka PilY1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PMA	Octan mirystynianu forbolu (<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>)
PmtA	Fosfolipidowa <i>N</i> -metylotransferaza (<i>Phospholipid N-methyltransferase</i>)
PseA	Kwas pseudoaminowy (<i>Pseudaminic Acid</i>)
PYG	Pożywka z ekstraktem drożdżowym, peptonem i glukozą (<i>Peptone Yeast Extract Glucose</i>)
QuiN	Chinowozamina (<i>Quinovosamine</i>)
QuiNAc	Acetylochinosaminina (<i>N-Acetyl-Quinovosamine</i>)
Rha	Ramnoza (<i>Rhamnose</i>)
RNaza	Rybonukleaza (<i>Ribonuclease</i>)
RPMI	Pożywka opracowana w Instytucie Pamięci w Roswell Park (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RtxA	Powtórzenia w toksynie strukturalnej A (<i>Repeats in structural toxin A</i>)
Ru5P	5-fosforan D-rybulozy (<i>Ribulose 5-Phosphate</i>)
SAH	<i>S</i> -adenozylhomocysteina (<i>S-Adenosyl Homocysteine</i>)
SAM	<i>S</i> -adenozylometionina (<i>S-Adenosyl Methionine</i>)
sCD14	Rozpuszczalna forma kompleksu różnicowania 14 (<i>soluble Cluster of Differentiation 14</i>)
SDS	Siarczan dodecyłu sodu (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z dodecylosiarczanem sodu (<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)

sg	Serogrupa (<i>Serogroup</i>)
spt	Gen kodujący palmitoilotransferazę serynową (<i>serine palmitoyltransferase</i>)
ST	Typ sekwencji (<i>Sequence Type</i>)
TALD	Zapalenie płuc związane z podróżami (<i>Travel Associated Pneumonia</i>)
TEA	Trietanolamina (<i>Triethanolamine</i>)
TEMED	Tetrametyloetylenodiamina (<i>Tetramethylethylenediamine</i>)
TFA	Kwas trifluorooctowy (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TG	Trójglicerydy (<i>Triglycerides</i>)
THP-1	Linia komórek ludzkiej białaczki monocytarnej
TLR	Receptor Toll-podobny (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TMD	Domena transbłonowa (<i>Transmembrane Domain</i>)
TMB	Tetrametylobenzydina (<i>Tetramethylbenzidine</i>)
TMCS	Trimetylochlorosilan (<i>Trimethylchlorosilane</i>)
TMSD	Trimetylosililodiazometan (<i>Trimethylsilyldiazomethane</i>)
TNF-α	Czynnik martwicy nowotworu- α (<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>)
TOCSY	Spektroskopia korelacyjna (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
TRIF	Białko adaptorowe indukujące IFN- β zawierające domenę TIR (<i>TIR-domain-containing adapter inducing IFN-β</i>)
UAT	Test na obecność antygenu w moczu (<i>Urinary Antigen Test</i>)
UDP	Urydyno-5'-difosforan (<i>Uridine-5'-diphosphate</i>)
UDP-Bac2Ac4Ac	UDP- <i>N,N'</i> -diacetylobakillozamina (<i>UDP-N,N'-diacetylba-cillosamine</i>)
UMP	Urydyno-5'-monofosforan (<i>Uridine-5'-monophosphate</i>)
Und-PP	Difosforan undekaprenylu (<i>Undecaprenyl diphosphate</i>)

UPLC – MS/MS

Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (*Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*)

2D NMR

Dwuwymiarowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance*)

Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim

Bakterie należące do rodzaju *Legionella*, po przedostaniu się ze środowiska wodnego do organizmu człowieka, wywołują legionellozę. Choroba ta występuje w dwóch postaciach klinicznych: grypopodobnej gorączki Pontiac oraz ciężkiego zapalenia płuc, zwanego chorobą legionistów. Zmiany demograficzne oraz klimatyczne sprawiły, że bakterie *Legionella* spp. stały się jednym z najważniejszych patogenów przenoszonych przez wodę, zarówno pod względem częstości występowania, jak i ciężkości wywoływanych infekcji. Mimo że, w ekosystemach wodnych istnieje ponad 70 gatunków i 90 serogrup legionell to około 90% przypadków legionellozy na świecie jest wywoływanych przez *L. pneumophila* sg 1. Grupę serologiczną *L. pneumophila* określa się na podstawie budowy lipopolisacharydu (LPS). Struktura LPS *L. pneumophila* sg 1 wpływa na fizyko-chemiczne właściwości powierzchni tych bakterii, determinuje zdolność do oddziaływania z komórkami gospodarza oraz moduluje odpowiedź immunologiczną na zakażenie. Do badań zostały wykorzystane kliniczne szczepy *L. pneumophila* sg 1 oraz mutanty pozbawione grup *O*-acetylowych w cukrach regionu rdzeniowego oraz grup *N*-metylowych kwasu legionaminowego części polisacharydowej LPS. Zaburzenia syntezy LPS wpłynęły na różnice w profilu lipidów *L. pneumophila* sg 1. Pomiar stopnia polarności powierzchni bakterii określony na podstawie własności spektroskopowych barwnika fluorescencyjnego (prodanu) wykazał różnice w hydrofobowości badanych szczepów. Decydującą rolę na wczesnym etapie oddziaływania *L. pneumophila* sg 1 z komórkami gospodarza, przed wejściem bakterii do wnętrza komórek eukariotycznych, odgrywają grupy *O*-acetylowe części polisacharydowej LPS. Badanie zdolności adhezyjnych bakterii do komórek fagocytujących i niefagocytujących wykazały, że modyfikacje LPS promują interakcje *L. pneumophila* sg 1 z makrofagami. Badania nad indukcją prozapalnych cytokin wykazały, że nie tylko lipid A, ale również część polisacharydowa LPS *L. pneumophila* sg 1 wpływa na poziom TNF- α , a występowanie reszt acetylowych *O*-acylujących ramnozy rdzenia, może być jednym ze sposobów ucieczki tych bakterii spod kontroli układu immunologicznego człowieka. Poznanie złożonych mechanizmów modulacji struktury, funkcji i sposobu oddziaływania LPS *L. pneumophila* sg 1 z komórkami gospodarza ma istotne znaczenie w projektowaniu nowych leków i ocenie nowych strategii terapeutycznych w ochronie przed infekcjami wywołanymi przez *L. pneumophila* sg 1.

Słowa kluczowe: *Legionella pneumophila* sg 1, lipopolisacharyd, lipidy, adhezja, prozapalne cytokiny

Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim

Bacteria belonging to the genus *Legionella*, upon entering the human body from the aquatic environment, induce legionellosis. This disease occurs in two clinical forms: Pontiac fever, resembling influenza-like symptoms, and severe pneumonia known as Legionnaires' disease. Demographic and climatic changes have made *Legionella* spp. one of the most important waterborne pathogens, both in terms of frequency and severity of infections. Although there are over 70 species and 90 serogroups of *Legionella* in aquatic ecosystems, approximately 90% of legionellosis cases worldwide are caused by *L. pneumophila* sg 1. The serogroup of *L. pneumophila* is determined based on the structure of lipopolysaccharide (LPS). The structure of *L. pneumophila* sg 1 LPS influences the physicochemical properties of these bacteria's surfaces, determines their ability to interact with host cells, and modulates the immune response to infection. Clinical strains of *L. pneumophila* sg 1 and mutants lacking *O*-acetyl groups in the sugars of the core region and *N*-methyl groups of legionaminic acid in the polysaccharide part of LPS were used for the study. Disruptions in LPS synthesis led to differences in the lipid profile of *L. pneumophila* sg 1. Measurement of bacterial surface polarity using the fluorescent dye probe (prodan) revealed differences in the hydrophobicity of the strains. *O*-acetyl groups of the polysaccharide part of LPS play a crucial role in the early stage of *L. pneumophila* sg 1 interaction with host cells before the bacteria enter the interior of eukaryotic cells. Studies on the adhesive abilities of bacteria to phagocytic and non-phagocytic cells showed that LPS modifications promote interactions between *L. pneumophila* sg 1 and macrophages. Research on the induction of pro-inflammatory cytokines showed that not only lipid A but also the polysaccharide part of *L. pneumophila* sg 1 LPS affects the level of TNF- α , and the presence of *O*-acetyl groups acylating the rhamnose core may be one of the ways for these bacteria to evade the human immune system's control. Understanding the complex mechanisms of modulating the structure, function, and interaction mode of *L. pneumophila* sg 1 LPS with host cells is crucial in designing new drugs and evaluating new therapeutic strategies to protect against infections caused by *L. pneumophila* sg 1.

Keywords: *Legionella pneumophila* sg 1, lipopolysaccharide, lipids, adhesion, pro-inflammatory cytokines

I WSTĘP

1. Charakterystyka bakterii z rodzaju *Legionella*

Bakterie z rodzaju *Legionella* występują w ekosystemach wodnych, w których namnażają się w komórkach wolnożyjących pierwotniaków należących głównie do gromady *Amoebozoa*. Do naturalnych gospodarzy *Legionella* spp. należą: *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga*, *Vermamoeba vermiformis*, *Dictyostelium discoideum* i *Naegleria* spp. (Hoffmann i in., 2014). Pierwotniaki zapewniają bakteriom zarówno niszę replikacyjną, jak i ochronę przed szkodliwymi warunkami środowiska, w tym antybiotykami, kwasami, biocydami, stresem osmotycznym i termicznym (Boamah i in., 2017). Zdolność przetrwania bakterii z rodzaju *Legionella* w niestabilnych i oligotroficznym warunkach środowiska wodnego wynika także z możliwości kolonizowania wielogatunkowych biofilmów. W obrębie biofilmu pałeczki *Legionella* są zróżnicowane fenotypowo. Wśród nich można wyodrębnić subpopulacje zjadliwych, nierosnących bakterii, które są aktywne metabolicznie, mają wysoką tolerancję na antybiotyki i wykazują ekspresję genów kodujących czynniki wirulencji. Te zjadliwe i wysoce zakaźne formy bakterii skutecznie proliferują w komórkach fagotroficznym żywicieli (Personnic i in., 2019). Adaptacja *Legionella* spp. do przetrwania w naturalnym środowisku doprowadziła do skutecznej kolonizacji sztucznych systemów wodnych, a zdolność do namnażania się w pierwotniakach przyczyniła się do nabycia cech wirulencji niezbędnych do zakażenia komórek człowieka (Chauhan i Shames, 2021; Hoffmann i in., 2014).

Zagrożenie epidemiologiczne stwarzają bakterie *Legionella*, które występują w systemach wodociągowych, o niskim poziomie środków dezynfekcyjnych, słabej cyrkulacji wody i temperaturze od 25°C do 45°C, która sprzyja namnażaniu się bakterii. W związku z okresowym zamknięciem budynków użyteczności publicznej i ograniczeniu eksploatacji wody w czasie pandemii zakaźnej choroby COVID-19 Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób oraz Grupa Badawcza Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych ds. zakażeń *Legionella* informowała o zwiększonym ryzyku infekcji *Legionella* spp. spowodowanym stagnacją wody w instalacjach wodno-kanalizacyjnych (Verhasselt i in., 2021). Do infekcji człowieka najczęściej dochodzi na skutek wdychania skażonego bakteriami aerozolu generowanego przez wieże chłodnicze, klimatyzatory, wanny z hydromasażem, urządzenia do hydroterapii, słuchawki prysznicowe, dekoracyjne fontanny (Garrison i in., 2016). Większość stwierdzonych ognisk zakażeń jest związana

z obiektami noclegowymi (np. hotelami, kurortami, statkami wycieczkowymi) lub placówkami opieki zdrowotnej (np. szpitale, ośrodki opieki długoterminowej) (Garrison i in., 2016). Rzadziej do infekcji dochodzi w wyniku aspiracji wody skażonej *Legionella* spp. (Cassell i in., 2019). Dotąd opisano jeden przypadek przeniesienia bakterii *L. pneumophila* szczep PtVFX/2014 z zakażonej osoby na zdrową (Borges i in., 2016).

1.1. Chorobotwórczość bakterii *Legionella* spp.

Infekcje wywołane przez *Legionella* spp. przyjmują dwie odrębne postaci kliniczne: chorobę legionistów oraz samoograniczającą się infekcję grypopodobną, gorączkę Pontiac. Rzadko występującą formą zakażenia bakteriami *Legionella* spp. jest infekcja pozapłucna. Zdiagnozowanie legionellozy u pacjenta wymaga potwierdzenia obecności klinicznych objawów i co najmniej jednego z wymienionych kryteriów laboratoryjnych: dodatni wynik testu na obecność antygeny *L. pneumophila* w moczu (UAT, *Urinary Antigen Test*), izolacja bakterii *Legionella* spp. z materiału klinicznego pobranego od pacjenta albo 4-krotny lub większy wzrost miana specyficznych przeciwciał w surowicy przeciwko *L. pneumophila* sg 1 (Barskey i in., 2020).

Choroba legionistów to ciężkie zapalenie płuc, które u około 90% pacjentów wymaga hospitalizacji (Barskey i in., 2020). Okres inkubacji choroby legionistów wynosi najczęściej od 2 do 10 dni. Początkowe objawy obejmują gorączkę, utratę apetytu, ból głowy, złe samopoczucie, bóle mięśni, biegunkę, dezorientację i letarg (Zarogoulidis i in., 2011). Występujący łagodny, suchy kaszel u 50% pacjentów staje się produktywny. Krwioplucie pojawia się w około jednej trzeciej przypadków (Gómez i in., 1992). *L. pneumophila* podobnie jak inne wewnątrzkomórkowe patogeny, wywołuje bradykardię z towarzyszącą gorączką, tzw. objaw Fageta (Ostergaard i in., 1996). U pacjentów z immunosupresją istnieje ryzyko rozwoju ropnia płuc i ropniaka opłucnej (Guy i in., 2011). Rzadkim objawem choroby legionistów u pacjentów z rozsianą infekcją jest hipertriglicydemia i rabdomioliza (Patel i in., 2021). Pozapłucne objawy choroby legionistów obejmują dolegliwości żołądkowo-jelitowe (Dalal i in., 2020), podwyższoną aktywność aminotransferaz w surowicy, dysfunkcję neurologiczną (encefalopatia), dysfunkcję nerek (białkomocz, zwiększone stężenie kreatyniny w surowicy) i hiponatremię (Cunha, 1998). Niekiedy obserwuje się objawy dermatologiczne w postaci np. wysypki plamisto-grudkowej (Carter i in., 2022).

Potwierdzone przypadki choroby legionistów podlegają obowiązkowi raportowania we wszystkich 31 krajach Unii Europejskiej/Europejskiego Obszaru Gospodarczego

(EU/EEA), w których około 70% wszystkich zgłoszeń stanowią przypadki nabyte w środowisku zamieszkania (CAP, *Community Acquired Pneumonia*), 20% związane z podróżami (TALD, *Travel Associated Legionnaires' Disease*) i 10% związane z hospitalizacją (HAP, *Hospital Acquired Pneumonia*) (Beauté, 2017).

Gorączka Pontiac to łagodna postać infekcji nie prowadząca do rozwoju zapalenia płuc. Klinicznie objawy gorączki Pontiac obejmują podwyższoną temperaturę, ogólne osłabienie, ból mięśni i stawów, ból głowy, kaszel, nudności i ból gardła (Pancer i Stypulkowska-Misiurewicz, 2003). Pojawiają się również inne objawy, takie jak duszność, ból w klatce piersiowej (Castor i in., 2005), wymioty i biegunka (Jones i in., 2003). Choroba nie wymaga specjalistycznego leczenia, pacjenci wracają do zdrowia w ciągu dwóch do pięciu dni od zakażenia. Gorączka Pontiac charakteryzuje się krótkim okresem inkubacji (zwykle od 30 do 90 godzin, średnio 36 godzin) oraz brakiem długotrwałych powikłań i zgonów. Ze względu na łagodny charakter i brak specyficznych objawów gorączka Pontiac jest często mylona z innymi zakażeniami i rzadziej odnotowywana niż choroba legionistów (Pancer i Stypulkowska-Misiurewicz, 2003).

Infekcje bakteriami z rodzaju *Legionella* mogą powodować bakteremię i szerzenie się zakażenia poza układem oddechowym. Pozapłucne lokalizacje *Legionella* spp. najczęściej dotyczą mięśnia sercowego (Spighi i in., 2021). Bakterie *Legionella* spp. powodują zapalenie osierdzia, zapalenie wsierdzia i/lub zapalenie mięśnia sercowego ze zmniejszeniem kurczliwości lewej komory (Suzuki i in., 2011). Do innych pozapłucnych lokalizacji bakterii *Legionella* spp. należą: tkanka mózgowa (Kay i in., 2007), jama brzuszna (Laivier i in., 2019), pęcherzyk żółciowy (Anyfantakis i in., 2015), stawy (Andereya i in., 2004), skóra i tkanka podskórna (Chitasombat i in., 2018).

Czynniki ryzyka predysponujące do nabycia infekcji *Legionella* spp. obejmują starszy wiek (> 50 lat), płeć męską, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, osłabiony układ odpornościowy i przewlekłe choroby układu oddechowego lub nerek (Barskey i in., 2022). Ryzyko nabycia zapalenia płuc w szpitalu wzrasta u pacjentów po niedawno przebytych zabiegach operacyjnych, poddanych intubacji, wentylacji mechanicznej lub z założoną sondą nosowo-żołądkową. Grupą pacjentów szczególnie obciążoną ryzykiem rozwoju choroby legionistów są pacjenci z immunosupresją, w tym biorcy przeszczepów narządów, pacjenci z chorobami nowotworowymi i przyjmującymi kortykosteroidy. Nieprawidłowe rozpoznanie zakażenia i późne wdrożenie odpowiedniej antybiotykoterapii, podeszły wiek oraz choroby współistniejące są głównymi przyczynami zgonu z powodu choroby legionistów (ECDC, 2021).

U osób z obniżoną odpornością śmiertelność z powodu choroby legionistów może wynosić 40-80% (Chidiac i in., 2012).

Do chwili obecnej zidentyfikowano 72 gatunki, które zostały zaliczone do rodzaju *Legionella*, z czego 28 gatunków wyizolowano bezpośrednio od chorych. Najczęstszą przyczyną choroby legionistów jest *L. pneumophila*, która odpowiada za około 90% laboratoryjnie potwierdzonych przypadków w Europie i USA, spośród których około 80% stanowi *L. pneumophila* sg 1 (Mercante i Winchell, 2015; ECDC, 2021). Do innych gatunków *Legionella* spp. najczęściej wywołujących pneumonię należą: *L. bozemanae*, *L. micdadei* i *L. longbeachae*, które odpowiadają za 2–7% zakażeń na świecie (Chambers i in., 2021). W Australii, Nowej Zelandii i Japonii dominującym gatunkiem wywołującym infekcje jest *L. longbeachae* (Whiley i Bentham, 2011).

U podstaw patomechanizmu rozwoju choroby legionistów leży zdolność do namnażania się w makrofagach alweolarnych, stanowiących główną linię obrony przed bakteryjną infekcją płuc (Copenhaver i in., 2014). Poza makrofagami bakterie *Legionella* spp. namnażają się także w monocytach, fibroblastach, komórkach nabłonkowych pęcherzyków płucnych typu I i II oraz komórkach śródbłonna (Chiaraviglio i in., 2008; Horwitz i Silverstein, 1980). Wewnątrzkomórkowe patogeny *Legionella* spp. wykorzystują IV system sekrecji Dot/Icm (*Defect in organelle trafficking/Intracellular multiplication*) w celu translokacji do komórek gospodarza białek efektorowych, które manipulują przebiegiem procesów dojrzewania wakuoli trawiennej i prowadzą do jej przekształcenia w wakuolę replikacyjną (LCV, *Legionella-Containing Vacuole*) (Sherwood i Roy, 2016). *L. pneumophila* syntetyzuje ponad 300 różnych białek efektorowych, które wykazują strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do białek eukariotycznych (Allombert i in., 2014). Efektory uwalniane przez system Dot/Icm *L. pneumophila* zakłócają szlaki metaboliczne komórki gospodarza, w tym: transport pęcherzykowy (Heidtman i in., 2009), translację białek (Shen i in., 2009), proces indukcji odpowiedzi na warunki stresowe (Belyi i in., 2009), apoptozę komórek (Abu-Zant i in., 2007), przemianę guanozyny-5'-trifosforanu (GTP, *Guanosine-5'-triphosphate*) (Kagan i in., 2004) oraz szlaki ubiquitynacji (Ivanov i Roy, 2009). Poza obszernie opisaną w literaturze rolę białek *Legionella* spp. w interakcji z komórką gospodarza, niewiele jest informacji na temat udziału lipidowych struktur powierzchniowych, takich jak lipopolisacharydy (LPS) i fosfolipidy w patogenezie tych wewnątrzkomórkowych bakterii.

1.2. Budowa struktur powierzchniowych bakterii *L. pneumophila*

Ośłona komórkowa *L. pneumophila* jest typowa dla Gram-ujemnych bakterii i składa się z dwóch odrębnych błon: wewnętrznej (IM, *Inner Membrane*) i zewnętrznej (OM, *Outer Membrane*), oddzielonych przestrzenią peryplazmatyczną (Faulkner i Garduño, 2002). Peryplazma zawiera stosunkowo cienką warstwę wysoce usieciowanego peptydoglikanu i różnych białek. Peptydoglikan zbudowany jest z kwasu muraminowego, glukozaminy, kwasu glutaminowego, alaniny i kwasu mezodiaminopimelinowego w stosunku molowym 0,8:0,8:1,1:1,7:1 (Amano i Williams, 1983). W skład zewnętrznej warstwy błony zewnętrznej wchodzi cząsteczki lipopolisacharydu odpowiedzialne za wysoce uporządkowaną i półsztywną strukturę tej warstwy membrany, natomiast wewnętrzną warstwę błony OM budują głównie fosfolipidy. Błona IM zbudowana jest z glicerofosfolipidów, co zapewnia jej elastyczność i płynność. Strukturalna asymetria warunkuje przepuszczalność membrany, umożliwiającą Gram-ujemnym bakteriom przetrwanie w niesprzyjających warunkach (Di Lorenzo i in., 2021).

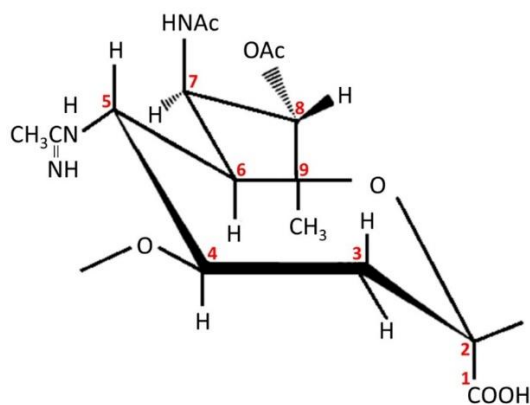
1.3. Struktura lipopolisacharydu *L. pneumophila*

LPS składa się z trzech biosyntetycznie i strukturalnie odmiennych części połączonych wiązaniami kowalencyjnymi: łańcucha O-specyficznego, rdzenia oligosacharydowego i lipidu A. Region lipidu A zakotwicza cząsteczki LPS w błonie zewnętrznej poprzez oddziaływanie hydrofobowe z acylowymi łańcuchami fosfolipidów stanowiącymi wewnętrzną warstwę tej błony (Caroff i Novikov, 2019). LPS *L. pneumophila* znacznie różni się od LPS innych Gram-ujemnych bakterii pod względem budowy chemicznej i biologicznego znaczenia poszczególnych jego regionów (Kowalczyk i in., 2021).

1.3.1. Część O-specyficzna

Łańcuch O-swoisty (antygen O, OPS) *L. pneumophila* szczep Philadelphia (sg 1) jest homopolimerem zbudowanym z podjednostek kwasu 5-acetamidyno-7-acetamido-8-*O*-acetylo-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galacto-nonulozonowego (kwas legionaminowy) i jego D-glicero-D-talo izomeru - kwasu 4-epilegionaminowego (4eLeg, *4-epilegionaminic acid*) (Tsvetkov i in., 2001). Po raz pierwszy scharakteryzowany u *L. pneumophila* kwas legionaminowy należy do grupy bakteryjnych cukrów nieulozonianowych (NulOs, *Nonulosonate sugars*), do których zalicza się kwasy 4-epilegionaminowy, 8-epilegionaminowy

(8eLeg, *8-epilegionaminic acid*), pseudoaminowy, acynetyaminowy i fuzaminowy (Kenyon i in., 2015; Knirel i in., 2003; Vinogradov i in., 2017). O-specyficzna część LPS *L. pneumophila* jest homopolimerem zbudowanym z 10 do 75 jednostek kwasu legionaminowego, które połączone są wiązaniem ketozydowym α (2 \rightarrow 4) (Knirel i in., 1994) (**Ryc. 1**). OPS *L. pneumophila* sg 1 i sg 7 jest unikalny w strukturze kwasu polilegionaminowego. Jest to spójne z wynikami badań serologicznych, które wskazały na brak obecności epitopów LPS *L. pneumophila* sg 1 i sg 7 reagujących krzyżowo, podczas gdy LPS wszystkich pozostałych serogrup posiada wspólne epitopy (Helbig i in., 1997). Najprawdopodobniej wspólne epitopy związane są z kwasem poli(4-epilegionaminowym), który jest drugorzędny komponentem OPS szczepów *L. pneumophila* sg 5 i sg 13 oraz głównym komponentem OPS wszystkich serogrup *L. pneumophila* z wyjątkiem sg 1 i sg 7. Serologiczna specyficzność szczepów reagujących krzyżowo prawdopodobnie związana jest z obecnością drobnych modyfikacji struktury LPS, np. w postaci pochodnych kwasu nieulozonowego (Knirel i in., 2001).



Ryc. 1 Struktura kwasu 5-acetamidyno-7-acetamido-8-O-acetylo-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowego (kwasu legionaminowego) stanowiącego monomer O-specyficznej części LPS *L. pneumophila* (na podstawie Tsvetkov i in., 2001).

Kwas legionaminowy jest związkami pozbawionym wolnych grup hydroksylowych. Grupa hydroksylowa przy węglu 8 (C8) jest acetylowana. Grupy aminowe w pozycji C5 i C7 są podstawione odpowiednio resztą acetamidynową i acetamidową, a atomy węgla w pozycji C3, C5, C7, C9 nie posiadają grup hydroksylowych. Jedyna grupa hydroksylowa w pozycji C4 jest zaangażowana w wiązanie między resztami cukrowymi. Brak wolnych grup hydroksylowych oraz obecność dwóch grup deoksy w pozycji C3 i C9 wpływa na

zwiększoną hydrofobowość części O-swoistej LPS. Powtarzające się hydrofobowe podjednostki budujące część O-swoistą są rzadko identyfikowane w lipopolisacharydach typu gładkiego (LPS-S), gdyż zazwyczaj są one zbudowane z 2 do 6 reszt cukrowych z licznymi wolnymi hydroksylowymi grupami (Knirel i in., 1982; Knirel i in., 1994).

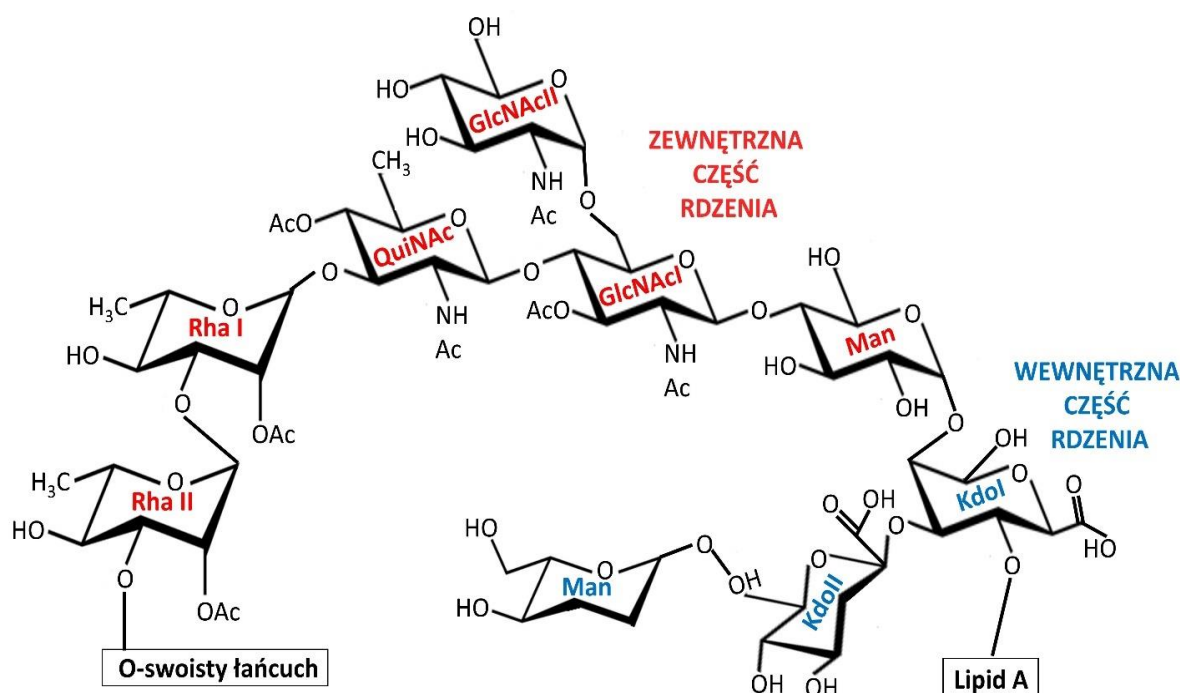
Grupa 5-*N*-acetamidylowa wchodząca w skład kwasu legionaminowego *L. pneumophila* sg 1 przyjmuje formę mono- lub di-*N*-metylowaną. Pochodna monometylowa występuje w postaci dwóch stereoizomerów (*E* i *Z*), natomiast pochodna dimetylowa jedynie w postaci stereoizomeru *E*, przypuszczalnie z powodu mniejszej zawady przestrzennej (sterycznej) (Kooistra i in., 2002).

L. pneumophila nie wytwarza LPS typu szorstkiego (LPS-R) pozbawionego części O-swoistej oraz LPS typu pośredniego (LPS-SR) zawierającego rdzeń podstawiony jedynie jedną podjednostką antygeny O (Knirel i in., 1996(a)). Monomery kwasu legionaminowego o konfiguracji *D*-glicero-*D*-galakto wchodzące w skład O-specyficznej części LPS *L. pneumophila* szczep Philadelphia (sg 1) zidentyfikowano także jako cukrowe komponenty antygeny O *Pseudomonas fluorescens* (Knirel i in., 1995), *Acitenobacter baumannii* (Haseley i in., 1997), *Vibrio alginolyticus* (Nazarenko i in., 1990) i *V. salmonicida* (Edebrink i in., 1996), różniące się jedynie grupami *N*-acylowymi. Kwas legionaminowy o konfiguracji *L*-glicero-*D*-galakto (kwas 8-epilegionaminowy) wykryto u *P. aeruginosa* (Knirel i in., 1987), *Salmonella arizonae* (Vinogradov i in., 1992) i *Yersinia ruckerii* (Beynon i in., 1994).

1.3.2. Rdzeń oligosacharydowy

W obrębie rdzenia oligosacharydowego wyróżnia się część zewnętrzną oraz wewnętrzną. Część zewnętrzna rdzenia jest siedmiocukrowym oligosacharydem składającym się z ramnozy (Rha), mannozy (Man), acetylochinoxaminy (QuiNAc) oraz *N*-acetyloglukozaminy (2-acetamido-2-deoksy-*D*-glukopiranoza, GlcNAc) w stosunku molowym 2,1:1,1:1:1,4 (Knirel i in., 1996(a)). Zewnętrzna część rdzenia, podobnie jak część O-swoista, wykazuje charakter hydrofobowy, który determinują grupy *N*-acetylowe aminocukrów (QuiNAc i GlcNAc) oraz grupy metylowe 6-deoksycukrów (Rha i QuiNAc). Podstawienie grupy hydroksylowej przy C2 ramnozy, przy C4 acetylochinoxaminy oraz przy C3 acetyloglukozaminy resztą octanową dodatkowo zwiększa charakter hydrofobowy zewnętrznej części rdzenia (Helbig i in., 1995; Knirel i in., 1996(a)). Rdzeń wewnętrzny złożony jest z dwóch cząsteczek kwasu 3-deoksy-*D*-manno-2-oktulozonowego (Kdo), połączonych wią-

zaniem ketozydowym 2→4 o następującej strukturze: α -Kdo-(2 α 4)- α -Kdo-(2 α 6). Atom węgla w pozycji C8 cząsteczki Kdo wiąże się z cząsteczką D-mannozy w rozgałęzieniu rdzenia wewnętrznego za pomocą wiązania glikozydowego (Moll i in., 1997). Cechą wyróżniającą część wewnętrzną rdzenia polisacharydowego *L. pneumophila* jest brak heptoz oraz grup fosforanowych, a także występowanie dwusacharydowego rozgałęzienia w postaci kwasu α -D-mannopiranozyl-(1→8)-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (α -D-Manp-(1→8)-Kdo) (Ryc. 2) (Moll i in., 1997).

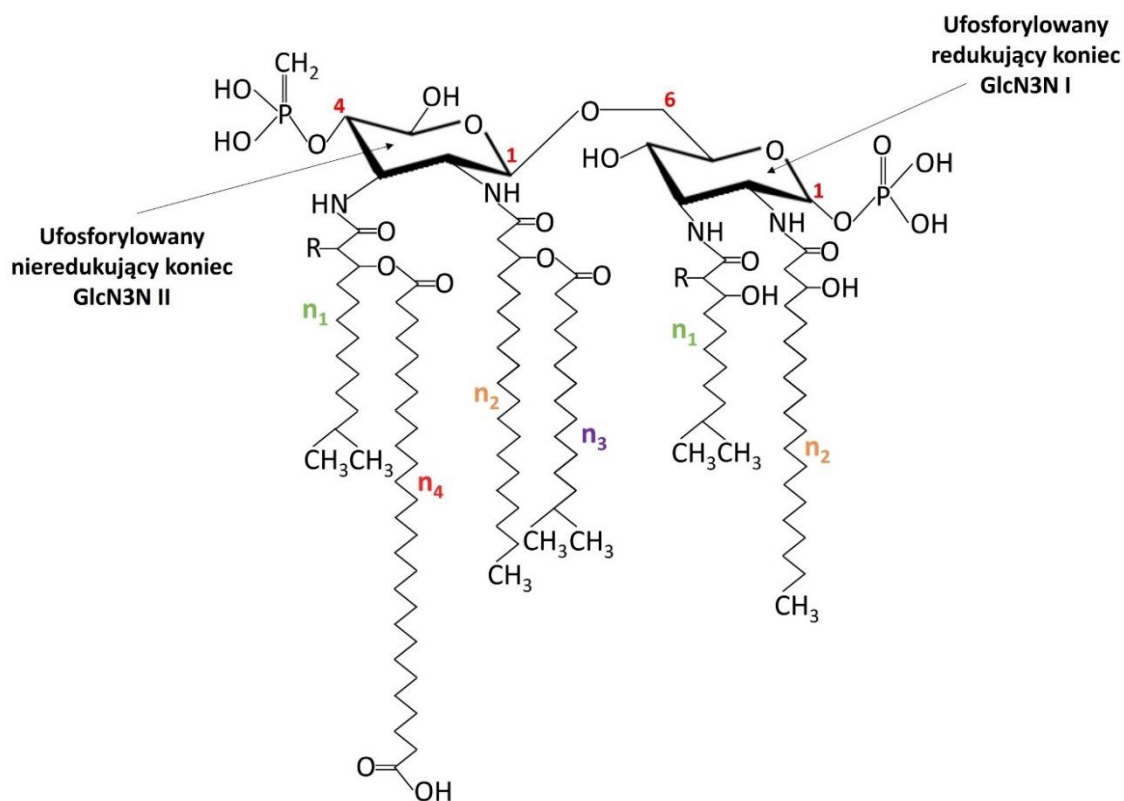


Ryc. 2 Struktura rdzenia oligosacharydowego LPS *L. pneumophila* sg 1 (na podstawie Kni-rel i in., 1996(a); Moll i in., 1997).

1.3.3. Lipid A

Lipid A łączy się z rdzeniem wewnętrznym polisacharydu poprzez wiązanie ketozydowe między C2 cząsteczki Kdo a C6 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukopiranozy (GlcN3N) końca nieredukującego (Sonesson i in., 1989). Lipid A *L. pneumophila* sg 1 zbudowany jest z ufosforylowanego disacharydu 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukopiranozy połączonego wiązaniem 1,6 glikozydowym [GlcN3N(1→6)GlcN3N]_n. Jedna reszta fos-

foranowa przyłączona jest za pomocą wiązania glikozydowego do C1 GlcN3N końca redukującego, natomiast druga reszta fosforanowa dołączona jest wiązaniem estrowym do C4 GlcN3N końca nieredukującego (**Ryc. 3**) (Sonesson i in., 1989).



n_1 – 3-OH-*n*14:0, 3-OH-*i*14:0, 2,3-di-OH-*n*14:0

n_2 – od 3-OH C12 do 3-OH C23 (*n, i, a*)

n_3 – od C15 do C21 (*n, i, a*)

n_4 – 27-OH-*n*28:0, 27-okso-*n*28:0, 29:OH-*n*30:0, 29-okso-*n*30:0, *n*27:0-diowy,

*n*29:0-diowy, 2-OH-27-okso-*n*28:0, 2-OH-29-okso-*n*30:0, 2-OH-*n*27:0-diowy, 2-OH-*n*29:0-diowy

Ryc. 3 Struktura lipidu *A. L. pneumophila* (na podstawie Sonesson i in., 1989).

Podjednostki GlcN3N w szkielecie cukrowym połączone są wyłącznie wiązaniami amidowymi z 3-hydroksykwasami, których grupy hydroksylowe ulegają acylacji poprzez proste lub rozgałęzione kwasy tłuszczowe (*izo* lub *anteizo*), cykliczny kwas *cis*-9,10-metylenoheksadekanowy (cyklopropanowy 17:0) oraz rzadko występujące w przyrodzie długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (Zähringer i in., 1995). Długość reszt acylowych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidu *A. L. pneumophila* dwukrotnie przekracza 14 ato-

mów węgla co znacznie zwiększa rozmiar cząsteczki LPS. U większości bakterii jeden rodzaj kwasu tłuszczowego (najczęściej kwas 3-hydroksymirystynowy) zajmuje wszystkie dostępne miejsca przyłączenia w szkielecie cukrowym. Natomiast w szkielecie cukrowym lipidu A *L. pneumophila* znajdują się 4 możliwe miejsca bezpośredniego przyłączenia hydroksykwasów, dlatego na jedno miejsce wiązania przypada średnio pięć możliwych rodzajów kwasów tłuszczowych. W lipidzie A *L. pneumophila* sg 1 występuje 8 niehydroksylowanych kwasów tłuszczowych zawierających od 14 do 20 atomów węgla w cząsteczce, 19 różnych 3-hydroksykwasów z łańcuchami zawierającymi od 12 do 23 atomów węgla, 2,3-dihydroksykwasy (kwas 2,3-dihydroksy-12-metylotridekanowy i 2,3-dihydroksytetradekanowy), a także 5 długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Moll i in., 1992; Sonesson i in., 1989).

Profile hydroksykwasów tłuszczowych są charakterystyczne dla poszczególnych gatunków z rodzaju *Legionella* i stanowią kryterium wykorzystywane w taksonomii tej grupy bakterii. Na podstawie względnej zawartości 29 zidentyfikowanych 3-hydroksykwasów tłuszczowych wchodzących w skład LPS 76 szczepów reprezentujących 29 gatunków z rodziny *Legionellaceae*, bakterie te podzielono na 4 grupy (**Tabela 1**). *L. pneumophila* należy do grupy I, w której dominującymi hydroksykwasami są: 3-OH-*i*14:0, 3-OH-*n*20:0 i 2,3-di-OH-*i*14:0 (Jantzen i in., 1993).

Tabela 1 Podział bakterii *Legionella* spp. ze względu na względną zawartość [%] hydroksykwasów tłuszczowych („-” nie wykryto; „tr” ilość śladowa <0,5%) (na podstawie Jantzen i in., 1993).

Hydroksykwas tłuszczowy	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
3-OH- <i>n</i> 12:0	-	-	0-0,5	0-4
3-OH- <i>n</i> 13:0	0-1	0-1	0-1	0,5-4
2,3-di-OH- <i>i</i> 14:0	5-14	2-11	-	-
3-OH- <i>i</i> 14:0	14-34	14-25	tr-2	5-41
2,3-di-OH- <i>n</i> 14:0	0,5-2	0-3	-	-
3-OH- <i>n</i> 14:0	0,5-3	2-16	6-20	2-12
2,3-di-OH- <i>a</i> 15:0	tr-3	3-9	-	-
3-OH- <i>i</i> 15:0	-	-	-	0-1
3-OH- <i>a</i> 15:0	1-5	1-13	1-14	2-38
3-OH- <i>n</i> 15:0	-	0-2	4-15	0-2

3-OH-<i>i</i>16:0	tr-3	0-2	4-30	0-2
3-OH-<i>n</i>16:0	tr-1	tr	4-15	0-4
3-OH-<i>i</i>17:0	tr-6	0-1	0-11	0-2
3-OH-<i>a</i>17:0	0-3	0-1	1-13	0-4
3-OH-<i>n</i>17:0	tr-7	-	0-6	0-2
3-OH-<i>i</i>18:0	tr-3	0-3	0-4	0-6
3-OH-<i>n</i>18:0	1-8	tr-2	6-5	1-13
3-OH-<i>i</i>19:0	tr-2	0-2	0-1	0-2
3-OH-<i>a</i>19:0	0,5-6	0-2	0-10	0-10
3-OH-<i>n</i>19:0	1-4	0-4	1-8	0,5-7
3-OH-<i>i</i>20:0	0,5-5	tr-2	0-1	0-6
3-OH-<i>n</i>20:0	6-20	7-12	1-15	7-28
3-OH-<i>i</i>21:0	tr-1	0-1	0-1	0-2
3-OH-<i>a</i>21:0	1-4	3-10	-	1-10
3-OH-<i>n</i>21:0	2-6	4-16	0-5	1-11
3-OH-<i>i</i>22:0	tr-6	1-4	0-0,5	0-4
3-OH-<i>n</i>22:0	1-4	5-12	0-0,5	0-11
3-OH-<i>a</i>23:0	tr-2	4-11	-	0-3
3-OH-<i>n</i>23:0	-	0-1	-	0-0,5

Grupa I *L. pneumophila*, *L. israelensis*

Grupa II *L. micdadei*, *L. maceachernii*

Grupa III *L. anisa*, *L. bozemanai*, *L. cherrii*, *L. cincinnatiensis*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*,
L. gratiana, *L. longbeachae*, *L. parisiensis*, *L. sainthelensi*, *L. steigerwaltii*,
L. tucsonensis, *L. wadsworthii*, *L. birminghamensis*

Grupa IV *L. brunensis*, *L. erythra*, *L. feeleei*, *L. hackeliae*, *L. jamestowniensis*, *L. jordanis*,
L. moravica, *L. oakridgensis*, *L. quinlivanii*, *L. rubrilucens*, *L. spiritensis*

Grupy hydroksylowe 3-hydroksykwasów przyłączone do disacharydowego rdzenia lipidu A *L. pneumophila* są jedynym miejscem wiązania niehydroksylowanych kwasów oraz długołańcuchowych (ω)-okso, (ω)-hydroksy i (ω)-diowych kwasów tłuszczowych za pomocą wiązania estrowego. W przypadku grup hydroksylowych kwasu 3-hydroksymirystynowego, 3-hydroksyizomirystynowego lub 2,3-dihydroksymirystynowego są one podstawione w pozycji 3' grupami acylowymi kwasu izopalmitynowego (*i*16:0), kwasu 27-okso-oktakozanowego [28:0(27-okso)] lub heptakozano-1,27-diowego [n27:0-diowy] (Sonesson i in., 1989).

Dominującymi długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi lipidu A *L. pneumophila* są kwasy 27-oksooktakożanowy i heptakożano-1,27-diowy. Do pozostałych kwasów długołańcuchowych należą kwas 29-okso-triakontanowy [30:0(29-okso)], kwas nonakożano-1,29-diowy (29:0-diowy) oraz 27-hydroksyoktakożanowy [28:0(27-OH)] (Moll i in., 1992; Zähringer i in., 1995).

1.4. Biosynteza LPS na przykładzie *Escherichia coli*

Biogeneza LPS jest złożonym procesem obejmującym kilka niezależnych szlaków, które występują w odrębnych częściach komórki. Proces biosyntezy LPS wymaga przestrzennej i czasowej koordynacji szlaków umożliwiających syntezę różnych regionów cząsteczki w obrębie membrany IM, translokację przez IM oraz przestrzeń peryplazmatyczną, a także docelową inkorporację glikolipidu w zewnętrzną warstwę OM.

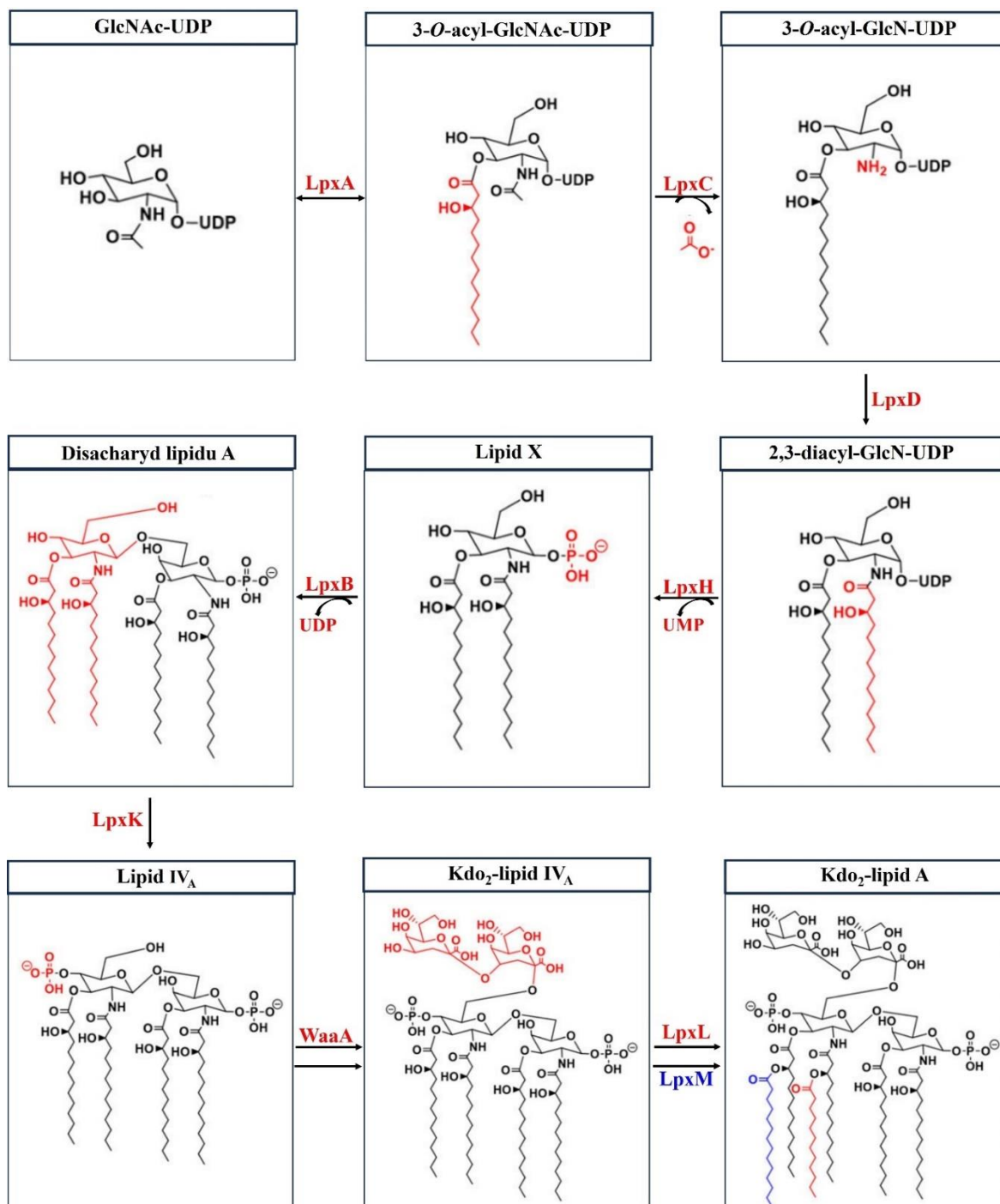
Pierwszy etap biosyntezy LPS obejmuje syntezę lipidu A i oligosacharydowego rdzenia cząsteczki i zachodzi w wewnętrznej warstwie IM. Zsyntetyzowane komponenty podlegają wstępnej translokacji przez błonę IM za pomocą białka MsbA (Raetz i in., 2007). Białko MsbA jest rodzajem transportera zawierającego kasetę wiążącą ATP (ABC, *ATP-Binding Cassette*). Białko to przyjmuje homodimeryczną strukturę, w której każda z podjednostek zbudowana jest z domeny wiążącej nukleotyd (NBD, *Nucleotide-Binding Domain*) oraz domeny transbłonowej (TMD, *Transmembrane Domain*) zawierającej sześć transmembranych helis. LPS podlega dynamicznym interakcjom z białkiem MsbA. Cząsteczka LPS wiąże się z dwiema domenami TMD dzięki silnym oddziaływaniom elektrostatycznym między ujemnie naładowanym fosforylowanym disacharydem w cząsteczce LPS, a dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi obu pierścieniowych podjednostek MsbA. Acylowane łańcuchy kwasów tłuszczowych LPS mieszczą się w dużej hydrofobowej wnęce białka MsbA. Domeny TMD poprzez wiązanie i hydrolizę ATP, dostarczają energię do transportu rdzeniowej części LPS z lipidem A przez błonę IM (Sperandeo i in., 2017). Transport cząsteczki LPS bez jej rotacji w obrębie błony IM, według tzw. modelu „chwycić i przerzucić” (*trap-and-flip*) rozpoczyna się od przemieszczenia cząsteczki LPS do hydrofobowej wnęki białka MsbA, co umożliwia przyłączenie i hydrolizę ATP (Thélot i in., 2020). Oddziaływanie cząsteczki LPS z transporterem MsbA oraz hydroliza ATP inicjują zmiany konformacyjne białka MsbA, które prowadzą do uwolnienia oligosacharydowego rdzenia połączonego z lipidem A do przestrzeni peryplazmatycznej (Mi i in., 2017). Podjednostki anty-

geny O są syntetyzowane w cytoplazmie, a następnie przenoszone na peryplazmatyczną powierzchnię IM przyłączone do difosforanu undekaprenylu (Und-PP) za pośrednictwem fli-pazy Wzx, aktywowanej obecnością protonów (H^+) (Islam i in., 2013).

Drugi etap syntezy prowadzi do powstania dojrzałej formy cząsteczki LPS. Utworzenie ostatecznej formy LPS zachodzi przy peryplazmatycznej stronie IM, gdzie podjednostki antygeny O są polimeryzowane, a następnie łączone z rdzeniem lipidu A przez ligazę WaaL. Cała makrocząsteczka przenoszona jest przez białkowy kompleks transportujący LPS (Lpt, *Lipopolysaccharide transport*) (Greenfield i Whitfield, 2012). Szybkość przenoszenia cząsteczek LPS *E. coli* przez peryplazmę podczas wykładniczej fazy wzrostu wynosi około 70 000 cząsteczek na minutę (Lima i in., 2013). Dwuetapowa strategia syntezy LPS umożliwia przebieg termodynamicznych procesów, np. odłączenie cząsteczki LPS od warstwy IM i transport na powierzchnię komórki, a także zapewnia zachowanie ciągłości membrany w czasie translokacji cząsteczek LPS przez OM (Sperandeo i in., 2017). Kompleks transportujący Lpt, najdokładniej opisany u *N. meningitidis* i *E. coli*, składa się z 7 różnych białek (LptB, -F, -G, -C, -A, -D, -E) tworzących wewnętrzny kompleks błonowy. W skład tego kompleksu w obrębie błony IM wchodzi składnik transportera LptB2CFG zawierający kasetę wiążącą ATP (ABC) oraz kompleks LptDE wbudowany do błony OM. Obie części kompleksu LPT są łączone przez jedną lub więcej kopii białka peryplazmatycznego LptA. Kompleks LptB2CFG za pośrednictwem kasety ABC na drodze wiązania i hydrolizy ATP umożliwia uwolnienie lipopolisacharydu z błony IM. Domeny transbłonowe LptF i LptG tworzą wnękę przez którą przemieszcza się cząsteczka LPS, natomiast kompleks LptDE odpowiedzialny jest za wbudowywanie LPS w membranę OM (Sperandeo i in., 2017; Wilson i Ruiz, 2021). Wyczerpanie komponentów systemu Lpt, prowadzi do akumulacji LPS w obrębie błony IM. Stres środowiskowy może wpływać na funkcjonowanie i integralność systemu Lpt, prowadząc do peryplazmatycznej akumulacji LPS (Tang i in., 2019).

1.4.1. Biosynteza Kdo₂-lipid A LPS *E. coli*

Biosynteza ugrupowania oligosacharydowego rdzenia połączonego z lipidem A zachodzi według tzw. „szlaku Raetza”, który angażuje aktywność kilku enzymów prowadzących do powstania kluczowego prekursora lipidu A, lipidu IV_A (Raetz i in., 2007) (**Ryc. 4**).



Ryc. 4 Szlak biosyntezy lipidu A *E. coli* (na podstawie Bertani i Ruiz, 2018).

Szlak rozpoczyna się w cytoplazmie komórki bakteryjnej od acylacji prekursora *N*-acetyloglukozaminy połączonej z nośnikiem nukleotydów (UDP-GlcNAc). W reakcji uczestniczy acylotransferaza LpxA, która przenosi resztę kwasu β -hydroksymirystynowego w miejsce grupy hydroksylowej przy trzecim atomie węgla cząsteczki UDP-GlcNAc z wykorzystaniem białka nośnikowego, będącego donorem grup acylowych (ACP, *Acyl Carrier Protein*), w wyniku czego powstaje UDP-3-*O*-(acyl)-acyloglukozamina (Coleman i Raetz,

1988). Pierwszy etap acylacji jest niekorzystny energetycznie dlatego dochodzi do nieodwracalnej deacetylacji. Drugi etap biosyntezy lipidu A katalizowany jest przez metaloamidazę zależną od jonów cynku LpxC (Jackman i in., 1999). LpxC odpowiada za de-*N*-acetylację UDP-3-*O*-(acyl)-acyloglukozaminy, w wyniku której uwolniona zostaje UDP-*N*-acetylloglukozamina. Następnie *N*-acylotransferaza LpxD katalizuje kolejną reakcję acylacji UDP-GlcNAc prowadzącą do powstania drugiej cząsteczki UDP-3-*O*-(acyl)-acyloglukozaminy. Enzym LpxD wykazuje znaczną homologię sekwencji do LpxA i podobnie jak LpxA, wykorzystuje tioestry ACP w roli donora grup acylowych. Następnie enzym LpxH katalizuje rozszczepienie wiązania pirofosforanowego, w wyniku czego powstają dwa nowe związki: monofosforan urydyny (UMP) i 2,3-diacylloglukozamino-1-fosforan, definiowany jako lipid X (Raetz i in., 2002). Tworzenie wiązania $\beta(1-6)$ -glikozydowego obecnego we wszystkich cząsteczkach lipidu A jest katalizowane przez syntetazę - LpxB. Enzym LpxB odpowiada za kondensację jednej cząsteczki UDP-2,3-diacylloglukozaminy (produkt reakcji enzymu LpxD) z jedną cząsteczką lipidu X, prowadzącą do powstania wiązania $\beta(1-6)$ -glikozydowego oraz uwolnienia difosforanu urydyny. Otrzymany produkt jest tetraacylowanym disacharydem glukozaminy, który jest wbudowywany do wewnętrznej warstwy błony IM (Radika i Raetz, 1988). Enzymy zaangażowane w biosyntezę disacharydowego szkieletu lipidu A występują w cytozolu, natomiast enzymy zaangażowane w kolejne etapy syntezy (LpxK, WaaA, LpxL i LpxM) związane są z błoną OM i do swojej aktywności wymagają obecności cytozolowych czynników. Po etapie kondensacji disacharyd lipidu A ulega fosforylacji przy udziale specyficznej kinazy LpxK katalizującej fosforylację grupy 4'-hydroksylowej, która prowadzi do syntezy kluczowego prekursora lipidu A – bisfosforylowanego lipidu IV_A (Garrett i in., 1997).

Następnie enzym WaaA (KdtA) odpowiada za przyłączenie dwóch cząsteczek kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulopiranozonowego (Kdo) do lipidu IV_A wykorzystując aktywowaną formę Kdo (CMP-Kdo) (Clementz i Raetz, 1991). Synteza Kdo zachodzi przy udziale czterech sekwencyjnie działających enzymów: 1) izomerazy 5-fosforanu D-arabinozy (API, *D-Arabinose 5-Phosphate Isomerase*), 2) syntazy 8-fosforanu deoksy-D-manno-oktulozonianu (Kdo 8-P, *deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase*), 3) fosfatazy Kdo 8-P i 4) syntetazy cytydyny 5'-monofosforanu-Kdo (Raetz, 1990). Pierwszy etap syntezy Kdo katalizowany jest przez syntazę Kdo 8-P, która kondensuje 5-fosforan D-arabinozy (A5P) z fosfoenolpirogrońianem (PEP) poprzez stereospecyficzną kondensację typu aldolowego (Radaev i in., 2000). Produktem reakcji jest kwas 3-deoksy-D-manno-oktulozono-8-fosforan (Kdo8P) - prekursor Kdo i nieorganiczny fosforan. Izomeraza API syntetyzuje A5P

przez katalizowanie odwracalnej izomeryzacji aldolowo-ketonowej 5-fosforanu D-rybulozy (Ru5P) do A5P (Meredith i Woodard, 2003). Enzym API uważany jest za główne źródło *de novo* A5P u Gram-ujemnych bakterii, gdyż związek ten nie jest łatwo dostępny jako produkt glikolizy. W ostatnim etapie syntezy cząsteczki Kdo, fosfataza Kdo 8-P odłącza resztę fosforanową od Kdo-8-fosforanu, co prowadzi do utworzenia kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego. W reakcji katalizowanej przez syntetazę cytydyny 5'-monofosforanu-Kdo następuje przyłączenie nośnika reszt Kdo - białka CMP, do kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Meredith i Woodard, 2003).

W końcowym etapie syntezy lipidu A występują dwie dodatkowe reakcje acylacji, katalizowane przez drugorzędowe acylotransferazy LpxL (HtrB) i LpxM (MsbB), które odpowiedzialne są za przyłączenie kwasów tłuszczowych do ugrupowania Kdo₂-lipid A. LpxL wstawia resztę kwasu laurynowego w miejsce grupy hydroksylowej kwasu β -hydroksymirystynowego, przyłączonej w pozycji 2' do cząsteczki lipidu IV_A. W przypadku obniżenia temperatury otoczenia do 12°C etap inkorporacji kwasu β -hydroksymirystynowego ulega zastąpieniu w około 80% przez wbudowanie reszt kwasu palmitooleinowego, który katalizowany jest przez palmitooleinową acylotransferazę LpxP (Carty i in., 1999). Następnie, LpxM przenosi resztę kwasu mirystynowego do grupy hydroksylowej kwasu tłuszczowego przy C3' pentaacylowanego lipidu IV_A. Podobnie jak acylotransferazy (LpxA i LpxD), drugorzędowe acylotransferazy LpxL i LpxM, LpxA i LpxD wykorzystują wyłącznie substraty przenoszone przez donor ACP, jednak nie wykazują one ze sobą żadnej homologii. Po następujących po sobie dwóch dodatkowych reakcjach acylacji katalizowanych przez LpxL i LpxM, dojrzały, heksaacylowany lipid A, który zawiera również dwie reszty Kdo wewnętrznego rdzenia cukrowego, jest aktywnym akceptorem grup cukrowych budujących oligosacharydowy rdzeń cząsteczki LPS (Clementz in., 1997).

1.4.2. Biosynteza oligosacharydowego rdzenia LPS *E. coli*

Oligosacharydowy rdzeń LPS można podzielić na region wewnętrzny (proksymalny), który znajduje się w pobliżu lipidu A oraz region zewnętrzny, stanowiący miejsce przyłączenia antygeny O. Wewnętrzna część rdzenia ma konserwatywny charakter i składa się z cukrowych grup Kdo i L-glicero-D-manno-heptozy. Komponenty zewnętrznego rdzenia są mniej konserwatywne i generalnie obejmują szereg heksoz, jednak poszczególne etapy jego syntezy mają odmienny przebieg u poszczególnych szczepów *E. coli*. Opisane szlaki

syntezy wewnętrznego i zewnętrznego regionu oligosacharydowego rdzenia dotyczą *E. coli* szczepu K-12 (Bertani i Ruiz, 2018).

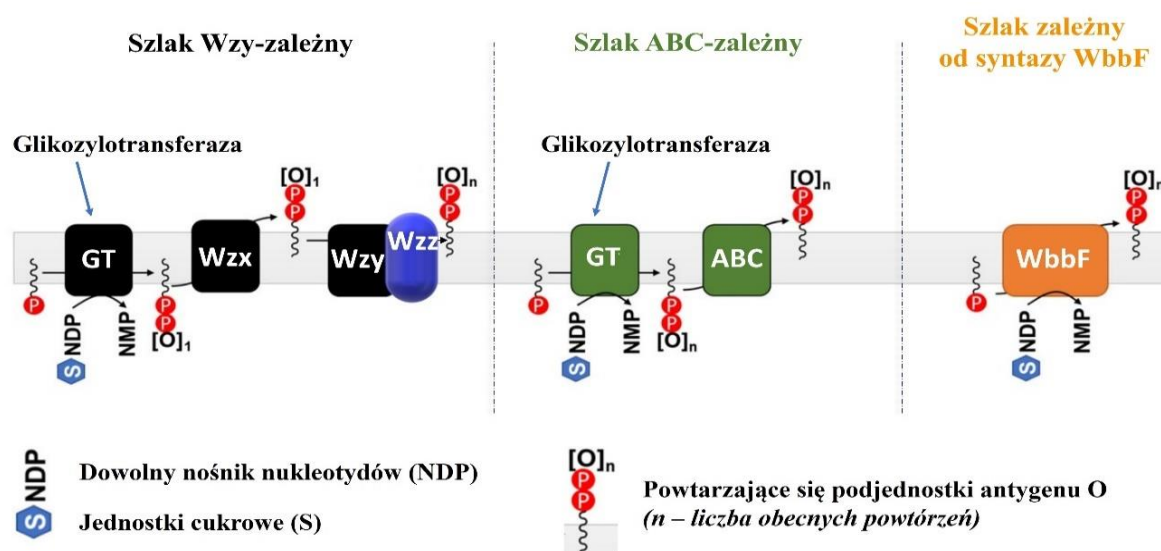
Pierwszym etapem syntezy oligosacharydowego rdzenia jest dołączenie dwóch cząsteczek Kdo do lipidu A przy udziale enzymu WaaA. Proces ten zachodzi przed końcowymi reakcjami acylacji, które finalizują syntezę ugrupowania Kdo₂-lipid A. Do wewnętrznej części rdzenia dołączane są dwie reszty heptoz przy udziale heptozylotransferaz: WaaC i WaaF. Preferowaną formą substratów wykorzystywanych do reakcji glikozylacji katalizowanych przez WaaC i WaaF są ADP-heptozy w konfiguracji *L-glicero-D-manno-* (Whitfield i in., 2003). Następnie dochodzi do 3-etapowej modyfikacji wewnętrznej części rdzenia, katalizowanej przez enzymy działające w ściśle określonej kolejności: WaaP, WaaQ i WaaY (Yethon i in., 1998). Kinaza WaaP fosforyluje pierwszą heptozę (I) wewnętrznego rdzenia, która została wcześniej inkorporowana przez WaaC (Yethon i Whitfield, 2001). Transferaza WaaQ przyłącza następnie dodatkową heptozę (III) do drugiej heptozy (II) wewnętrznego rdzenia, która została przyłączona przez WaaF. Heptoz (III) jest następnie fosforylowana przez kinazę WaaY (Yethon i in., 1998). Brak enzymów odpowiedzialnych za fosforylację wewnętrznej części rdzenia hamuje wydłużanie jego zewnętrznej części, natomiast brak enzymów, które wydłużają zewnętrzną część rdzenia, hamuje fosforylację jego wewnętrznego regionu (Yethon i in., 2000).

Synteza zewnętrznego rdzenia oligosacharydowego rozpoczyna się od przyłączenia glukozy do drugiej cząsteczki heptozy (II) za pośrednictwem WaaG (i jego homologów), który wykorzystuje UDP-glukozę jako substrat donorowy. Wbudowywana cząsteczka glukozy podlega działaniu glikozylotransferaz WaaO i WaaB, które niezależnie dołączają odpowiednio grupę glukozową i galaktozową związaną z donorem UDP (UDP-Glu i UDP-Gal) (Whitfield i in., 2003; Qian i in., 2014). Następnie przedostatnia reszta glukozy jest dołączana przez enzym WaaJ (alternatywnie znany jako WaaR), którego aktywność zależy od aktywności glikozylotransferazy WaaB (Whitfield i in., 2003; Pradel i in., 1992). Ostatni etap syntezy rdzenia, czyli dołączenie heptozy do przedostatniej glukozy, odbywa się za pośrednictwem glikozylotransferazy WaaU (Heinrichs i in., 1998; Whitfield i in., 2003). Po translokacji rdzenia oligosacharydowego z lipidem A do zewnętrznej warstwy błony IM dzięki transporterowi MsbA, dystalna cząsteczka heptozy służy jako akceptor antygeny O. Badania strukturalne ugrupowania MsbA-oligosacharydowego rdzenia-lipidu A wykazały, że MsbA rozpoznaje dwuwartościową grupę fosfoglukozaminy i prawidłową heksaacylację

lipidu A, pełniąc tym samym nie tylko rolę transportera, ale także funkcję punktu kontrolnego zapobiegającego transportowi wczesnych półproduktów biogenezy LPS (Di Lorenzo i in., 2021).

1.4.3. Biosynteza antygeny O LPS *E. coli*

Region antygeny O jest w pełni syntetyzowany niezależnie od pozostałych części makromolekuły LPS. Część antygeny O na wstępnych etapach syntezy jest stopniowo budowana na lipidowym nośniku – cząsteczce fosforanu undekaprenyłu (Und-P), a następnie przenoszona do oligosacharydowego rdzenia powstającej cząsteczki LPS znajdującej się przy peryplazmatycznej warstwie błony IM (Whitfield, 2006). Pomimo dużej heterogenności antygeny O, pierwszy etap jego syntezy wykazuje wysoką konserwatywność i polega na przeniesieniu cukrowego monofosforanu na cząsteczkę nośnika Und-P przy wewnętrznej warstwie błony IM. Powstały cukier-pirofosforan undekaprenyłu (cukier-Und-PP) służy jako akceptor dodatkowych reszt cukrowych przyłączanych w reakcji glikozylacji. Szlaki odpowiedzialne za dalsze modyfikacje antygeny O są zróżnicowane wśród gatunków mikroorganizmów, a nawet szczepów. Procesy modyfikacyjne regionu O-swoistego dzielą się na trzy kategorie: 1) szlak Wzy-zależny (*Wzy-dependent pathway*) 2) szlak ABC-zależny, który opiera się na kasecie wiążącej ATP (ABC), stanowiącej transporter do translokacji kompletnego antygeny O przez membranę IM 3) oraz szlak zależny od syntazy WbbF, który jest słabo scharakteryzowany i został zidentyfikowany jedynie u *Salmonella enterica* serowar Borreze (rfbO:54) (Kałynych i in., 2014) (**Ryc. 5**).



Ryc. 5 Szlaki syntezy antygeny O LPS (na podstawie Bertani i Ruiz, 2018).

Szlak Wzy-zależny obejmuje syntezę pojedynczych podjednostek antygeny O na Und-P, co wymaga inicjacji dla każdej podjednostki antygeny O, a następnie translokację ugrupowania Und-P-antygen O z cytoplazmatycznej do peryplazmatycznej powierzchni błony IM przez flipazę Wzx (Feldman i in., 1999). Podjednostki te są następnie polimeryzowane na pojedynczej cząsteczce nośnika Und-P za pomocą polimerazy Wzy, a długość powstającego polimeru kontrolowana jest przez partnerskie białko Wzz (Nath i Morona, 2015(a); Nath i Morona, 2015(b)). Badania strukturalne z wykorzystaniem mikroskopii krioелектrowej ujawniły nowy model kontrolowania długości polimeru za pośrednictwem białka Wzz poprzez synergiczną interakcję z polimerazą Wzy (Collins i in., 2017). Model ten sugeruje, że zależność między Wzz i Wzy służy jako rodzaj czynnika wyzwalającego polimeryzację, przy czym długość polimeru jest kontrolowana zarówno przez mechanizm „molekularnej linijki” oparty na zdolności wiązania polisacharydów o określonej wielkości przez Wzz oraz mechanizm „molekularnego stopera” bazujący na czasie interakcji między Wzz i Wzy. W pełni spolimeryzowany łańcuch antygeny O ulega ligacji ze wstępnie uformowaną strukturą oligosacharydowego rdzenia połączonego z lipidem A w zewnętrznej warstwie IM przez ligazę WaaL, a nośnik Und-PP jest uwalniany i podlega ponownemu wykorzystaniu. Strategia tworzenia antygeny O obejmująca inicjowanie syntezy każdej pojedynczej podjednostki na cząsteczce Und-P zależy od puli nośników Und-P (Raetz i Whitfield, 2002). Przerwanie syntezy antygeny O na pewnych etapach biosyntetycznego szlaku może prowadzić do sekwestracji Und-P przez prekursorzy antygeny O. Może to skutkować poważnymi defektami wzrostu, ponieważ Und-P działa w syntezie kilku glikopolimerów okrywy komórkowej, w tym niezbędnego komponentu ściany komórkowej - peptydoglikanu (Jorgenson i in., 2016(a); Jorgenson i Young, 2016(b)).

W przeciwieństwie do szlaku Wzy-zależnego, szlak ABC-zależny wymaga jedynie pojedynczych zdarzeń inicjujących, które przypadają na cząsteczkę spolimeryzowanego antygeny O. Cały proces polimeryzacji O-swoistego łańcucha przebiega w cytoplazmie (Raetz i Whitfield, 2002). Glikozylotransferazy początkowo polimeryzują antygen O na pojedynczej cząsteczce nośnika Und-P w wewnętrznej warstwie IM z wykorzystaniem donorów cukrów aktywowanych nukleotydami. Całkowicie spolimeryzowana cząsteczka antygen O-Und-PP jest następnie przenoszona do peryplazmatycznej powierzchni IM przez transporter ABC, gdzie część antygeny O jest dołączana do ugrupowania oligosacharydowego rdzenia z lipidem A przez ligazę WaaL (Kalynych i in., 2014).

W szlaku syntezy antygeny O zależnym od syntazy WbbF, białko WbbF odpowiada za jednoczesną polimeryzację i translokację antygeny O przez błonę IM. Podobnie jak w pozostałych dwóch szlakach biosyntezy, powstała cząsteczka antygen O-Und-PP jest następnie wykorzystywana jako donator przez ligazę WaaL, która przenosi spolimeryzowaną część O-swoistego łańcucha do oligosacharydu zewnętrznego rdzenia, powstających cząsteczek LPS i uwalnia nośnik lipidowy (Kałynych i in., 2014; Keenleyside i Whitfield, 1996).

1.5. Genetyczne podstawy biosyntezy LPS *L. pneumophila*

Geny zaangażowane w proces biosyntezy lipidu A są rozproszone w obrębie całego bakteryjnego chromosomu, natomiast geny uczestniczące w syntezie zewnętrznej części oligosacharydowego rdzenia oraz O-specyficznej części LPS *L. pneumophila* zorganizowane są w klastry (Lüneberg i in., 2000).

1.5.1. Biosynteza lipidu A LPS *L. pneumophila*

W genomie *L. pneumophila* szczepów Philadelphia-1, Paris i Lens występują pojedyncze ortologi genów *E. coli* niezbędnych do syntezy lipidu A opartego na GlcNAc [*lpxA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-H*, *-K*, *-L* i *waaA* (KdtA)], w tym kilka paralogów transferaz acylowych (*lpxA*, *lpxD* i *lpxL*), a także dwa paralogi syntazy disacharydowej lipidu A - *lpxB*. Ponadto obecne są również ortologi genów *gnaA* i *gnaB* występujących u *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Geny te kodują odpowiednio oksydazę zależną od NAD⁺ i transaminazę zależną od fosforanu pirydoksalu, które przekształcają UDP-GlcNAc w 3-aminową pochodną UDP-GlcNAc3N (UDP-2-acetamido-3-amino-2,3-dideoksy-D-glukopiranoza) (Sweet i in., 2004; Albers i in., 2007).

Paralogi *lpxB* znajdują się w genomie *L. pneumophila* w sąsiedztwie innych genów biosyntezy lipidu A. Gen *lcsC/lpxB1* (lpg1371) znajduje się bezpośrednio poniżej genu *gnaA* (lpg1372) i przypuszczalnie koduje pierwszy enzym szlaku biosyntezy lipidu A *L. pneumophila* (Albers i in., 2007). Te dwa geny szlaku biosyntezy lipidu A zależnego od GlcNAc3N *L. pneumophila* ulegają wspólnej transkrypcji. Organizacja tych genów jest analogiczna do rozmieszczenia genów u *E. coli* i innych bakterii wykorzystujących szlak biosyntezy lipidu A zależny od GlcNAc, gdzie pierwsze geny w szlaku (*lpxA* i *lpxB*) również są współtranskrybowane (Crowell i in., 1986; Raetz i Whitfield, 2002).

W przypadku LpxB *E. coli* do syntezy lipidu A wykorzystywane są substraty oparte na GlcN [2-amino-2-deoksy-D-glukopiranoza (glukozamina)], natomiast LpxB *L. pneumophila* przypuszczalnie wykorzystuje prekursory lipidu A oparte na związku GlcN3N, który nie występuje u *E. coli* (Sweet i in., 2004). Ponadto różnicowanie struktury prekursorów przeznaczonych do syntezy lipidu A dotyczy także preferowanych długości pierwszorzędowych łańcuchów kwasów tłuszczowych. *E. coli* wykorzystuje łańcuchy kwasów zawierające 14 atomów węgla, natomiast *L. pneumophila* 20 atomów węgla (Sweet i in., 2004).

Liczne paralogi acylotransferaz LpxA, LpxD i LpxL również mogą charakteryzować się zróżnicowaną specyficznością substratową i preferencyjnie wykorzystywać kwasy tłuszczowe o różnej długości, rodzajach rozgałęzienia lub innych modyfikacjach, które zidentyfikowano w lipidzie A *L. pneumophila* (Albers i in., 2007).

1.5.2. Biosynteza polisacharydowej części LPS *L. pneumophila*

Geny zaangażowane w biosyntezę LPS *L. pneumophila* zgrupowane są w locus, który złożony jest z co najmniej 28 otwartych ramek odczytu (ORF, *Open Reading Frames*). Charakterystyka loci genów uczestniczących w biogenezie LPS 14 szczepów *L. pneumophila* sg 1 reprezentujących wszystkie mAb-podgrupy panelu Dresden, z wyjątkiem podgrupy Oxford, pozwoliła określić wielkość ORF, wynoszącą od 30 644 pz (szczep Lorraine) do 35 888 pz (szczep 130b). Średnia wielkość pojedynczej ORF *L. pneumophila* sg 1 wynosi około 1 kpz. Analiza porównawcza loci związanych z syntezą polisacharydowej części LPS wykazała obecność dwóch głównych regionów: specyficznego dla sg 1, heterogenego regionu o wielkości 18 kpz, który obejmuje geny od *lpg0779* (ORF 1) do *lpg0764* (ORF 13) oraz wysoce konserwatywnego regionu o wielkości 15 kpz zawierającego geny od *wecA* (ORF 14) do *lpg0748* (ORF 28) (Petzold i in., 2013) (**Ryc. 6**).

Geny w obrębie ORF 1 – ORF 28 zgrupowane w locus o wielkości 31-36 kpz zaangażowane są w biosyntezę polisacharydowej części LPS *L. pneumophila*. Gen *lag-1* związany z biosyntezą LPS identyfikowany jest w odmiennych lokalizacjach na chromosomie różnych izolatów z grupy Pontiac, co wskazuje na to, że gen *lag-1* może być umiejscowiony w niestabilnym elemencie genetycznym. W krótkołańcuchowych OPS pierwsze trzy reszty kwasu legionaminowego dołączone do rdzenia LPS *L. pneumophila* sg 1 są w całości 8-*O*-acetylowane, niezależnie od tego, czy w szczepie wykazano obecność genu *lag-1*. Wskazuje to na

występowanie innego genu poza *lag-1*, którego produktem jest enzym o aktywności *O*-acetylotransferazy odpowiedzialny za specyficzną reakcję 8-*O*-acetylacji pierwszych trzech reszt kwasu legionaminowego w krótkołańcuchowym OPS (Kooistra i in., 2001). Niezależna od *lag-1* *O*-acetylacja prawdopodobnie zapobiega *N*-metylacji kwasu legionaminowego w krótkołańcuchowych OPS, podczas gdy zależna od *lag-1* *O*-acetylacja długołańcuchowych OPS nie koliduje z *N*-metylacją. Proces *O*-acetylacji zależny od *lag-1* następuje po *N*-metylacji. Przymuszcza się alternatywnym genem kodującym *O*-acetylotransferazę jest ORF 22 zlokalizowany w lokus o wielkości 32,6 kpz (Lüneberg i in., 2000).

Geny ORF 21 do ORF 25 oraz ORF 28 zaangażowane są w biosyntezę powtarzających się podjednostek antygeny O kwasu legionaminowego (Knirel i in., 1994; Glaze i in., 2008). Aminotransferaza zależna od fosforanu pirydoksalu (ORF 21), acetylotransferaza NeuD (ORF 22) i dehydrataza (*lpg0966*) zlokalizowane poza konserwatywnym regionem związanym z syntezą polisacharydowej części LPS *L. pneumophila* prawdopodobnie uczestniczą w syntezie prekursora kwasu legionaminowego - UDP-*N,N'*-diacetylobacillozami (UDP-Bac2Ac4Ac) (Schoenhofen i in., 2006). Acetylotransferaza NeuD bierze udział w niezależnej od genu *lag-1* *O*-acetylacji kilku podjednostek kwasu legionaminowego usytuowanych blisko rdzenia LPS *L. pneumophila* (Lüneberg i in., 2000; Knirel i in., 2003). Geny zgrupowane w klaster składający się z ORF 23, ORF 24 i ORF 25 kodują enzymy uczestniczące w biosyntezie i polimeryzacji kwasu legionaminowego, którego biosyntetyczny szlak wykazuje podobieństwo do bakteryjnego szlaku syntezy polisacharydów zawierających kwas sjałowy (Schauer, 1982). Produkty genów *neuC* (ORF 23), *neuB* (ORF 24) i *neuA* (ORF 25) zaangażowane są w proces przekształcania cząsteczki prekursorowej UDP-Bac2Ac4Ac w kwas CMP-5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowy (CMP-Leg5Ac7Ac) (Glaze i in., 2008). Pierwszym etapem tego procesu jest konwersja UDP-Bac2Ac4Ac do 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoksymannozy oraz UDP, katalizowana przez produkt genu *neuC* - 2-epimerazę UND-*N,N'*-diacetylobacillozami. Następnie dochodzi do reakcji kondensacji powstałej 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoksymannozy i fosfoenolopirogronianu (PEP), którą katalizuje syntaza kwasu *N,N'*-diacetylolegionaminowego (produkt genu *neuB*) (Glaze i in., 2008). W wyniku kondensacji powstały kwas *N,N'*-diacetylolegionaminowy ulega przekształceniu do kwasu CMP-Leg5Ac7Ac przy udziale syntetazy kwasu *N*-acetyloneuraminowego (produkt genu *neuA*) (Mosimann i in., 2001).

ORF 28 wykazuje homologię do genu *ptmG* *Campylobacter jejuni* (Cj1324), kodującego aminotransferazę PseA (*Pseudaminic Acid*), zaangażowaną w biosyntezę kwasu pseudoaminowego obecnego we flagelinie (Thibault i in., 2001). Gen *pmtG* zaangażowany jest

w przekształcenie CMP-Leg5Ac7Ac w kwas CMP-5-acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galakto-nonulozowy (CMP-Leg5Am7Ac) (McNally i in., 2007), stanowiący dominującą podjednostkę antygeny O szczepów *L. pneumophila* nienależących do sg 1 (Knirel i in., 2001). Szczepy *L. pneumophila* sg 1 oraz duża liczba szczepów nienależących do sg 1 posiada ORF 28, co wskazuje, że CMP-Leg5Am7Ac jest związkiem budującym OPS *L. pneumophila*, który może podlegać modyfikacjom w sposób specyficzny dla mAb-podgrupy lub nawet danego szczepu (Ledesma i in., 1995; Farhat i in., 2011; Mérault i in., 2011).

Region ORF 8 – ORF 12, który występuje wyłącznie w szczepach *L. pneumophila* sg 1 odpowiada za modyfikację antygeny O (Lüneberg i in., 2000). Największą zmiennością charakteryzuje się region od ORF 6 do ORF 11. Przepuszczalnie każda pojedyncza ramka odczytu z regionu ORF 6 – ORF 11 odgrywa odrębną funkcję w późnej modyfikacji kwasu legionaminowego, która może być regulowana w sposób zależny od cyklu życiowego lub fazy wzrostu *L. pneumophila* (Petzold i in., 2013). Zarówno w obrębie sekwencji ORF 8 i ORF 9 zidentyfikowano dwa różne klastry, które wykazywały niskie podobieństwo sekwencji aminokwasowej wynoszące 31% (ORF 8) i 30,7% (ORF 9). Różnice te obejmowały także orientację ORF. ORF 8 i ORF 9 w szczepach mAb-podgrupy Knoxville, Camperdown i Heysham wykazują orientację w przeciwnych kierunkach, tworząc dwa odrębne skupiska. Dla pozostałych mAb-podgrup (Philadelphia, Allentown, Benidorm, Bellingham i OLDA) oba ORF są zorientowane w identycznych kierunkach. Sekwencja aminokwasowa ORF 8 wykazuje 45-52% homologię do bakteryjnych metylotransferaz. Przepuszczalnie gen ORF 8 koduje metylotransferazę odpowiedzialną za *N*-metylację grupy 5-acetimidoidowej kwasu legionaminowego (Kooistra i in., 2002; Wagner i in., 2007). Potwierdzają to badania szlaku biosyntezy kwasu legionaminowego bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Gen *ptmH* (Cj1325) *C. jejuni* jest homologiem ORF 8 mAb-podgrup Knoxville, Camperdown i Heysham (McNally i in., 2007). Białko kodowane przez gen *ptmH* katalizuje modyfikację CMP-Leg5Am7Ac do *N*-metylowanej formy kwasu CMP-5-E/Z-N-(*N*-metylacetimidoyl)-7-acetamidino-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galakto-nonulozowego (CMP-Leg5AmNMe7Ac), głównej podjednostki antygeny O szczepów *L. pneumophila* należących do sg 1. Zaburzenie sekwencji ORF 8 i ORF 11 w szczepie *L. pneumophila* 130b, który jest mAb 3/1 pozytywny prowadzi do utraty reaktywności z przeciwciałem mAb 20/1 i będącej tego następstwem zmiany przyporządkowania szczepu 130b z mAb-podgrupy Benidorm na Allentown (Wagner i in., 2007). Ponadto szczep typu dzikiego 130b oraz mutanty ze zmianą w obrębie ORF 8 i ORF 11 nie wykazują reaktywności z przeciwciałem mAb 10/6, które

rozpoznaje epitop złożony z grupy *N*-metylowej i co najmniej jednej nie opisanej dotąd grupy. Brak reaktywności z przeciwciałem mAb 10/6 spowodowane jest tym, że grupa 8-*O*-acetylowa rozpoznawana przez przeciwciało mAb 3/1 utrudnia dostęp do grupy *N*-metylowej i przez to uniemożliwia wiązanie bakterii z przeciwciałem mAb 10/6 (Wagner i in., 2007).

Po zakończonej biosyntezie dwóch zasadniczych komponentów LPS tj. ugrupowania oligosacharydowego rdzenia z lipidem A oraz antygeny O, podlegają one transportowi do peryplazmatycznej warstwy IM za pomocą białka MsbA oraz na drodze systemu Lpt, które zależne są od transportera ABC (Doerrler i in., 2004). Geny transportera ABC *wzt* i *wzm* stanowią region markerowy specyficzny dla serogrupy 1. Do genów o wysoce konserwatywnym charakterze w heterogenicznym regionie o wielkości 18 kbp należą *wzt* (ORF 4) i *wzm* (ORF 5), które wykazują znaczną homologię wśród wszystkich szczepów *L. pneumophila* sg 1 (**Ryc. 6**). *Wzm* koduje białko zawierające domenę transbłonową, podczas gdy *wzt* koduje domenę wiążącą nukleotyd systemu transportera ABC, który pośredniczy w translokacji antygeny O przez błonę wewnętrzną (Greenfield i Whitfield, 2012). Szlak biosyntezy antygeny O zależny od transportera ABC oddziałuje z WecA (ORF 14), czyli UDP-GlcNAc-1-transferazą, która inicjuje biosyntezę *O*-swoistego łańcucha w obszarze cytoplazmatycznej strony błony wewnętrznej (Greenfield i Whitfield, 2012). Niski stopień podobieństwa aminokwasowego transferazy WecA między szczepami *L. pneumophila* należącymi do sg 1 i spoza sg 1 w połączeniu z brakiem obecności genów *wzm* i *wzt* w genomach szczepów nienależących do sg 1, wskazuje na istnienie odmiennego mechanizmu biosyntezy antygeny O w szczepach sg 1 i w szczepach, które nie należą do sg 1 (Mérault i in., 2011).



Ryc. 6 Struktura lokus biosyntezy LPS 14 szczepów *L. pneumophila* sg 1. **A:** region 18 kbp specyficzny dla *L. pneumophila* sg 1 (ORF 1-13) **B:** region 15 kbp występujący we wszystkich serogrupach *L. pneumophila* (ORF 14-28). Kierunek transkrypcji wskazany przez groty strzałek; * częściowa duplikacja ORF 2; podkreślony obszar ORF 7–11 w szczepie 130b reprezentuje inwersję (na podstawie Petzold i in., 2013).

1.6. Budowa i właściwości fosfolipidów bakterii *L. pneumophila*

Błony bakteryjne zbudowane są z amfifilowych lipidów, głównie glicerofosfolipidów. Fosfolipidy składają się z hydrofilowej podjednostki, diacylowego ugrupowania zbudowanego z rdzenia glicerolowego związanego w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 wiązaniami estrowymi z dwoma łańcuchami acylowymi kwasów tłuszczowych, które tworzą lipofilowy fragment oraz polarnej części obejmującej ortofosforanową resztę połączoną jednym wiązaniem estrowym z glicerolem w pozycji *sn*-3 oraz drugim wiązaniem estrowym z hydrofilową podjednostką.

Do głównych bakteryjnych fosfolipidów należą: fosfatydyloetanoloamina (PE, *Phosphatidylethanolamine*), fosfatydyloglicerol (PG, *Phosphatidylglycerol*) i kardiolipina (CL, *Cardiolipin*) (Zhang i Rock, 2008; Strahl i Errington, 2017).

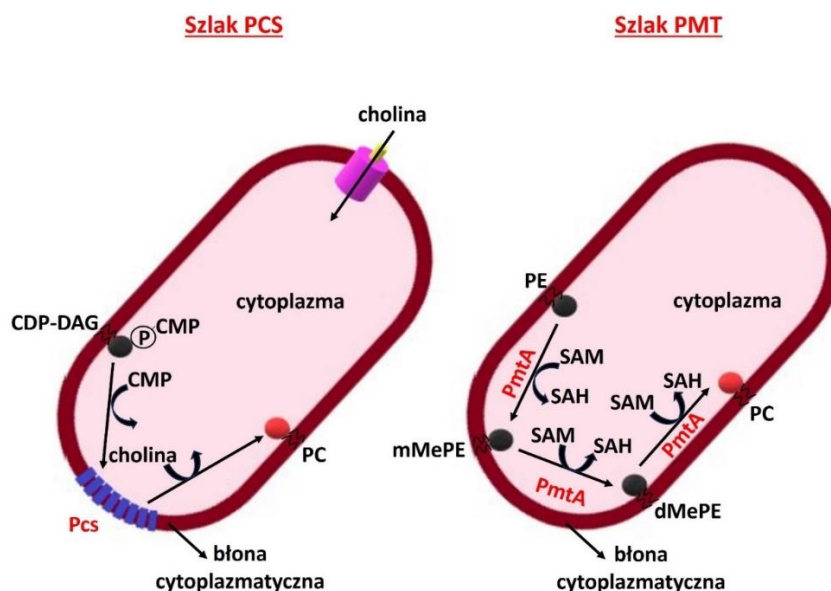
W błonach *L. pneumophila*, jak również innych gatunków: *L. lytica*, *L. bozemanae*, *L. dumoffii*, *L. anisa*, *L. gormanii* i *L. longbeachae* zidentyfikowano następujące klasy fosfolipidów: fosfatydylocholina (PC, *Phosphatidylcholine*), PE, CL i PG (Finnerty, 1979; Palusińska-Szys z in., 2008; 2011; 2014; 2019(a)). Do głównych fosfolipidów *Legionella* spp. należą: PC, której względna zawartość wynosi od 30% do 50% oraz PE (Palusińska-Szys z in., 2019(a)). Rozmieszczenie fosfolipidów w poszczególnych warstwach okrywy bakteryjnej *L. pneumophila* jest następujące: zewnętrzna warstwa błony cytoplazmatycznej (CM-1) zawiera około 43% PC, 45% PE i 12% CL, natomiast warstwa wewnętrzna (CM-2) zawiera 35% PC, 42% PE, 14% CL i 8% PG. PE dominuje w warstwie zewnętrznej (OM-1) i wewnętrznej warstwie błony zewnętrznej (OM-2) (po około 50% w każdej warstwie), PC stanowi odpowiednio 27% i 33%, CL stanowi odpowiednio 10% i 6%, a zawartość PG wynosi około 13% w obu warstwach OM (Hindahl i Iglewski, 1984).

Różnice w składzie kwasów tłuszczowych zawartych w fosfolipidach są ważną cechą chemotaksonomiczną i mogą mieć praktyczne znaczenie w diagnostyce tej grupy bakterii na poziomie gatunku. Fosfolipidy *L. pneumophila* zawierają wyłącznie rozgałęzione kwasy tłuszczowe (Finnerty i in., 1979). Do rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA, *Branched-Chain Fatty Acids*) *L. pneumophila* należą: *izo*-16:0 (56% do 65%), *izo*-14:0 (6% do 11%), *anteiso*-15:0 (13% do 21%), *iso*-16:1 (3% do 5%) oraz *anteiso*-17:0 (7% do 11%) (Finnerty, 1979). Profil kwasów tłuszczowych *L. pneumophila* zmienia się w różnych fazach wzrostu tych bakterii. W fazie wzrostu stacjonarnego zawartość BCFA wzrasta do ponad 60%, a średnia długość kwasów tłuszczowych w cząsteczkach fosfolipidów maleje w po-

równaniu z fazą wzrostu eksponencjalnego. Zmiana składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów występująca w różnych fazach wzrostu *L. pneumophila* skorelowana jest ze wzrostem oporności na przeciwdrobnoustrojowy peptyd warnerycynę RK (Verdon i in., 2011).

1.7. Szlaki biosyntezy fosfatydylocholiny

PC jest głównym fosfolipidem występującym w komórkach eukariotycznych. Zaledwie 15% przedstawicieli domeny *Bacteria* syntetyzuje PC (Sohlenkamp i Geiger, 2016). Są to głównie bakterie wchodzące w interakcje z eukariotycznymi gospodarzami na drodze symbiotycznych (*Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti*) lub patogenicznych (*Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis*, *P. aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* i *L. pneumophila*) zależności (Sohlenkamp i in., 2003). Spośród czterech opisanych dotąd bakteryjnych szlaków biosyntezy PC, bakterie *Legionella* spp. syntetyzują PC na drodze dwóch alternatywnych szlaków: szlaku trzykrotnej *N*-metylacji PE (PMT) oraz szlaku syntazy PC (PCS) (López-Lara i Geiger, 2001; Martinez-Morales i in., 2003) (Ryc. 7).



Ryc. 7 Szlaki biosyntezy PC *L. pneumophila*. PC - fosfatydylocholina; PE - fosfatydyloetanololoamina; mMePE - monometylofosfatydyloetanololoamina; dMePE - dimetylofosfatydyloetanololoamina; SAM - S-adenozynometionina; SAH - S-adenozylhomocysteina; CMP - monofosforan cytydyny; CDP-DAG - diacyloglicerolo-5'-difosfocytydina; Pcs - syntaza fosfatydylocholiny; PmtA - fosfolipidowa *N*-metylotransferaza (na podstawie Martinez-Morales i in., 2003).

Szlak PMT polega na trzykrotnej *N*-metylacji PE przy udziale *N*-metylotransferazy (PmtA), która wykorzystuje *S*-adenozylometioninę (SAM), jako donor grup metylowych. W czasie transmetylacji SAM powstaje *S*-adenozylhomocysteina (SAH). Związkami pośrednimi w tym procesie jest monometylofosfatydyloetanolamina (mMePE) i dimetylofosfatydyloetanolamina (dMePE) (Sohlenkamp i in., 2003). Gen *pmt* kodujący metylotransferazę po raz pierwszy został wykryty u *Rhodobacter sphaeroides* (gen *pmtA*) (Arondel i in., 1993). ORF kodujące homologii PmtA *R. sphaeroides* znaleziono w genomach m.in. *R. capsulatus*, *Pyrococcus furiosus*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, które wykazują podobieństwo sekwencji aminokwasowej odpowiednio: 56%, 42%, 35% i 32% (Sohlenkamp i in., 2003). Proces trzykrotnej metylacji PE może zachodzić przy udziale jednego lub kilku enzymów (de Rudder i in., 2000; Hacker i in., 2008; Minder i in., 2001) zlokalizowanych w cytozolu (Sohlenkamp i in., 2003; Vance i Schneider, 1981). W komórkach bakteryjnych występują dwie rodziny enzymów Pmt: typ *Sinorhizobium* (Sm-PmtA) i typ *Rhodobacter* (Rs-PmtA). Masa cząsteczkowa enzymów należących do obu rodzin wynosi około 22 kDa (Sohlenkamp i in., 2003). Enzymy Pmt typu Sm-PmtA wykazują homologię do metylazy rRNA, natomiast Pmt typu Rs-PmtA do metylotransferazy zaangażowanej w biosyntezę ubiquinonu/menachinonu (Haydock i in., 1991; Ingrosso i in., 1989). Enzym Pmt *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* i *A. aceti* należy do rodziny Rs-Pmt (Conover i in., 2008; Hanada i in., 2001; Wilderman i in., 2002). Geny *pmtA* *Legionella* spp. kodują białka *N*-metylotransferazy o długości od 208 do 218 aminokwasów, które zostały przyporządkowane do klasy enzymatycznej EC 2.1.1.17 (Palusińska-Szys z in., 2019(a)). Domena katalityczna obejmuje prawie całą długość tych białek i zawiera 9-aminokwasowy motyw V/ILE/D-X-G-X-G-X-G, który odpowiada za wiązanie donora grupy metylowej - SAM (Ingrosso i in., 1989; Haydock i in., 1991). Motyw ten jest charakterystyczny dla metylotransferaz zależnych od SAM, zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych (Aktas i in., 2010). Badania topologii błony wskazują na cytoplazmatyczną lokalizację enzymu PmtA *Legionella* spp., a także możliwość jego związania z błoną wewnętrzną od cytoplazmatycznej strony (Palusińska-Szys z in., 2019(a)).

Drugi szlak PCS polega na przemianie wolnej choliny, która ulega bezpośredniej kondensacji z diacyloglicerolo-5'-difosfocytydyną (CDP-DAG) do PC i monofosforanu cytydyny (CMP). Reakcję katalizuje występująca wyłącznie u bakterii syntaza fosfatydylocholiny (Pcs) (de Rudder i in., 1999). Homolog *pcs* *L. pneumophila* wykazuje większe podobieństwo

bieństwo do homologu *pcs* *B. burgdorferi* w porównaniu z innymi przedstawicielami γ -Proteobacteria, co wskazuje na możliwość wystąpienia horyzontalnego transferu genu *psc* w filogenezie tych bakterii (Sohlenkamp i in., 2003). Enzym Pcs jest wysoce hydrofobowym białkiem zawierającym od 6 do 8 transbłonowych helis, które wykazuje strukturalne podobieństwo z innymi fosfatydylotransferazami CDP-alkoholowymi (López-Lara i Geiger, 2001; Sohlenkamp i in., 2003). Charakterystyczny dla fosfatydylotransferaz CDP-alkoholowych motyw D-G-X2-A-R-X8-G-X3-D-X3-D (Williams i McMaster, 1998) ma konserwatywny charakter i występuje również w strukturze enzymu Pcs (Sohlenkamp i in., 2003). Różne gatunki z rodzaju *Legionella* wykazują znaczny stopień podobieństwa sekwencji nukleotydowych genu *psc* (64%-98%). Gen *pcs* *L. pneumophila* koduje wysoce hydrofobowe białko zbudowane z 255 aminokwasów, zawierające 8 transmembranowych helis z N- i C-końcami zlokalizowanymi wewnątrz komórki bakteryjnej. N-końcowa domena odpowiedzialna za aktywność enzymatyczną zawiera 27 aminokwasowy motyw D-G-X2-A-R-X8-P-X3-G-X3-D-X3-D (Palusińska-Szys z in., 2019(a)).

Wykorzystanie egzogennej choliny przez *Legionella* spp. w szlaku PCS prowadzi do zmiany zawartości poszczególnych klas fosfolipidów. *L. pneumophila* hodowana na podłożu z dodatkiem choliny syntetyzuje odpowiednio o 6% i 3% więcej PC i PE oraz o 9% mniej CL w porównaniu z bakteriami hodowanymi na podłożu bez choliny (Palusińska-Szys z in., 2019(a)). Mutant *L. pneumophila* defektywny w syntezie metylotransferazy syntetyzuje prawie całą zawartość PC, podczas gdy mutant nieprodukujący syntazy fosfatydylcholiny wytwarza tylko 6% PC, co wskazuje, że szlak PCS jest szlakiem dominującym w tej grupie bakterii (Conover i in., 2008).

1.8. Rola składników lipidowych *L. pneumophila* w interakcji z komórką gospodarza

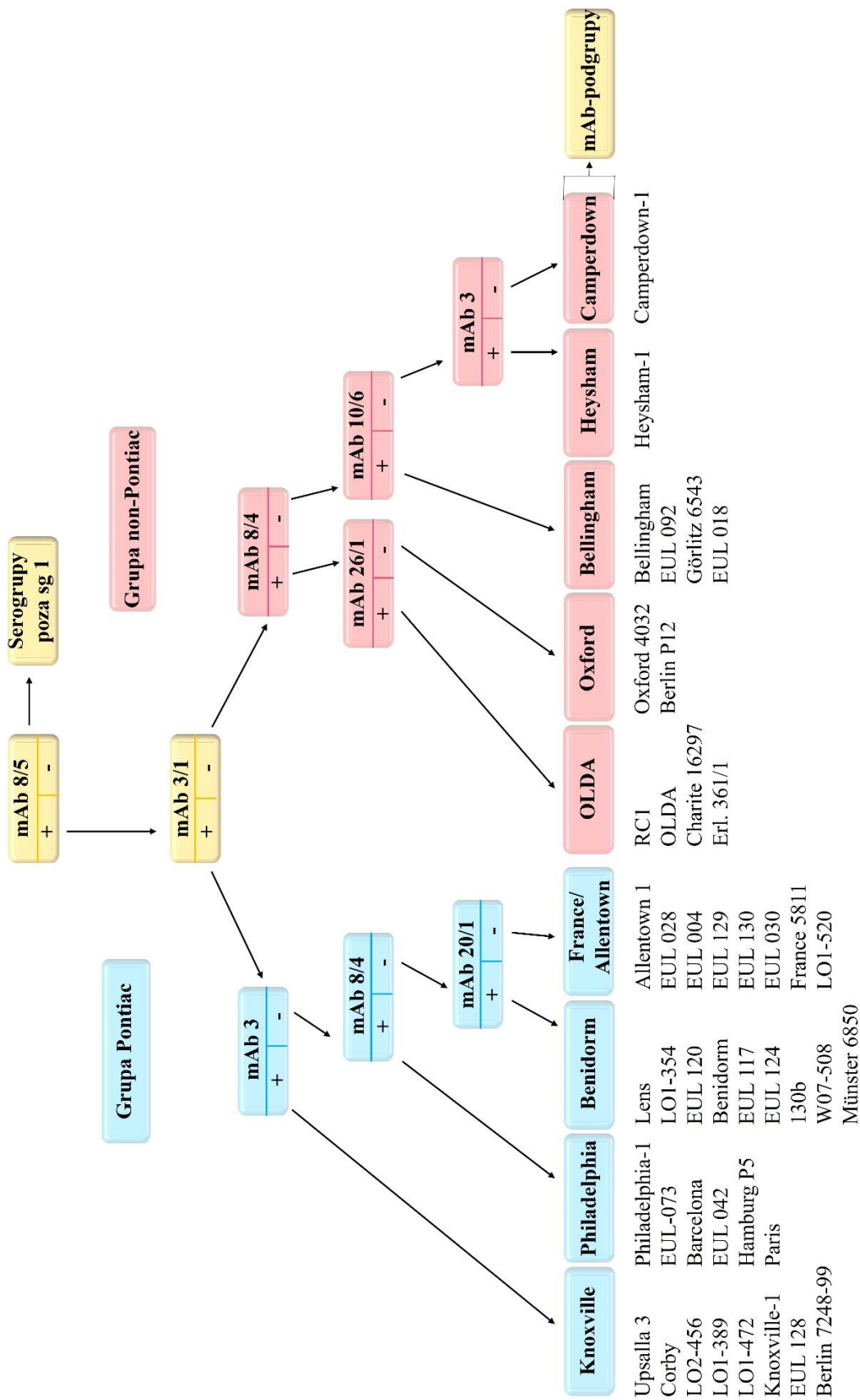
LPS *L. pneumophila* uczestniczy w złożonych mechanizmach indukcji zmian chorobowych, stanowi antygen rozpoznawany przez białka biorące udział w odpowiedzi układu odpornościowego komórki gospodarza na infekcję, a także reprezentuje jedną z konserwatywnych struktur drobnoustrojów odpowiedzialnych za aktywację wrodzonego układu odpornościowego. Różnice w strukturze LPS szczególnie w obrębie antygeny O, determinują specyficzność grup i podgrup serologicznych *L. pneumophila* (Ciesielki i in., 1986). Występowanie różnic dla danej serogrupy uwarunkowane jest: 1) odmienną konfiguracją homo-

polimeru O-specyficznego łańcucha, 2) chemiczną budową terminalnych podjednostek cukrowych LPS, 3) *N*-metylacją 4) oraz stopniem *O*-acetylacji w różnych pozycjach cząsteczki LPS (Knirel i in. 2001; Kooistra i in. 2001). Różnice w strukturze części O-specyficznego LPS, w której umiejscowione są epitopy rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne (mAb), warunkują zwiększenie serologicznego zróżnicowania szczepów *L. pneumophila* (Helbig i in., 2006).

1.9. Klasyfikacja serologiczna szczepów *L. pneumophila* sg 1

Lipopolisacharyd jest głównym termostabilnym antygenem wszystkich gatunków *Legionella*, w tym *L. pneumophila* sg 1, który rozpoznawany jest przez surowice pacjentów z rozpoznaną chorobą legionistów (Helbig i in., 2012). Metoda serologiczna określana jako panel Dresden umożliwia przyporządkowanie szczepów *L. pneumophila* do piętnastu serogrup i dziewięciu mAb-podgrup w obrębie sg 1 (Helbig i in., 1997; Helbig i in., 2002). Epitopem specyficznym rozpoznawanym przez przeciwciała mAb 3/1 panelu Dresden jest grupa *O*-acetylowa w pozycji C8 kwasu legionaminowego przenoszona przez *O*-acetylotransferazę kodowaną przez gen *lag-1* (Zou i in., 1999).

Za pomocą panelu Dresden przyporządkowano szczepy *L. pneumophila* sg 1 do dwóch grup: 1) nienależące do grupy Pontiac (non-Pontiac) (mAb 3/1⁻), której szczepy nie posiadają w pełni *O*-acetylowanego epitopu 2) należące do grupy Pontiac (mAb 3/1⁺), której szczepy posiadają funkcjonalny gen *lag-1* i syntetyzują epitop rozpoznawany przez przeciwciała mAb 3/1 (**Ryc. 8**). Szczepy *L. pneumophila* sg 1 mAb 3/1⁺ charakteryzują się zwiększoną wirulencją i reprezentują najliczniejszą podgrupę klinicznych izolatów (Helbig i in., 1995; Kozak i in., 2009). Natomiast szczepy mAb 3/1⁻ zawierają głównie deacetylowane cząsteczki LPS i obejmują niewielką liczbę klinicznie rozpoznanych szczepów *L. pneumophila* sg 1 u pacjentów z prawidłową odpornością (Joseph i in., 2010).



Ryc. 8 Podział szczepów *L. pneumophila* sg 1 na mAb-podgrupy według panelu Dresden (na podstawie Helbig i in., 2002; Thürmer i in., 2009).

1.10. Biologiczne znaczenie LPS i fosfolipidów *L. pneumophila*

LPS *L. pneumophila* inicjuje zarówno klasyczny, jak i alternatywny szlak aktywacji dopełniacza, zwiększając szansę na wychwycenie bakterii przez makrofagi i utworzenie w nich niszy, optymalnej do wewnątrzkomórkowego namnażania się. Głównym szlakiem uruchamianym przez LPS *L. pneumophila* jest aktywacja klasycznego szlaku zależnego od przeciwciał klasy IgM (Mintz i in., 1992). Aktywacja dopełniacza w sposób niezależny od przeciwciał następuje poprzez związanie białka układu dopełniacza C1q z głównym białkiem błony zewnętrznej *L. pneumophila* (MOMP, *Major Outer Membrane Protein*) (Mintz i in., 1995). Szczepy *L. pneumophila* posiadające gen *lag-1*, kodujący acetylotransferazę, wykazują zwiększoną oporność na internalizację przez neutrofile w obecności surowicy, co wskazuje, że proces ten jest zależny od białek dopełniacza. Badania na mysim C56BL/6 modelu choroby legionistów wykazały, że szczep *L. pneumophila lag-1*-pozytywny odpowiadał za silniejszą infekcję płuc i wykazywał wyższą przeżywalność w porównaniu do szczepu *L. pneumophila* pozbawionego genu *lag-1*. Szczepy zawierające gen *lag-1* charakteryzowały się spadkiem poziomu opsonizacji powierzchni bakterii *L. pneumophila* przez białko dopełniacza C3 w porównaniu ze szczepem *L. pneumophila lag-1*-negatywnym. Wskazuje to, że modyfikacje LPS utrudniają eliminację patogenu w klasycznym szlaku aktywacji układu dopełniacza (Wee i in., 2021).

W indukcji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *L. pneumophila* kluczową rolę odgrywa oddziaływanie LPS z receptorem TLR4 (*Toll-Like Receptor*) zlokalizowanym zarówno na błonie makrofagów, jak i błonie pęcherzyków endosomalnych. Transdukcja sygnału aktywacji TLR4 odbywa się za pośrednictwem białek adaptorowych MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) oraz TRIF (*TIR-domain-containing adapter inducing IFN- β*), co wskazuje, że pobudzenie zarówno powierzchniowego jak i endosomalnego TLR4 jest niezbędne do pełnego wydzielania prozapalnych cytokin (Grigoryeva i Cianciotto, 2021). Badania polimorfizmu genu kodującego TLR4, przeprowadzone wśród pacjentów z chorobą legionistów wykazały, że zmienność w obrębie tego genu może predysponować do rozwoju lub ograniczenia choroby, ponieważ koreluje z poziomem IL-6 indukowanej podczas zakażenia *L. pneumophila* (Hawn i in. 2005; Zhang i in. 2013).

Na poziom indukcji prozapalnych cytokin wpływa również zawartość i struktura fosfatydylocholin wytwarzanych przez *L. pneumophila* w różnych szlakach syntezy PC. Bakterie *L. pneumophila* hodowane na pożywce z egzogenną choliną indukowały w makrofa-

gach linii THP-1 znacznie niższą produkcję TNF- α i IL-6 w porównaniu z bakteriami hodowanymi bez dodatku cholicy (Palusińska-Szys z in, 2019(a)). Brak PC w błonie *L. pneumophila* wpływa na ograniczoną zdolność bakterii do namnażania się w makrofagach człowieka oraz obniżoną toksyczność. Wynika to ze słabej zdolności do wiązania się bakterii z makrofagami za pośrednictwem receptora czynnika aktywującego płytki krwi (PAF, *Platelet Activating Factor*). Adhezja *L. pneumophila* do makrofagów jest skutecznie blokowana przez antagonistę receptora PAF. Ze względu na podobieństwo strukturalne czynnika PAF i PC, fosfolipid *L. pneumophila* może naśladować PAF i wiążąc się z jego receptorem prowadzić do zwiększenia pobierania bakterii przez makrofagi. Ponadto brak syntezy PC wpływa na zaburzenie funkcjonowania systemu sekrecji Dot/Icm oraz syntezy białka flageliny (Conover i in., 2008).

Reakcje oddziaływania elektrostatycznego między kwasem legionaminowym LPS, a fosfolipidami i innymi składnikami powierzchni komórki stabilizują konformację makrocząsteczek oraz całą zewnętrzną błonę *L. pneumophila*, jak również wpływają na biogenezę pęcherzyków membrany zewnętrznej (OMV, *Outer Membrane Vesicles*). Bakterie *L. pneumophila* uwalniają z błony zewnętrznej pęcherzyki, zbudowane z LPS, fosfolipidów i białek oraz modyfikują skład OMV w zależności od fazy wzrostu w której się znajdują. OMV odgrywają kluczową rolę w patogenezie choroby legionistów, umożliwiając bakteriom kolonizację układu oddechowego, dostarczając czynniki wirulencji do komórek gospodarza i modulując odpowiedź immunologiczną gospodarza na zakażenie (Jäger i in., 2015).

II HIPOTEZA I CEL PRACY

Hipoteza badawcza zakłada, że specyficzne determinanty struktur powierzchniowych *L. pneumophila* sg 1, warunkują zdolność do adhezji i wewnątrzkomórkowego namnażania się w komórkach eukariotycznego gospodarza oraz modulują wrodzoną odpowiedź immunologiczną na zakażenie.

Głównym celem badań było:

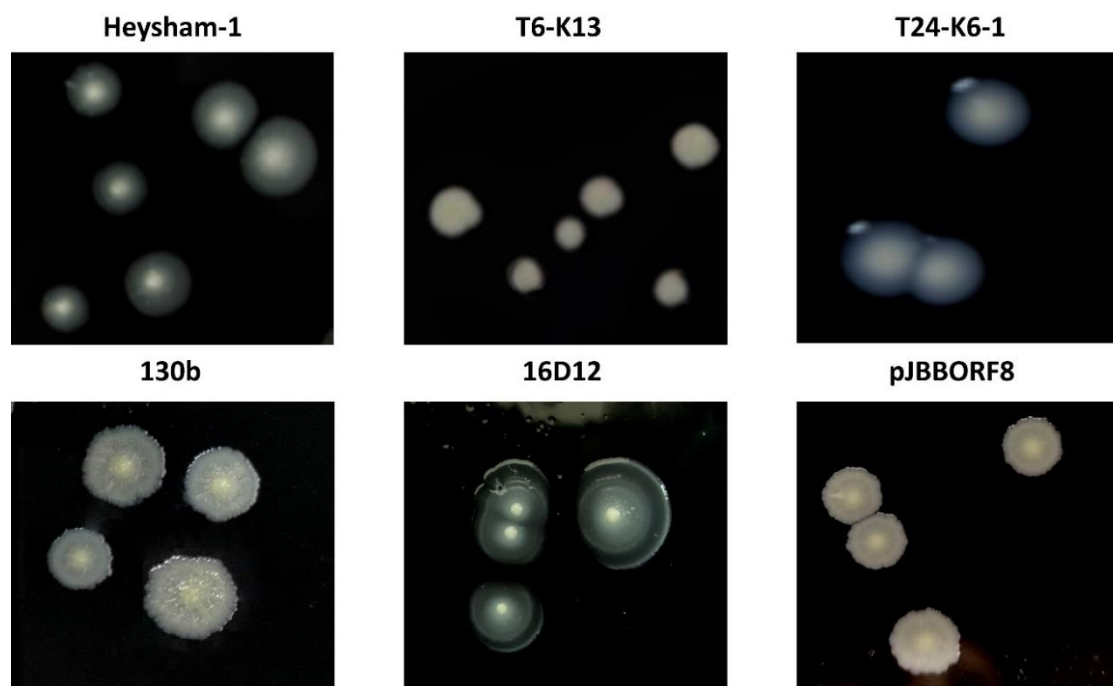
1. Analiza strukturalna LPS szczepów *L. pneumophila* sg 1 (szczep Heysham-1 i 130b) oraz pochodnych szczepów dzikich z wprowadzonymi nonsensownymi mutacjami w genach: ORF 8 (szczep 16D12, pochodna szczepu 130b) i ORF 7 (szczep T6-K13, pochodna szczepu Heysham-1),
2. Określenie struktury lipidów wyizolowanych ze szczepów dzikich oraz mutantów,
3. Badanie biofizycznych oddziaływań między komórkami bakterii (szczepów dzikich i mutantów), a komórkami gospodarza (makrofagami linii THP-1, komórkami *A. castellanii*),
4. Badanie zdolności do adhezji i wewnątrzkomórkowego namnażania się szczepów dzikich i mutantów w komórkach *A. castellanii* i w makrofagach linii THP-1 oraz w komórkach nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B,
5. Określenie zdolności komórek szczepów dzikich i mutantów oraz wyizolowanych z tych szczepów LPS, do indukcji cytokin (IL-6, TNF- α , IFN- γ) w makrofagach linii THP-1.

W szerszym znaczeniu badania te miały na celu identyfikację kluczowych markerów ściany komórkowej odpowiedzialnych za zwiększoną wirulencję szczepów *L. pneumophila* sg 1. Wiedza o tym, jak zmiany w strukturze ściany komórkowej *L. pneumophila* sg 1 wpływają na pobieranie bakterii, ich wewnątrzkomórkową proliferację oraz odpowiedź gospodarza na infekcję, mogą być pomocne w opracowaniu nowych leków i skutecznych schematów leczenia choroby legionistów.

III MATERIAŁY I METODY

3.1. Szczepy bakteryjne

Bakterie *L. pneumophila* sg 1 szczep dziki Heysham-1 i 130b, mutanty defektywne w syntezie LPS, odpowiednio T6-K13 i 16D12 oraz szczep komplementacyjny (T24-K6-1) względem mutacji występującej w szczepie T6-K13 otrzymano dzięki współpracy z Instytutem Mikrobiologii Medycznej i Higieny Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie, Niemcy. Mutant T6-K13 został otrzymany zgodnie z procedurą opisaną w pracy Kowalczyk i in., 2023. Procedurę otrzymania mutantu 16D12 opisano w pracy Pope i in., 1994. Konstrukt genetyczny szczepu komplementacyjnego (pJBBORF8) względem mutacji występującej w szczepie 16D12 został wykonany w ramach pracy doktorskiej. *L. pneumophila* szczep Heysham-1 i *L. pneumophila* szczep 130b zostały wyizolowane od pacjentów z rozpoznaną chorobą legionistów. Morfologię kolonii badanych szczepów przedstawiono na **Ryc. 9**. Badania przeprowadzono zgodnie z pozwoleniem Ministerstwa Środowiska zarówno na zamknięte użycie mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie, jak i na zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczanych do II kategorii zagrożenia (**Ryc. 1A**; **Ryc. 2A**(Aneks)).



Ryc. 9 Morfologia kolonii 3-dniowej hodowli *L. pneumophila* szczepów: Heysham-1, T6-K13, T24-K6-1, 130b, 16D12, pJBBORF8 na podłożu BCYE.

3.2. Konstrukt genetyczny szczepu komplementacyjnego

W reakcji PCR, na matrycy całkowitego DNA wyizolowanego z hodowli szczepu *L. pneumophila* 130b powielono fragment DNA obejmujący sekwencję kodującą genu LPW_RS04255 (ORF 8) i 200 pz powyżej miejsca startu translacji. Startery zostały zaprojektowane w taki sposób, żeby produkt PCR był oflankowany miejscami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne EcoRI i Bam HI. W oparciu o enzymy restrykcyjne EcoRI i BamHI sklonowano uzyskany produkt PCR w wektorze pJB1806. Jest to wektor o szerokim zakresie gospodarzy, oparty o origin replikacji RSF1010, pozwalający na jego replikację w komórkach *L. pneumophila*. Uzyskany konstrukt genetyczny (pJB1806ORF8) poddano następnie sekwencjonowaniu, potwierdzając jego poprawność. Uzyskany konstrukt wprowadzono do komórek mutanta 16D12 na drodze elektrotransformacji, selekcjonując transformanty na podłożu z chloramfenikolem w odpowiednim stężeniu. Dla potwierdzenia obecności wprowadzanego konstrukt w komórkach elektrotransformantów (komplementantów) z ich hodowli wyizolowano plazmidowe DNA i na jego matrycy przeprowadzono reakcję PCR, ze starterami komplementarnymi do sekwencji genu LPW_RS04255.

ORF8130B200UPEcoRIFw (32-mer):

AAAGAATTCagagaaaatgattggtttatca

ORF8130BBamHIRv (42-mer):

AAAGGATCCttatatgtgaatttctaataaataatgatctac.

3.3. Podłoża hodowlane

3.3.1. Wyciąg drożdżowy buforowany węglem drzewnym (BCYE) do hodowli bakterii *L. pneumophila*

Do sterylnej kolby okrągłodennej o pojemności 1000 ml odważono 18,25 g agaru BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*; OxoidTM Legionella CYE Agar Base), następnie dodano 465 ml wody MQ oraz 8,8 ml 2 N KOH. Zawartość kolby gotowano przez godzinę, a po ochłodzeniu do temperatury pokojowej pożywkę rozlano do pięciu kolb Erlenmayer'a o pojemności 300 ml w objętości po 95 ml. Pożywkę autoklawowano przez 15 min w 121°C przy 1,5 ATM. Do pięciu fiolek z liofilizowanym suplementem wzrostowym (OxoidTM Legionella Growth Supplement BCYE) dodano po 5 ml wyjałowionej wody MQ i dokładnie

wymieszano. Kolby z pożywką BCYE oraz fiołki z suplementem umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 48°C. Po upływie 10 minut zawartość fiołki z suplementem przelano do kolby z pożywką BCYE i wylano na płytki Petriego po 20 ml, zachowując sterylne warunki. Przygotowane w taki sposób podłoże BCYE wykorzystano do wykonania posiewów szczepów dzikich (Heysham-1, 130b), mutantów (T6-K13, 16D12) oraz komplementanta T24-K6-1. Komplementant pJBBORF8 namnażano na podłożu BCYE z dodatkiem chloramfenikolu w stężeniu 25 µg/ml pożywki.

3.3.2. Płynne podłoże do hodowli bakterii *Legionella* spp.

Do sterylnej butelki odważono 1 g ekstraktu drożdżowego (Difco™ Yeast Extract) i rozpuszczono w 90 ml jałowionej wody MQ. Następnie pH pożywki ustalono 1 M KOH do wartości 6,9 i autoklawowano (121°C; 15 min; 1,5 ATM). Do fiołki z liofilizowanym suplementem wzrostowym (Oxoid™ Legionella Growth Supplement BCYE) dodano 10 ml jałowionej wody MQ. Po dokładnym wymieszaniu zawartość fiołki przelano w warunkach sterylnych do wcześniej autoklawowanego i ochłodzonego do temperatury 45°C - 50°C ekstraktu drożdżowego. Po dokładnym wymieszaniu pożywkę rozlano po 5 ml do sterylnych probówek.

3.3.3. Płynne podłoże PYG opracowane przez Banda (1959) w modyfikacji Schlehta i Drożańskiego (1987) do hodowli ameb *A. castellanii*

Trofozoity *A. castellanii* (szcep ATCC 3034, wolny od wewnątrzkomórkowych endosymbiontów pochodzący z kolekcji mikroorganizmów Katedry Genetyki i Mikrobiologii) namnażano na podłożu o następującym składzie: glukoza (18 g), proteose pepton (BD 211677 Difco™) (10 g), ekstrakt drożdżowy (5 g), NaCl (0,12 g), Na₂HPO₄ x 12 H₂O (0,35 g), KH₂PO₄ (0,18 g), MgCl₂ x 6 H₂O (3 mg), CaCl₂ (3 mg), FeSO₄ (3 mg), woda MQ (dopełniona do 1000 ml). Pożywkę płynną o podanym powyżej składzie przelano do kolb Erlenmayer'a w objętości po 100 ml, a następnie autoklawowano (15 min; 121°C; 1,5 ATM).

3.4. Warunki prowadzenia hodowli

3.4.1. Hodowla szczepów *L. pneumophila* na podłożu BCYE

Zawiesinę bakterii po 100 µl naniesiono na podłoże BCYE, a następnie rozprowadzono za pomocą jałowej głaszczki. Bakterie hodowano przez 3 dni w temperaturze 37°C

w wilgotnej atmosferze, wzbogaconej w 5% CO₂ (ESCO Cell Culture Inkubator). Zebrana z powierzchni agaru masa bakteryjna została zawieszona w sterylnym roztworze 0,5 M NaCl, a następnie poddana wirowaniu przy 8 000 obr./min przez 20 minut (Sigma 6-16KS). Supernatant odrzucono, a osad zawierający bakterie przepłukano 0,5 M NaCl oraz sterylną wodą MQ. Otrzymaną w ten sposób masę bakteryjną zawieszono w wodzie MQ, a następnie zliofilizowano (liofilizator Christ Alpha 1-2LD Plus), zważono i przeznaczona do izolacji lipidów oraz LPS.

3.4.2. Hodowla szczepów *L. pneumophila* na płynnym podłożu

Za pomocą sterylnej ezy przeniesiono do płynnej pożywki badane szczepy bakteryjne. Hodowle inkubowano w szafie hodowlanej przy 180 obr./min w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po 24 godzinnej inkubacji przeniesiono po 200 µl płynnej hodowli na świeże pożywki i inkubowano przez dobę w takich samych warunkach. Tak przygotowane płynne hodowle bakterii wykorzystano do przeprowadzenia testu adhezji, infekcji i inwazji *L. pneumophila* z makrofagami linii komórkowej THP-1 i *A. castellanii*.

3.4.3. Hodowla ameb *A. castellanii*

Do płynnej pożywki PYG dodano 5 ml płynnej hodowli *A. castellanii*. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C na wytrząsarce przy 110 obr./min przez 5 dni. Płynną hodowlę ameb o gęstości obliczonej przy użyciu hemocytometru Büchner'a (2 x 10⁵ komórek/ml) przeznaczono do wykonania testu adhezji, infekcji i inwazji komórek *L. pneumophila* z amebami *A. castellanii*.

3.4.4. Hodowla makrofagów linii THP-1 na podłożu RPMI 1640

Komórki ludzkiej białaczki monocytarnej linii THP-1 (ATCC, No TIB-202) hodowano na podłożu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy cielęcej (FCS, *Fetal Calf Serum*), 10 mM buforu HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]-etanosulfonowy), 2 mM glutaminy, 100 IU/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny w temperaturze 37°C w atmosferze wzbogaconej w 5% CO₂. Do doświadczeń wykorzystano komórki THP-1, które poddano procedurze różnicowania do adherentnych komórek makrofagopodobnych. W tym celu hodowlę komórkową linii THP-1 o gęstości 4 × 10⁵ komórek/ml prowadzoną w płynie RPMI 1640 z dodatkiem 10% FCS przeniesiono do 24-dołkowej płytki (Nunc, Roskilde, Dania).

Różnicowanie monocytów do makrofagów indukowano poprzez dodanie do monocytów octanu mirystynianu forbolu (PMA, *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*; Sigma–Aldrich) w końcowym stężeniu 50 ng/ml hodowli. Następnie po trzykrotnym przepłukaniu adherentne komórki THP-1 hodowano przez kolejne trzy dni na podłożu bez dodatku PMA z uwzględnieniem codziennej zmiany podłoża (bez antybiotyków). Przed wykonaniem doświadczenia komórki zostały policzone w celu dobrania odpowiedniej dawki infekcyjnej wyrażanej w MOI (*Multiplicity of Infection*), czyli liczbę bakterii przypadającą na jedną komórkę makrofaga.

Hodowlę zróżnicowanych według powyższej procedury komórek linii THP-1 o gęstości 4×10^5 komórek/ml prowadzono również na jałowych, okrągłych szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w 6-dołkowych płytkach do hodowli adherentnej. Hodowle wykorzystano do przeprowadzenia analizy w mikroskopie czasów życia fluorescencji (FLIM, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*).

3.4.5. Hodowla komórek nabłonkowych dróg oddechowych linii A549 i BEAS-2B

Do badań wykorzystano dwie adherentne linie komórkowe: nowotworowe komórki nabłonka pęcherzyków płucnych człowieka (linia A549, ATCC# CCL-185, model dolnych dróg oddechowych) oraz prawidłowe komórki nabłonka oskrzeli człowieka (linia BEAS-2B, ATCC# CRL-9609, model górnych dróg oddechowych). Linia komórek A549 jest modelem linią do badania interakcji z bakteriami *Legionella* spp. (Schulz i in., 2017). Hodowlę komórek linii A549 prowadzono w mieszaninie płynów RPMI 1640 (Corning Media) i DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich) (1:1; v/v) uzupełnionej 10% (v/v) inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS, *Foetal Bovine Serum*; EURx Molecular Biology Products) oraz 1% (v/v) roztworem penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich). Komórki linii BEAS-2B hodowano w płynie LHC-8 (Gibco) suplementowanym 10% (v/v) inaktywowaną termicznie FBS oraz 1% (v/v) roztworem penicyliny i streptomycyny. Po upływie 24 h hodowli dokonano wymiany płynu hodowlanego na płyn LHC-8 bez dodatku FBS. Obie hodowle komórkowe utrzymywano w standardowych warunkach w temperaturze 37°C z przepływem 5% CO₂ i wilgotności 95%. Komórki hodowano do etapu konfluencji. Następnie usunięto płyn hodowlany i komórki przepłukano roztworem zbuforowanej soli fizjologicznej bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (PBS, Thermo Fisher Scientific) w celu usunięcia resztek surowicy. Za pomocą 0,25% roztworu trypsyny z 0,02%

EDTA (Biological Industries) odklejano komórki od fazy stałej i rozdzielano zawiesinę do dwóch nowych plastikowych butelek uzupełniając świeżym płynem - czynność tą nazywamy pasażowaniem hodowli komórkowej.

3.5. Delipidacja masy bakteryjnej

Do delipidacji 300 mg masy bakteryjnej użyto mieszaniny chloroform:metanol w proporcjach objętościowych 1:2 (v/v) wg metody Bligh i Dyer (Bligh i Dyer, 1959). Bakterie zawieszono w odczynnikach organicznych mieszano przez 4 godziny na mieszadle magnetycznym (WIGO, MS11), a następnie po przeniesieniu do szklanych gilz wirowano przy 6000 obr./min przez 20 minut (Janetzki T23). Zebrano supernatant, a osad zawieszono w nowej porcji chloroformu z metanolem (1:2; v/v). Ekstrakcję lipidów kontynuowano przez kolejne 2 godziny, a po odwirowaniu jak wyżej supernatanty połączono. Do zebranej fazy organicznej dodano chloroform i wodę, tak aby proporcje metanolu:chloroformu:wody wynosiły odpowiednio 2:2:1,8 (v/v/v). Po dokładnym wymieszaniu, materiał wirowano przy 6000 obr./min przez 20 minut. Dolną fazę organiczną zebrano, a następnie zagęszczono na wyparce rotacyjnej (Buchi Rotavapor R). W celu doczyszczenia lipidów od pozostałości białkowych, lipidy zawieszono w mieszaninie heksan:izopropanol 3:2 (v/v). Po dokładnym wymieszaniu materiał wirowano przy 6000 obr./min przez 20 minut. Osad powstały z wytrąconych białek odrzucono, a supernatant zawierający lipidy odparowano w strumieniu azotu, zważono i przechowywano w temperaturze -20°C . Lipidy przeznaczono do analizy za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UPLC-MS/MS, Thermo Fisher Scientific).

3.6. Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (UPLC- MS/MS)

Próbki lipidów wyizolowanych ze szczepów *L. pneumophila* rozpuszczono w chloroformie (6 mg/ml), a następnie poddano ultrasonifikacji i wirowaniu przy 14 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4°C . Supernatanty w objętości 100 μl przeniesiono do fiolek i wysuszono w koncentratorze (Speed vac). Następnie próbki zawieszono w 1 ml mieszaniny B zawierającej 10% chloroformu. Próbki w objętości 3 μl wstrzykiwano do systemu Vanquish UPLC (Thermo Fisher Scientific). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono z zastosowaniem kolumny C18 Accucore Polar Premium HPLC (2,1 x 100 mm; 2,6 μm ; Thermo Fisher Scientific) wyposażonej w odpowiednią prekolumnę o temperaturze 55°C .

Przepływ fazy ruchomej był utrzymywany na stałym poziomie 0,4 ml/min Gradient rozpoczął się od 20% mieszaniny B i wzrastał do 100% w ciągu 8 minut. Następnie rozdział odbywał się w warunkach izokratycznych przez kolejne 7 minut. Po zakończeniu rozdziału układ powracał do warunków początkowych i stabilizował się przez 2,5 minuty. Faza ruchoma A zawierała 60% acetonitrylu, 10 mM mrówczanu amonu i 0,1% kwasu mrówkowego w ultraczystej wodzie. Mobilna faza B składała się z 90% izopropanolu, 10 mM mrówczanu amonu i 0,1% kwasu mrówkowego w ultraczystej wodzie. Lipidy były identyfikowane na podstawie widm mas zarejestrowanych za pomocą spektrometru mas Q Exactive Plus z jonizacją HESI (Thermo Fisher Scientific), pracującego w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Dane MS były zbierane w zakresie od 250 do 1200 m/z, z rozdzielczością MS wynoszącą 70 000, a rozdzielczością MS² zależną od danych wynoszącą 17 500. Do analizy danych wykorzystano oprogramowania LipidSearch firmy Thermo Fisher Scientific.

3.7. Izolacja LPS z masy bakteryjnej (Westphal i Jann, 1965)

Masę bakteryjną zawieszono w wodzie MQ, a następnie dodano buforu fosforanowego w proporcjach objętościowych 1:1 (v/v) (na 1 g masy bakteryjnej odmierzone 29 ml buforu fosforanowego). Dodany bufor fosforanowy miał następujący skład:

- 1) 100 mM bufor fosforanowy o pH 7,0 (0,2M Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,2M NaH₂PO₄ x H₂O);
- 2) 0,05% azydek sodowy;
- 3) 5 mM EDTA.

Masę bakteryjną zawieszoną w buforze fosforanowym, poddano dwukrotnej sonifikacji przez 5 min (sonifikator Elma S100H Elmasonic). Następnie bakterie były trawione lizozymem (Thermo Fisher Scientific, 6 mg lizozymu na 1 g suchej masy bakteryjnej). Następnie materiał inkubowano w temperaturze 4°C przez 16 godzin mieszając na mieszadle magnetycznym. Kwasy nukleinowe trawiono DN-azą i RN-azą (Sigma-Aldrich; 0,3 mg wymienionych enzymów na 1 g suchej masy bakteryjnej) w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Następnie przeprowadzono 20-godzinne trawienie białek proteinazą K (Merck; 0,3 mg enzymu na 1 g suchej masy bakteryjnej) w temperaturze 37°C. Do mieszaniny dodano 90% fenol ogrzany do temperatury 65°C – 68°C w stosunku (1:1; v/v). Po dokładnym wymieszaniu mieszaninę ogrzewano w łaźni wodnej przez 2 godziny w temperaturze 68°C. Ze względu na dużą hydrofobowość badanych bakterii po ekstrakcji LPS całość materiału, bez rozdziału na frakcję fenolową i wodną przenoszono do worków dializacyjnych (Sigma Aldrich) o wysokim stopniu retencji (99,99%) i odcięciu masy cząsteczkowej wynoszącej 12400

(MWCO, *Molecular Weight Cut-Off*). Materiał dializowano przez 3 dni względem wody wodociągowej oraz MQ. Następnie materiał z worków dializacyjnych wstępnie odwirowano (10 000 obr./min, 4°C, 20 min, Sigma 6-16KS). Supernatant poddano ultrawiroowaniu (38 000 obr./min, 4°C, 4 godziny, Beckman), a uzyskane osady po zawieszeniu w wodzie MQ zliofilizowano (liofilizator Christ Alpha 1-2LD Plus) i zważono (**Tabela 2**).

Tabela 2 Masa LPS szczepów dzikich, mutantów i komplementantów *L. pneumophila*.

Nazwa szczepu	Masa LPS [mg]	Względna zawartość LPS w komórkach [%]
Heysham-1	103	1,5
T6-K13	83	1,2
T24-K6-1	51	1,5
130b	30	0,6
16D12	46	0,8
pJBBORF8	32	0,6

3.8. Elektroforeza SDS-PAGE

Heterogenność preparatów LPS uzyskanych z całych komórek bakteryjnych trawionych enzymatycznie wg metody opisanej przez Apicella i wsp. (Apicella i in., 1994) oraz preparatów LPS wyizolowanych poprzez ekstrakcję tych związków z masy bakteryjnej metodą z użyciem 45% fenolu w wodzie (Westphal i Jann, 196) sprawdzano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecylu sodu (SDS) (aparat do elektroforezy Enduro VE10 System Labnet). Przygotowano żel separujący [2,3 ml 30% akrylamid/bisakrylamid (29:1); 1,9 ml bufor żelowy zawierający 36,3 g Tris i 0,3 g SDS w 100 ml wody MQ (pH 8,45); 1,5 ml wody MQ; 0,021 ml 10% nadsiarczan amonu (APS); 0,008 ml tetrametyloetylenodiamina (TEMED)]. Żel wylano między szyby i dla uzyskania wyrównania poziomu nawarstwiono na niego alkohol izoamylowy. Po upływie 30 minut przygotowano żel zagęszczający [0,3 ml 30% akrylamid; 0,5 ml bufor żelowy; 0,9 ml wody MQ; 0,033 ml 10% APS; 0,003 ml TEMED], usunięto alkohol izoamylowy, wylano żel

i włożono między szyby grzebyk. Szyby z zastygniętym żelem separującym i zagęszczającym umieszczono w aparacie do elektroforezy, który napełniono wewnętrznym buforem katodowym (6,055 g Tris; 8,96 g Tricine; 0,5 g SDS w 500 ml wody MQ; pH 8,25) oraz zewnętrznym buforem anodowym (12,11 g Tris w 500 ml wody MQ; pH 8,9). Do przygotowania próbek do elektroforetycznego rozdzielania wykorzystano masę bakteryjną, którą zebrano z podłoża 0,5 M NaCl, następnie odwirowano (8 000 x g; 10 min) i ponownie przepłukano 0,5 M NaCl. Do powstałego osadu bakteryjnego dodano mieszaninę lizującą (1 M Tris HCl o pH 6,8; 2% SDS; 4% 2-merkaptioetanol; 10% glicerol; bromofenol) w proporcji 150 µl na 50 mg mokrej masy bakterii. Lizę komórek prowadzono w 100°C przez 10 minut. Po schłodzeniu do próbek dodano 10 µl roztworu proteinazy K (15 mg/ml; Sigma-Aldrich) i komórki trawiono przez 3 godziny w temperaturze 37°C. Próbkę pozostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Próbkę ogrzewano przez 1 godzinę w 60°C, a następnie przez 10 minut w 100°C. Preparaty LPS-u po zawieszeniu w buforze próbkowym (175 mM Tris/HCl o pH 6,8; 0,25% SDS; 2% glicerol; 0,04% błękit bromofenolowy) ogrzewano w 100°C przez 10 minut, krótko wirowano i wprowadzono do studzienek żelu zagęszczającego. Elektroforezę prowadzono przy natężeniu 15 mA, a po przejściu próbek do żelu separującego, natężenie zwiększono do 35 mA i kontynuowano rozdzielanie przez około 2 godziny. Po rozdzielaniu żel wybarwiano azotanem srebra (Tsai i Frasch, 1982). Markerem molekularnym umożliwiającym przybliżone określenie mas migrujących prążków był preparat LPS *Salmonella enterica* serowar Typhimurium.

3.8.1. Barwienie żelu poliakrylamidowego azotanem srebra (Tsai i Frasch, 1982)

Żel poliakrylamidowy po elektroforezie z rozdzielonymi próbkami inkubowano w mieszaninie utrwalającej (300 ml etanol; 100 ml lodowaty kwas octowy; 600 ml woda MQ) przez 14 godzin w temperaturze pokojowej, kontynuując mieszanie na wytrząsarce laboratoryjnej (10 obr./min; wytrząsarka orbitalna Biogenet PSU-20i). Po usunięciu mieszaniny utrwalającej żel utleniono w 0,7% roztworze nadjodanu sodu [700 mg nadjodanu sodu (Sigma-Aldrich) w 100 ml mieszaniny utrwalającej]. Utlenianie prowadzono przez 5 minut kontynuując mieszanie na wytrząsarce laboratoryjnej. Żel płukano 7-krotnie przez 10 minut w wodzie MQ. Kolejnym etapem było barwienie żelu w mieszaninie barwiącej, którą przygotowano poprzez dodawanie kroplami roztworu azotanu srebra (0,5 g azotanu srebra w 2,5 ml wody MQ) do 14 ml 0,1 M NaOH zawierającego 750 µl amoniaku, a następnie dodanie

57,5 ml wody MQ. Żel barwiono przez 10 minut, a następnie płukano 7-krotnie w wodzie MQ. Do żelu dolano wywoływacz [25 µl formaldehydu (Sigma-Aldrich) w 100 ml wody MQ] i wywoływano do momentu pojawienia się widocznych prążków. Żel zalano 7% kwasem octowym na 10 minut, po czym przepłukano go kilkakrotnie wodą MQ. Elektroforegramy udokumentowano przy użyciu aparatu fotograficznego Nikon DX AF-S Nikkor i opracowano w programie komputerowym Picasa 3.

3.9. Elektrodializa LPS (Galanos i Lüderitz, 1975)

Zliofilizowane preparaty LPS po umieszczeniu w kolumnie wypełnionej bibułą szklaną, oczyszczono od składników lipidowych przez przepłukanie w 10 ml chloroformu i 10 ml acetonu. W celu odparowania odczynników materiał pozostawiono w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Preparaty LPS (10 mg) zawieszono w wodzie MQ z 5% azydkiem sodu i po przeniesieniu do worków dializacyjnych poddano elektrodializie przez 48 godzin (500 mM; 200 V; 40 W; aparat do elektroforezy BioRad) uwzględniając wymianę wody MQ co 4 godziny. Do roztworów LPS po elektrodializie dodano 0,1 M bufor TEA (*Triethanolamine*) (w proporcji 13 µl na 1 mg LPS poddanego elektrodializie), a następnie materiał zliofilizowano, zważono i przeznaczono do indukcji prozapalnych cytokin.

3.10. Izolacja kwasów tłuszczowych z preparatów LPS

Do próbek LPS (3 mg) dodano 1 ml 4 M HCl w wodzie i inkubowano w temperaturze 100°C przez 4 godziny. Po ostudzeniu próbek do temperatury pokojowej roztwór HCl odparowano na wyparce próżniowej (wyparka Büchi). Uwolnione kwasy tłuszczowe poddano trzykrotnej ekstrakcji mieszaniną chloroform:woda w proporcjach objętościowych 1:2 (v/v). Następnie próbki odwirowano przy 5 000 obr./min przez 15 minut (Janetzki T23). Górną wodną fazę odrzucono, a do fazy organicznej dodano 1 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu i odwirowaniu, jak wyżej, fazę organiczną przepuszczono przez kapilarę wypełnioną bezwodnym siarczanem sodu, a następnie odparowano w strumieniu azotu. Uwolnione kwasy tłuszczowe poddano konwersji do estrów metylowych. W tym celu do uwolnionych kwasów tłuszczowych dodano 350 µl roztworu 0,02 M trimetylosililodiazometanu (TMSD) w heksanie oraz 350 µl roztworu 20% metanolu w acetonie. Po dokładnym wymieszaniu próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min, a następnie wysuszono w strumieniu azotu.

Estry metylowe kwasów tłuszczowych przekształcono w trimetylosililowe pochodne dodając 30 μ l roztworu HMDS (*1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane*):TMCS (*Trimethylchlorosilane*):pirydyna w proporcjach objętościowej 3:1:9 (v/v/v) (SYLON HTP, Sigma Aldrich). Kwasy tłuszczowe w formie estrów metylowych analizowano za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS; Agilent 7890A-5975C z kolumną kapilarną HP-5ms).

3.11. Izolacja węglowodanów z preparatów LPS

Do 2 mg preparatów LPS dodano 1 ml 2 M kwasu trifluorooctowego (TFA) i inkubowano w temperaturze 100°C przez 4 godziny w termobloku (Labnet D1301). Po odparowaniu TFA w strumieniu azotu, reszty aminocukrów poddano *N*-acetylacji. W tym celu do próbek dodano 200 μ l bezwodnego metanolu, 40 μ l pirydyny oraz 4 μ l bezwodnika octowego i pozostawiono w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Po 24 godzinach próbki wysuszono w strumieniu azotu. Redukcję grup aldehydowych cukrów do grup hydroksylowych przeprowadzono przez dodanie do preparatów 300 μ l 1 M amoniaku i szczypty borodeuterku sodu (NaBD₄) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. W celu usunięcia boranów, próbki zostały poddane trzykrotnej destylacji z 5% kwasem octowym w metanolu. Po uprzednim wysuszeniu, próbki poddano peracetylacji w celu uzyskania octanów alditoli. Do preparatów dodano 150 μ l bezwodnika octowego i 150 μ l pirydyny, inkubowano w 100°C przez 20 minut, po czym mieszaninę odparowano w strumieniu azotu. Następnie do próbek dodano 5 ml wody i 500 μ l chloroformu. Po dokładnym wymieszaniu próbki odwirowano przy 5000 obr./min przez 15 minut. Fazę organiczną przepuszczoną przez kapilarę wypełnioną bezwodnym siarczanem sodu. Cukry w formie octanów alditoli analizowano z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS).

3.12. Chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS)

Estry metylowe kwasów tłuszczowych oraz cukry w formie octanów alditoli analizowano za pomocą chromatografu gazowego Agilent Technologies 7890AGC sprzężonego ze spektrometrem masowym (XL). Spektrometr masowy wyposażony był w kolumnę HP-5MS (Hewlett Packard) o następujących wymiarach: 30 mm x 0,25 mm. Analizę kwasów i cukrów przeprowadzono przy następującym programie temperaturowym: pierwsze 5 minut

w 150°C, po czym temperatura wzrosła do 310°C (z szybkością 5°C /min) i utrzymywana była przez 10 minut. Rozdziały przeprowadzono w strumieniu helu, który pełnił funkcję gazu nośnego przepływającego przez układ ze stałą prędkością 1 ml/min. Wyniki analizy zapisano w programie MS Data Analysis.

Analizę estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz octanów alditoli przeprowadzono przez porównanie ich czasów retencji z tymi dla standardów oraz na podstawie charakterystycznej fragmentacji na widmach masowych. W spektrach estrów metylowych nasyconych kwasów tłuszczowych dominował jon $m/z=74$, który powstał z przegrupowania McLafferty'ego (Odham i Stenhagen, 1972) oraz jon $m/z=87$, który powstał w wyniku rozerwania wiązania w pozycji między trzecim, a czwartym atomem węgla w cząsteczce. Estrы metylowe 3-hydroksy kwasów tłuszczowych były identyfikowane na podstawie obecności charakterystycznego jonu $m/z=175$ oraz $[M-15]^+$ umożliwiającego określenie długości łańcucha. W spektrach masowych octanów alditoli występowały jony reprezentujące produkty eliminacji kwasu octowego z jonów molekularnych, jony powstające podczas rozpadu wiązań C-C w łańcuchu alditoli, a także jony wtórne powstające w wyniku eliminacji kwasu octowego (60 u) lub ketenu (42 u). Względną zawartość składników obliczono na podstawie pól powierzchni pików chromatograficznych.

3.13. Rozdział LPS na frakcję wysokocząsteczkową i niskocząsteczkową na kolumnie G50

Do oczyszczonych preparatów LPS dodano 8 ml buforu octanowego o pH 4,4 [0,1 M kwas octowy 30,5 ml; 0,1 M octan sodu 19,5 ml; woda MQ 50 ml] i inkubowano w 100°C przez 4 godziny. Po hydrolizie materiał pozostawiono w temperaturze 4°C do następnego dnia w celu wytrącenia lipidu A. Następnie próbki odwirowano przy 12 500 obr./min przez 30 minut (Sigma 6-K16S). Otrzymano osad zawierający lipid A oraz supernatant, w którym zawieszona była część polisacharydowa LPS. Supernatant zagęszczono na wyparce do objętości około 1 ml i naniesiono na kolumnę chromatograficzną wypełnioną złożem Sephadex G-50 (Bio-Rad). Zebrane frakcje oznaczono kolorymetrycznie (Dubois i in., 1956). W tym celu pobrano 125 μ l próbki, 150 μ l 5% fenolu oraz 750 μ l 75% H₂SO₄. Zawartość próbek dokładnie wymieszano i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 75°C przez 30 minut. Po ostudzeniu materiał przeniesiono do studzienek 96-dołkowej płytki titracyjnej. Następnie za pomocą czytnika płytek ELISA odczytano absorbancję przy długości fali 490 nm (czytnik Biogenet ASYS UVM 340). Oznaczenia zawartości cukrów w poszczególnych frakcjach

przeprowadzono z wykorzystaniem uprzednio sporządzonej krzywej wzorcowej. Do przygotowania krzywej wzorcowej wykorzystano roztwór glukozy o stężeniu 1 mg/ml.

Fracje zawierające polisacharyd zamrożono w ciekłym azocie, zliofilizowano i zważono (**Tabela 3**). Następnie materiał rozpuszczono w 1 ml 99% tlenku deuteru - D₂O (Sigma-Aldrich) i liofilizowano w celu zastąpienia wszystkich wymienialnych protonów. Schemat postępowania powtórzono trzykrotnie. Fracje polisacharydowe były analizowane za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*). Próbkę polisacharydu poddano *O*-deacetylacji w 12% amoniaku przez 3 godziny w temperaturze 60°C i ponownie analizowano za pomocą NMR.

Tabela 3 Masa oczyszczonego LPS szczepów dzikich, mutantów i komplementantów *L. pneumophila* poddana ostrej hydrolizie w buforze octanowym oraz masa uzyskanego polisacharydu po rozdziale na kolumnie G50.

Nazwa szczepu	Masa oczyszczonego LPS [mg]	Masa polisacharydu [mg]
Heysham-1	56,8	15,0
T6-K13	38,5	10,0
T24-K6-1	53,4	14,0
130b	39,7	9,0
16D12	39,7	9,0
pJBBORF8	28,5	6,6

3.14. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Widma NMR rejestrowano przy użyciu spektrometru Bruker Avance III 700 MHz w temperaturze 48°C. Widma 1D (¹H) i 2D (homojądrowe ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY i ¹H-¹H ROESY oraz heterojądrowe ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC) rejestrowano przy użyciu standardowego oprogramowania Brukera. Wysokocząsteczkowe frakcje polisacharydów rozpuszczono w 0,6 ml 99,9% D₂O. Jako standard wewnętrzny został użyty aceton (δ H 2,225; δ C 31,45).

3.15. Metody biofizyczne

3.15.1. FLIM

Badania mikroskopowe oddziaływania szczepów *L. pneumophila* z *A. castellanii* oraz z makrofagami linii THP-1 przeprowadzono przy użyciu mikroskopii obrazowania czasowo-rozdzielczego FLIM oraz wykorzystaniu zjawiska bezpromienistego przekazu energii, które umożliwiają precyzyjne określenie odległości pomiędzy oddziaływującymi cząsteczkami w skali nano.

Do analizy FLIM przygotowano zawiesinę badanych szczepów w wodzie MQ (po 100 μ l zawiesiny, $OD_{600}=0,2$), a następnie inkubowano ją z 5 μ M barwnikiem fluorescencyjnym SYTO 9 w 50 mM buforze Tris o pH 7,0 (Thermo Fisher Scientific) w temperaturze 20°C przez 10 minut. Zawiesinę bakterii wirowano przy 5000 x g przez 10 minut, a następnie komórki czterokrotnie przemyto wodą. Zawiesinę komórek w objętości 10 μ l nanoszono na szkiełko nakrywkowe pokryte polilizyną i natychmiast poddano analizie mikroskopowej. Zawiesinę badanych szczepów w wodzie MQ (po 100 μ l zawiesiny, $OD_{600}=0,2$) inkubowano przez 5 minut w temperaturze 20°C z prodanem [6-propionilo-2-dimetyloaminonaftalen] (Merck). Następnie wybarwione bakterie odwirowano i czterokrotnie przepłukano w wodzie MQ, jak opisano powyżej.

Kinetykę interakcji między bakteriami *L. pneumophila*, a komórkami gospodarza określono metodą spektroskopii FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) z użyciem mikroskopowego systemu fluorescencji konfokalnej MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Niemcy). Bakterie *L. pneumophila* znakowane barwnikiem SYTO 9 dodano do komórek *A. castellanii* lub makrofagów THP-1 znakowanych błękitem Nilu (NB) (3 μ l) w dawce 20 MOI lub 50 MOI. Próbkę umieszczono na specjalnych niefluorescencyjnych szkiełkach nakrywkowych (Menzel-Gläser) pokrytych polilizyną i natychmiast poddano analizie. Impulsowe wiązki wzbudzającego światła laserowego (470 nm dla cząsteczek donora energii wzbudzenia elektronowego oraz 635 nm dla akceptora energii) były kierowane do próbki przez lustro dichroiczne (ZT470/488/640/PC), a następnie przez obiektyw o dużej wartości apertury numerycznej 60 \times (NA 1.2). Emisja światła fluorescencyjnego wzbudzonych cząsteczek była zbierana przy użyciu detektora w systemie konfokalnym poprzez przesłonę o średnicy 50 μ m. Sygnały emisji pochodzące z serii próbek znakowanych fluorescencyjnie donorem (SYTO 9), akceptorem (NB) lub parą donor-akceptor były rozdzielane przy użyciu dichro-

icznego rozdzielacza wiązki (620 dcxxr) i filtrowane widmowo przez filtry pasmowo przepuszczalne (520/35 dla donora) i (690/70 dla sygnału pochodzącego od akceptora energii) umieszczone oddzielnie przed dwoma, identycznymi fotodetektorami lawinowymi (τ -SPAD). Lasery pracujące w trybie impulsowym były elektronicznie opóźnione względem siebie (o 50 ns) umożliwiając selektywne wzbudzenie obydwu znaczników. Wzbudzenie laserem czerwonym inicjowało fluorescencję cząsteczki akceptora, podczas gdy wzbudzenie cząsteczki donora (laserem o długości fali 470 nm) powodowało emisję pochodzącą z cząsteczki donora, bądź transfer energii i w efekcie emisję z cząsteczki akceptora. Detekcję fotonów prowadzono w trybie skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów przy użyciu karty pomiarowej TimeHarp 400. Rozdzielczość czasowa zaników fluorescencji została ustawiona na 16 ps. Dane analizowano za pomocą pakietu oprogramowania SymPhoTime (v. 2.3) (PicoQuant). Zaniki intensywności $I(t)$ dla każdej próbki zostały dekonwolowane przy użyciu modelu wielowykładniczego z funkcją odpowiedzi aparatury:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

gdzie τ_i to charakterystyczne czasy zaniku fluorescencji, a α_i to czynniki przedwykładnicze (amplitudy). Średni czas życia obliczono na podstawie wzoru ważonego amplitudą:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i}$$

Następnie obliczono średnią efektywność transferu energii wzbudzenia elektronowego E_T według wzoru:

$$E_T = 1 - \frac{\langle \tau_{DA} \rangle}{\langle \tau_D \rangle}$$

gdzie $\langle \tau_{DA} \rangle$ i $\langle \tau_D \rangle$ to średnie czasy życia donorów wyrażone amplitudą odpowiednio: w obecności i nieobecności akceptora. Wydajność transferu energii została obliczona dla wszystkich punktów pomiarowych obrazu i przedstawiona w postaci rozkładu na odpowiednich histogramach i obrazach kodowanych kolorami.

Odległość rzeczywistą znaczników donor-akceptor obliczono przy wykorzystaniu odległości Förstera (R_0) wyrażonej wzorem (Lakowicz, 2010):

$$R_0 = 8.79 \times 10^3 [Q_D \kappa^2 n^{-4} J(\lambda)]^{-\frac{1}{6}}$$

gdzie Q_D to wydajność kwantowa fluorescencji donora przy braku akceptora ($Q_D = 0,58$ dla SYTO 9 wyznaczona w płynie fizjologicznym), κ^2 to współczynnik orientacji (tutaj $2/3$), n to współczynnik załamania ośrodka ($n = 1,33$), a $J(\lambda)$ to całka nakładania się widm absorpcji akceptora i emisji donora energii wzbudzenia elektronowego, wyrażona w jednostkach $M^{-1}cm^3$:

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$

$F_D(\lambda)$ oznacza intensywność fluorescencji donora, $\varepsilon_A(\lambda)$ to współczynnik ekstynkcji akceptora wyrażony w jednostkach $M^{-1}cm^{-1}$, a λ to długość fali, wyrażona w jednostkach cm. W oparciu o widma rejestrowane w stanie stacjonarnym oraz molowy dziesiętny współczynnik ekstynkcji dla NB ($18000 M^{-1} cm^{-1}$), odległość Förstera (R_0) pary donor-akceptor SYTO 9-NB wynosi 37 \AA lub $39,5 \text{ \AA}$ w zależności od zastosowanego buforu.

3.16. Metody biologiczne

3.16.1. Test adhezji *L. pneumophila* do komórek *A. castellanii* oraz makrofagów linii THP-1

Hodowle makrofagów/ameb o gęstości 2×10^5 komórek/ml rozlano po 1 ml do dołków sterylnej płytki 24-dołkowej przeznaczonej do hodowli adherentnej (Falcon). Następnie hodowle preinkubowano z $10 \mu M$ cytochalazyną B w DMSO (Sigma-Aldrich), w celu zablokowania fagocytozy. Hodowlę inkubowano przez 2 godziny w $35^\circ C$. Po tym czasie do komórek makrofagów/ameb dodano płynną hodowlę poszczególnych szczepów bakteryjnych w dawce 20 MOI. W celu zsynchronizowania procesu infekcji hodowlę makrofagów/ameb zakażoną bakteriami odwirowano przy $300 \times g$ przez 5 minut (Sigma 6-16KS), a następnie inkubowano przez 30 minut w $35^\circ C$. W kolejnym etapie zebrano płyn hodowlany i trzykrotnie przepłukano dołki 1 ml jałowego płynu PBS w celu usunięcia bakterii niezwiązanych z komórkami eukariotycznymi. Komórki zlizowano 0,01% roztworem Triton X-100, a uzyskaną zawiesinę po rozcieńczeniu wysiano na podłoże BCYE i inkubowano w temperaturze

37°C przez 3 dni w wilgotnej atmosferze wzbogaconej w 5% CO₂ (ESCO CellCulture Incubator). Liczbę zaadsorbowanych bakterii określono na podstawie stosunku miana bakterii, które uległy adhezji do makrofagów/ameb do miana bakterii wysianych z wyjściowych rozcieńczeń hodowli.

3.16.2. Test infekcji *A. castellanii* i makrofagów linii THP-1 przez *L. pneumophila*

Bakterie w dawce 20 MOI dodano do hodowli komórek makrofagów/ameb (gęstość hodowli 2×10^5 komórek/ml) i inkubowano przez 2 godziny w 37°C. Następnie komórki przepłukano 1 ml roztworu PBS oraz dodano gentamycynę (100 µg/ml) i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C, w celu zabicia bakterii, które nie uległy sfagocytowaniu przez komórki eukariotyczne. Komórki poddano lizie 0,01% roztworem Triton X-100, a następnie wysiewano na podłoże BCYE w ustalonych punktach czasowych (0, 24, 48, 72 godzin). W doświadczeniu uwzględniono jednorazową wymianę płynu hodowlanego RPMI 1640 suplementowanego 10% inaktywowaną ciepłem surowicą cielęcą, bez dodatku antybiotyków oraz płynnego podłoża PYG, każdego dnia trwania doświadczenia w zakażonych hodowlach, odpowiednio komórek linii THP-1 oraz *A. castellanii*. Liczbę bakterii infekujących komórki gospodarza ustalono na podstawie obliczenia miana bakterii uwolnionych z zakażonych hodowli w 0, 24, 48 i 72 godzinie trwania infekcji.

3.16.3. Test inwazji *A. castellanii* i makrofagów linii THP-1 przez *L. pneumophila*

Szczepy bakteryjne z 3-dniowej hodowli na podłożu BCYE zostały zebrane za pomocą ezy i odwirowane w płynie PBS (1500 obr./min, 5 min, Sigma 6-K16S), a następnie barwione 0,3 mM rodaminą B (Sigma-Aldrich) przez 25 minut na wytrząsarce laboratoryjnej (10 obr./min; wytrząsarka orbitalna Biogenet PSU-20i). Następnie bakterie 4-krotnie płukano w płynie PBS. Do hodowli makrofagów/ameb o gęstości 2×10^5 komórek/ml dodano wybarwione bakterie i inkubowano w 37°C przez 1 godzinę. Po dwukrotnym przemyciu niezwiązanych bakterii 1 ml roztworu PBS, do komórek dodano 4% roztwór paraformaldehydu (PFA) w celu utrwalenia preparatów i pozostawiono w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Następnie PFA usunięto przez przemycie PBS zawierającym 50 mM glicynę, a do preparatów dodano 10% N-hydroksysukcynimid (NHS, *N-Hydroxysuccinimide*) w buforze

Sörensen. W kolejnym etapie bakterie wyznakowano I-rzędowymi poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi IgG anty-*L. pneumophila* (Abcam; ab20943, 4 mg/ml) sprzężonymi z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC, *Fluorescein Isothiocyanate*) i inkubowano z komórkami gospodarza w 37°C przez 30 minut. Następnie przeprowadzono znakowanie II-rzędowymi kozimi przeciwciałami specyficznymi wiążącymi się z IgG (Alexa Fluor, ab150077, 2 mg/ml) oraz 30-minutową inkubację z komórkami gospodarza w 37°C. Proces inwazji komórek ameb oraz makrofagów linii THP-1 przez badane szczepy *L. pneumophila* obserwowano w laserowym mikroskopie konfokalnym (Zeiss Axiovert 200M) (pow. 630x). Dla każdego szczepu analizowano co najmniej 50 komórek ameb/makrofagów i określono stosunek bakterii wewnątrzkomórkowych do całkowitej liczby bakterii związanych z komórkami za pomocą różnicowego barwienia immunofluorescencyjnego.

3.16.4. Test adhezji *L. pneumophila* do komórek linii A549 i BEAS-2B

Zawiesinę hodowli komórek linii nabłonkowych A549 i BEAS-2B o gęstości 2×10^5 komórek/ml w odpowiednim płynie hodowlanym rozlano po 1 ml do dołków sterylnej dedykowanej do hodowli komórek adherentnych płytki 24-dołkowej (Falcon). Następnie hodowle preinkubowano z 10 μ M cytochalazyną B w DMSO (Sigma-Aldrich) przez 2 godziny w 35°C, po czym do komórek dodano płynną hodowlę badanych szczepów bakteryjnych w dawce infekcyjnej 100 MOI. W celu synchronizacji procesu infekcji zakażone hodowle odwirowano przy 300 x g przez 5 minut (Sigma 6-16KS), a następnie inkubowano przez 2 godziny w 35°C. Kolejnym etapem było zebranie płynu hodowlanego i trzykrotne przepłukanie dołków 1 ml jałowego płynu PBS celem usunięcia bakterii niezwiązanych z komórkami nabłonkowymi. Komórki poddano lizie 0,01% roztworem Triton X-100, a zawiesinę odpowiednio rozcieńczono i wysiano na podłoże BCYE. Posiewy o ustalonym rozcieńczeniu wykonano także z wyjściowych płynnych hodowli szczepów bakteryjnych, wykorzystanych do zakażenia hodowli komórek gospodarza. Bakterie inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 dni w wilgotnej atmosferze wzbogaconej w 5% CO₂ (ESCO Cell Culture Incubator). Na podstawie liczby wyrosłych kolonii, użytego rozcieńczenia oraz objętości wysianej zawiesiny obliczono miano bakterii. Liczbę zaadsorbowanych bakterii określono na podstawie stosunku miana bakterii, które uległy adhezji do komórek linii A549 i BEAS-2B do miana bakterii wysianych z rozcieńczeń wyjściowych hodowli.

3.16.5. Test infekcji komórek linii A549 i BEAS-2B przez *L. pneumophila*

Płynne hodowle bakterii *L. pneumophila* w dawce 100 MOI dodano do hodowli komórek linii A549 i BEAS-2B (gęstość hodowli 2×10^5 komórek/ml) i poddano 2-godzinnej inkubacji w 37°C. Następnie komórki eukariotyczne przepłukano 1 ml roztworu PBS oraz dodano gentamycynę (100 µg/ml) i inkubowano przez 1 godzinę w celu zabicia bakterii, które nie wniknęły do komórki gospodarza. Komórki poddano lizie 0,01% roztworem Triton X-100, a następnie wysiano na podłoże BCYE w ustalonych punktach czasowych trwania infekcji (0, 24, 48, 72 godzin). W czasie każdego dnia doświadczenia jednorazowo wymieniało się płyn hodowlany stanowiący mieszaninę (1:3; v/v) roztworu PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} z 0,25% roztworem trypsyny z dodatkiem 0,02% EDTA (Biological Industries). Liczbę bakterii infekującą komórki linii nabłonkowych A549 i BEAS-2B ustalono na podstawie obliczonego miana bakterii z zakażonych hodowli w 0, 24, 48 i 72 godzinie trwania infekcji.

3.17. Badanie poziomu cytokin prozapalnych w płynie pochodzącym z makrofagów linii THP-1 stymulowanych *L. pneumophila*

Zróznicowane komórki linii THP-1 zainfekowano bakteriami *L. pneumophila* szczep: Heysham-1, T6-K13, T24-K6-1 oraz 130b, 16D12 i pJBBORF8 w dawce infekcyjnej 20 MOI i 100 MOI. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C w atmosferze wzbogaconej w CO_2 , bakterie, które nie zostały sfagocytowane przez makrofagi, zabito dodając gentamycynę w stężeniu 100 mg/ml. Po 1 godzinie inkubacji z antybiotykiem komórki odwirowano przy 1500 obr./min przez 5 minut. Następnie supernatant usunięto, makrofagi przepłukano trzykrotnie płynem PBS, po czym dodano 1 ml płynu hodowlanego RPMI 1640 suplementowanego 10% inaktywowaną ciepłem surowicą cielęcą. Makrofagi bez dodatku bakterii wykorzystano jako kontrolę negatywną. Po upływie 4 godzin (dla określania poziomu TNF- α , *Tumour Necrosis Factor - alpha*), 24 godzin (- IL-6, *Interleukin-6*) i 72 godzin (- IFN- γ , *Interferon - gamma*) inkubacji w temperaturze 37°C w atmosferze z dodatkiem CO_2 , komórki odwirowano przy 1500 obr./min przez 5 minut. Uzyskany supernatant został natychmiast zebrany i przechowywany w temperaturze -80°C, do czasu oznaczenia stężenia cytokin. Poziom TNF- α , IL-6 i IFN- γ zmierzono metodą ELISA korzystając z komercyjnego

zestawu firmy Biorbyt Ltd według zaleceń producenta. Minimalne wykrywalne stężenia wynosiły 15,6 pg/ml oraz 4,69 pg/ml odpowiednio dla TNF- α i IFN- γ oraz IL-6. Wszystkie doświadczenia zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.18. Badanie poziomu cytokin prozapalnych w komórkach linii THP-1 indukowanych LPS wyizolowanymi z komórek *L. pneumophila*

Do zróżnicowanych komórek linii THP-1 dodano LPS wyizolowany ze szczepów Heysham-1, T6-K13, T24-K6-1 oraz 130b, 16D12, pJBBORF8 w stężeniu 500 oraz 1000 ng/ml. Pomiar poziomu indukcji cytokin (TNF- α , IL-6, IFN- γ) został wykonany w analogiczny sposób do schematu postępowania wykorzystanego w badaniu poziomu cytokin prozapalnych w komórkach linii THP-1 stymulowanych całymi komórkami *L. pneumophila*.

3.18.1. Oznaczenie poziomu TNF- α

Do 96-dołkowej płytki zestawu komercyjnego pokrytej immobilizowanym przeciwciałem specyficznym dla TNF- α dodano standardowe roztwory przeznaczone do przygotowania krzywej kalibracyjnej (zakres stężeń od 15,6 pg/ml do 1000 pg/ml) oraz badane próby (100 μ l na dołek). Płytkę inkubowano w 37°C przez 90 minut. Następnie usunięto zawartość dołków, dodano do nich po 100 μ l biotynylowanego przeciwciała anti-TNF- α i inkubowano w 37°C przez 1 godzinę. Ponownie usunięto zawartość dołków i 3-krotnie przepłukano płynem PBS. Kolejnym etapem było dodanie do każdego z dołków po 100 μ l kompleksu awidyna/biotyna sprzężonego z enzymem peroksydazą chrzanową (ABC-HRP, *Avidin-Biotin-Complex - Horseradish Peroxidase*) i inkubacja w 37°C przez 30 minut. W celu usunięcia niezwiązanego kompleksu ABC-HRP dołki zostały 5-krotnie przepłukane płynem PBS. Następnie наносzono substrat dla peroksydazy, w celu wywołania reakcji barwnej. Chromogennym substratem była tetrametylobenzydyna (TMB, *Tetramethylbenzidine*), która w wyniku reakcji utleniania prowadziła do powstania produktu o niebieskim zabarwieniu. Inkubację z TMB prowadzono bez dostępu światła przez 20 min w 37°C, po czym zatrzymano reakcję dodając 2 N kwas siarkowy, prowadzący do gwałtownej zmiany zabarwienia zawartości dołków na kolor żółty. W ciągu 30 minut po zahamowaniu reakcji odczytano ekstynkcję przy użyciu czytnika do mikropłytek Biogenet ASYS UVM 340 przy długości fali $\lambda=450$ nm.

3.18.2. Oznaczenie poziomu IL-6

W teście immunoenzymatycznym służącym do pomiaru stężenia IL-6 w badanych próbkach wykorzystano przeciwciała specyficzne dla ludzkiej IL-6, immobilizowane na 96-dołkowej płytce titracyjnej, do której dodano standardowe roztwory przeznaczone do przygotowania krzywej kalibracyjnej (zakres stężeń od 3,9 pg/ml do 250 pg/ml) oraz badane próby (100 µl na dołek). Po 90 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej usunięto zawartość dołków oraz 3-krotnie przepłukano je płynem PBS. Następnie dodano po 100 µl biotynylowanego przeciwciała anti-IL-6 i inkubowano w 37°C przez 1 godzinę. Ponownie usunięto zawartość dołków i 3-krotnie przepłukano je płynem PBS w celu wyeliminowania niezwiązanych biotynylowanych przeciwciał. Następnie dodano do każdego z dołków po 100 µl streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową i inkubowano w 37°C przez 45 minut. Po usunięciu zawartości dołków oraz 5-krotnym przepłukaniu płynem PBS dodano do nich substrat dla peroksydazy – TMB, po czym inkubowano bez dostępu światła przez 30 minut w 37°C. Następnie przerwano reakcję poprzez dodanie 2 N kwasu siarkowego, w wyniku czego nastąpiła nagła zmiana zabarwienia zawartości dołków z niebieskiej na żółtą. W ciągu 30 minut po zahamowaniu reakcji odczytano ekstynkację przy użyciu czytnika do mikropłytek Biogenet ASYS UVM 340 przy długości fali $\lambda=450$ nm.

3.18.3. Oznaczenie poziomu IFN- γ

Do 96-dołkowej płytki titracyjnej pokrytej immobilizowanym przeciwciałem specyficznym dla IFN- γ dodano standardowe roztwory do przygotowania krzywej kalibracyjnej (zakres stężeń od 12,5 pg/ml do 400 pg/ml), badane próby oraz drugorzędowe, biotynylowane przeciwciała anti-IFN- γ . Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej (18°C - 25°C) przez 2 godziny. Następnie poprzez 3-krotne przepłukanie dołków płynem PBS usunięto niezwiązane drugorzędowe przeciwciała. Kolejnym etapem było dodanie streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową oraz inkubacja w temperaturze pokojowej (18°C - 25°C) przez 30 minut. Po ponownym 3-krotnym przepłukaniu dołków dodano do nich substrat TMB i inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie w celu zahamowania przebiegu barwnej reakcji do dołków dodano 2N kwas siarkowy, po czym odczytano ekstynkację przy pomocy czytnika do mikropłytek Biogenet ASYS UVM 340 przy długości fali $\lambda=450$ nm.

3.18.4. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki wyrażono jako wartość średnią wraz z odchyleniem standardowym dla trzech niezależnych doświadczeń, z których każde zostało wykonane w trzech powtórzeniach. Wyniki były analizowane statystycznie za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA, testu post hoc Tukey'a oraz testu t-Studenta (STATISTICA software version 13.3, StatSoft Inc., Tulsa, OK., USA). Wartości $P \leq 0.05$ przyjęto jako istotne statystycznie.

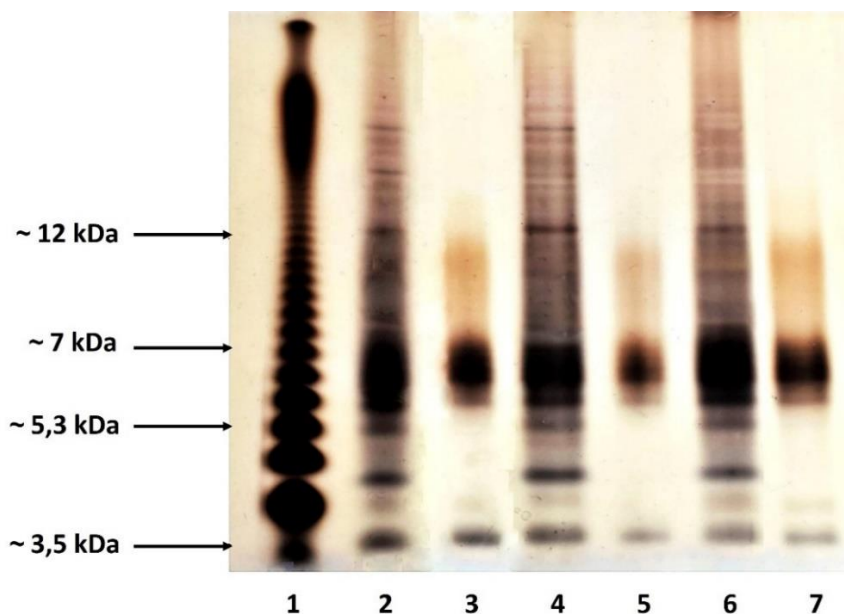
IV WYNIKI BADAŃ

4.1. Analiza struktury LPS *L. pneumophila*

4.1.1. Elektroforeza SDS-PAGE

Heterogenność preparatów LPS uzyskanych z całych komórek bakteryjnych *L. pneumophila* trawionych enzymatycznie wg metody opisanej przez Apicella i wsp. (Apicella i in., 1994) oraz preparatów LPS wyizolowanych z masy bakteryjnej 45% fenolem w wodzie (Westphal i Jann, 1965) sprawdzano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Markerem molekularnym umożliwiającym przybliżone określenie mas migrujących prążków był preparat LPS *Salmonella enterica* serowar Typhimurium.

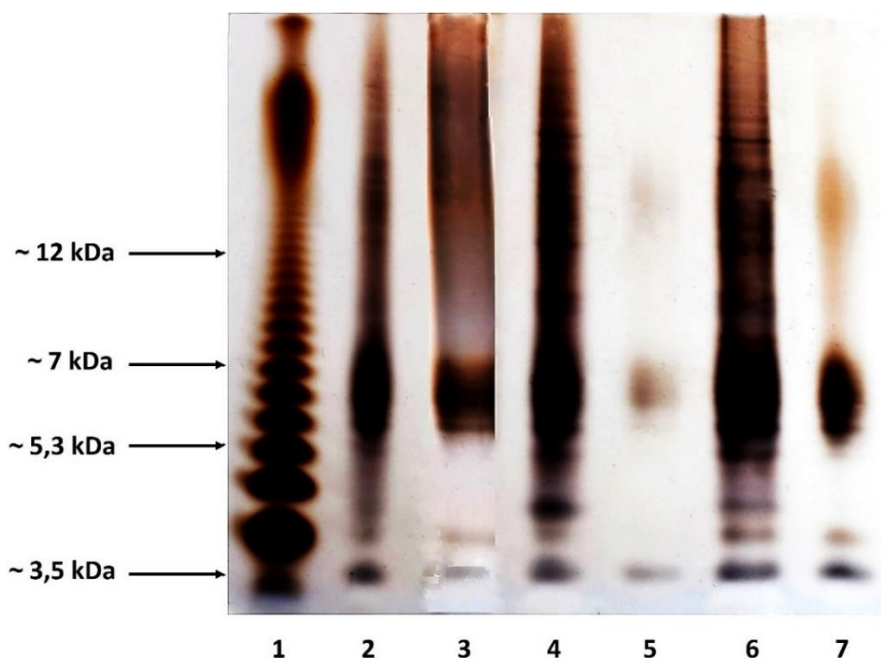
Profile elektroforetyczne LPS szczepów: Heysham-1, mutantu T6-K13 oraz komplementanta T24-K6-1 nie wykazały znaczących różnic (linia 2, 4, 6) (Ryc. 10).



Ryc. 10 Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE lipopolisacharydów wyizolowanych z komórek metodą Apicella i in. (LPS-A) oraz wyizolowanych metodą (45% roztwór fenolu w wodzie, LPS-WJ) ze szczepu dzikiego Heysham-1, mutantu T6-K13 oraz komplementanta T24-K6-1. Studzienka: 1 – LPS *Salmonella enterica* serowar Typhimurium (1 µg), wzorzec, 2 – LPS-A Heysham-1 (4 µg), 3 – LPS-WJ Heysham-1 – (0,8 µg), 4 – LPS-A T6-K13 - (4 µg), 5 – LPS-WJ T6-K13 - (0,8 µg), 6 – LPS-A T24-K6-1 - (4 µg), 7 – LPS-WJ T24-K6-1 - (2 µg).

W preparatach LPS badanych szczepów w zakresie masy powyżej 3,5 kDa w szczepie dzikim i w komplementancie widoczny jest prążek, który nie występuje na elektroforegramie mutantu T6-K13 (linia 3, 5, 7). Ta nieznaczna różnica może być wynikiem zmian strukturalnych LPS lub nałożenia na żel mniejszej ilości preparatu LPS-WJ T6-K13 w porównaniu do dwu pozostałych (LPS-WJ Heysham-1 i T24-K6-1). Obrazy rozdziału elektroforetycznego preparatów LPS uzyskanych wg procedury Apicella zawierają więcej ostro zarysowanych pojedynczych prążków. Prążki te mogą reprezentować białka lub lipobiałka, które nie ulegają trawieniu lub ich trawienie nie było pełne w warunkach opisanych w pracy Apicella i wsp. (Apicella i in., 1994).

Porównanie profilów elektroforetycznych szczepu dzikiego *L. pneumophila* 130b, mutantu 16D12 oraz komplementanta pJBBORF8 wskazuje, że prążek, który wyraźnie widać w okolicach masy 4,4 kDa w LPS-A 16D12 jest zdecydowanie bardziej intensywny w porównaniu do odpowiednich prążków LPS-A szczepu dzikiego i komplementanta (linia 2, 4, 6) (Ryc. 11).



Ryc. 11 Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE lipopolisacharydów wyizolowanych z komórek metodą Apicella i in. (LPS-A) oraz wyizolowanych metodą (45% roztwór fenolu w wodzie, LPS-WJ) ze szczepu dzikiego 130b, mutantu 16D12 oraz komplementanta pJBBORF8. Studzienka: 1 – LPS *Salmonella enterica* serowar *Typhimurium* (1 μ g) wzorzec, 2 – LPS-A 130b (4 μ g), 3 – LPS-WJ 130b – (0,5 μ g), 4 – LPS-A 16D12 - (4 μ g), 5 – LPS-WJ 16D12 - (2 μ g/1 μ L), 6 – LPS-A pJBBORF8 - (4 μ g), 7 – LPS-WJ pJBBORF8 - (1 μ g).

W profilu elektroforetycznym LPS-WJ izolowanego z mutantu 16D12 nie występuje prążek, który w LPS-WJ szczepu dzikiego i komplementancie widoczny jest tuż powyżej masy 3,5 kDa. Mutant 16D12 nie wytwarzał lub wytwarzał jedynie niewielkie ilości wysokocząsteczkowej frakcji LPS (powyżej 12 kDa), która występowała w szczepie dzikim 130b oraz w komplementancie pJBBORF8 (linia 3, 5, 7).

4.1.2. Skład kwasów tłuszczowych LPS *L. pneumophila*

W następnym etapie badań przeprowadzono analizę składu kwasów tłuszczowych LPS, wyizolowanych metodą 45% fenol w wodzie, szczepów dzikich Heysham-1 i 130b oraz mutantów T6-K13 i 16D12, a także szczepów komplementacyjnych T24-K6-1 i pJB-BORF8.

LPS badanych szczepów *L. pneumophila* charakteryzował się dużą różnorodnością 3-hydroksykwasów, które zawierały zarówno proste, jak i rozgałęzione łańcuchy (*izo*, *anteizo*) o długości od 12 do 22 atomów węgla w cząsteczce. Wśród tych kwasów dominowały: rozgałęziony 3-OH 14:0 oraz 3-OH 20:0. Spośród nasyconych kwasów tłuszczowych w największej ilości występowały kwasy 16:0 rozgałęziony oraz o prostym łańcuchu. W badanych preparatach występowały również długołańcuchowe kwasy tłuszczowe: 27-okso-oktakozanowy [28:0(27-okso)], heptakozano-1,27-diowy (27:0-diowy) oraz nonakozano-1,29-diowy (29:0-diowy) (**Tabela 4**).

Tabela 4 Względna zawartość (%) kwasów tłuszczowych występujących w LPS szczepów *L. pneumophila*.

Czas Retencji (min)	Kwas tłuszczowy	Heysham-1	T6-K13	T24-K6-1	130b	16D12	pJBBORF8
		Względna zawartość [%]					
10,07	14:0	1	1	1	1	1	1
11,18	3-OH 12:0	1	tr	1	1	1	1
12,39	<i>n</i> 15:0	5	2	4	5	4	4
13,01	<i>n</i> 15:0	1	1	1	tr	tr	1

14,32	<i>br</i> 16:0	24	25	25	12	18	13
14,51	<i>br</i> 3-OH 14:0	11	7	10	4	9	4
15,07	<i>n</i> 16:0	10	13	9	9	12	10
15,24	3-OH 14:0	2	1	2	1	2	1
16,33	<i>i</i> 17:0	1	1	1	1	1	1
16,49	<i>a</i> 17:0	6	6	6	6	8	6
16,61	3-OH 15:0	tr	tr	tr	tr	1	tr
17,05	<i>n</i> 17:0	2	2	2	1	1	1
17,74	<i>br</i> 2,3-di-OH 14:0	2	tr	2	1	2	1
18,39	2,3-di-OH 14:0	1	tr	1	1	tr	1
18,92	18:0	5	8	6	10	10	10
20,73	19:0	1	1	1	1	1	1
22,43	20:0	6	7	7	6	2	5
23,99	3-OH 19:0	1	1	1	tr	tr	tr
24,07	21:0	1	1	1	tr	1	1
24,95	3-OH 20:0	tr	tr	tr	tr	1	tr
25,52	<i>br</i> 3-OH 20:0	5	7	6	4	9	5
25,70	22:0	1	1	1	1	tr	1
27,01	<i>br</i> 3-OH 21:0	1	2	1	1	1	1
27,05	3-OH 21:0	tr	2	tr	tr	tr	tr
27,96	<i>br</i> 3-OH 22:0	tr	1	tr	tr	1	tr
28,48	3-OH 22:0	1	2	1	tr	2	1
36,65	28:0(27-okso)	4	2	4	18	6	16
36,77	27:0-diowy	7	6	6	15	6	14
39,36	29:0-diowy	tr	tr	tr	1	tr	tr

Objaśnienia: *tr* – śladowa ilość, *br* – rozgałęziony łańcuch, *a* – anteizo, *i* – izo, *n* – nierozgałęziony łańcuch.

Szczep dziki Heysham-1 syntetyzował 2-krotnie więcej kwasu *a*15:0 (5%), 3-OH 14:0 (2%) i 28:0(27okso) (4%) oraz o 4% więcej rozgałęzionego kwasu 3-OH 14:0 w porównaniu do mutantu T6-K13 (7%). Szczep dziki wykazywał śladową zawartość kwasów 3-OH 21:0 oraz *br* 3-OH 22:0, które w mutancie T6-K13 stanowiły odpowiednio 2% i 1% wszystkich kwasów tłuszczowych. Szczep T6-K13 syntetyzował więcej o 3% kwasu *n*16:0 oraz *n*18:0 w porównaniu do szczepu dzikiego. Szczep T6-K13 charakteryzował się występowaniem śladowej ilości kwasów 3-OH 12:0, *br* 2,3-di-OH 14:0 oraz 2,3-di-OH 14:0, które w szczepie dzikim stanowiły odpowiednio 1%, 2% oraz 1%. W porównaniu do mutantu szczep Heysham-1 wyróżniał się wyższą o 3% zawartością kwasów długołańcuchowych: 28:0(27-okso) i (27:0-diowy), które łącznie stanowiły 11% wszystkich kwasów obecnych w LPS tego szczepu.

Szczep dziki 130b charakteryzował się około 2-krotnie niższą zawartością rozgałęzionych kwasów 3-OH 14:0 (4%) oraz 3-OH 20:0 (4%) w porównaniu do mutantu 16D12, których zawartość w tym szczepie wynosiła 9%. Szczep 130b syntetyzował o 6% mniej kwasu *br*16:0 oraz o 3% mniej kwasu *n*16:0 niż mutant 16D12. Szczep dziki zawierał 3-krotnie więcej kwasu 20:0 w porównaniu do mutantu 16D12. Szczep 130b wyróżniał się wysoką zawartością kwasów długołańcuchowych: 28:0(27-okso) i (27:0-diowy), które łącznie stanowiły 33% wszystkich kwasów obecnych w LPS tego szczepu. Mutant 16D12 charakteryzował się 3-krotnie mniejszą zawartością kwasu 28:0(27-okso) oraz 2,5-krotnie mniejszą ilością kwasu 27-diowego w porównaniu do szczepu dzikiego.

Analiza porównawcza składu kwasów tłuszczowych LPS badanych szczepów wykazała różnice ilościowe między szczepami dzikimi *L. pneumophila* i ich mutantami. Profil kwasów tłuszczowych szczepów komplementacyjnych był zbliżony do profilu szczepów dzikich *L. pneumophila*.

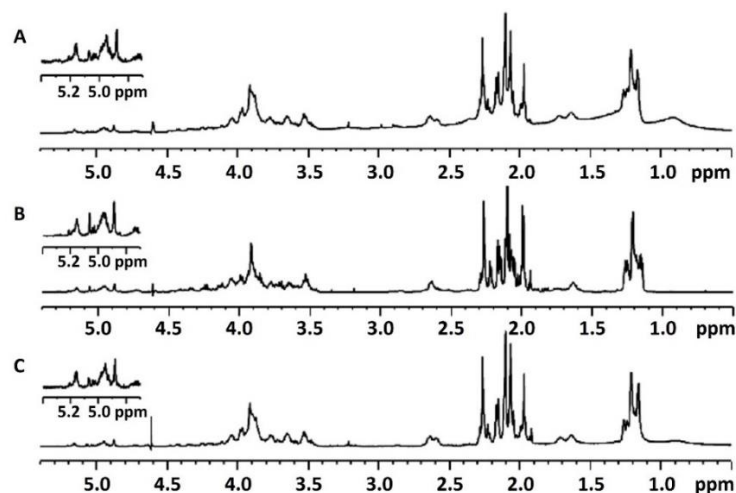
4.1.3. Skład węglowodanów LPS *L. pneumophila*

Analiza cukrów w formie octanów alditoli preparatów LPS badanych szczepów *L. pneumophila* wykazała występowanie następujących cukrów: glukozaminy (31%), mannozy (28%), glukozy (15%), ramnozy (12%), chinowozaminy (12%), 2,3-diamino-2,3-dideoksy-glukopizanozy (2%). Na chromatogramach występowały również piki wskazujące na produkty rozpadu kwasu legionaminowego. Dominującym cukrem wszystkich preparatów była glukozamina, która stanowiła 31% zawartości cukrów. Preparaty LPS nie wykazały różnic w zawartości poszczególnych cukrów.

4.11.4. Struktura wysokocząsteczkowego polisacharydu *L. pneumophila*

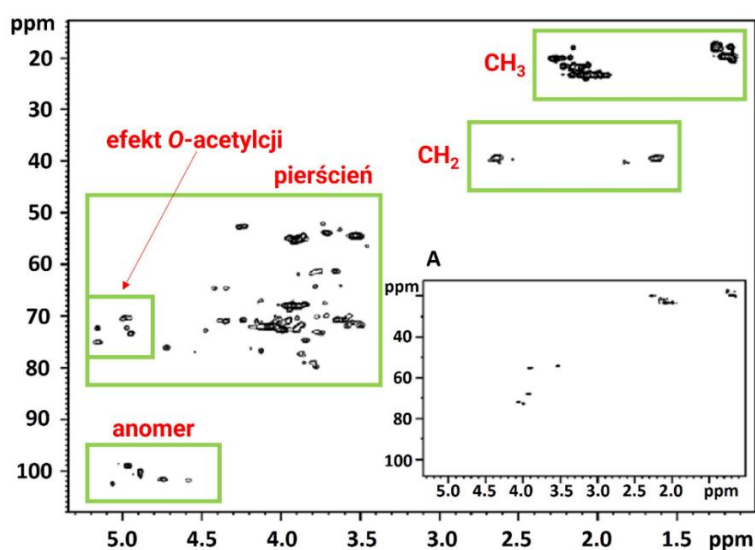
Fracje zawierające wysokocząsteczkowy polisacharyd szczepów dzikich *L. pneumophila* (Heysham-1, 130b), mutantów (T6-K13, 16D12) oraz szczepów komplementacyjnych (T24-K6-1, pJBBORF8) uzyskane po rozdziale na kolumnie chromatograficznej G50 poddano analizie za pomocą spektroskopii NMR.

Profile widm protonowych magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) polisacharydów szczepów Heysham-1, T6-K13 i T24-K6-1 były bardzo podobne (**Ryc. 12**). Na widmach zidentyfikowano sygnały protonów w zakresach charakterystycznych dla polisacharydów i ich niecukrowych podstawników: protonów anomerycznych (δ 4,5–5,2), tzw. protonów z pierścienia cukrowego (δ 3,4–4,5), protonów metylowych 6-deoksymonosacharydów (δ 1,1–1,3) oraz protonów grup metylowych z grup acetylowych (δ 1,9–2,4). Wstępna analiza widm ^1H NMR w zakresie anomerycznym wykazała wysoką heterogenność polisacharydów, o czym świadczy duża liczba sygnałów o różnej intensywności. Występowanie heterogenności polisacharydów potwierdziła również duża liczba sygnałów o różnym natężeniu w zakresie charakterystycznym dla grup acetylowych (δ 1,9–2,4). Ponadto stwierdzono dużą różnicę w intensywności sygnałów protonów pierścienia cukrowego (pochodzących od kwasu legionaminowego) w porównaniu z sygnałami z zakresu anomerycznego (pochodzących od monosacharydów tworzących część rdzeniową), co potwierdziło, że polisacharyd ma stosunkowo dużą masę cząsteczkową. Bardziej szczegółowe porównanie badanych polisacharydów wymagało rejestracji i analizy widm korelacyjnych (2D NMR), które dostarczyły informacji o przesunięciach chemicznych sygnałów protonów i atomów węgla oraz ich wzajemnych połączeniach.



Ryc. 12 Widma ^1H NMR (39°C , 700 MHz) polisacharydów *L. pneumophila* szczepu: **A)** Heysham-1; **B)** T6-K13; **C)** T24-K6-1. W lewym górnym rogu każdego widma dołączono powiększony obszar anomeryczny.

Widmo HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), dostarczające informacji o sprzężeniach ^1H - ^{13}C przez jedno wiązanie, zarejestrowane dla polisacharydu mutantu T6-K13 potwierdziło wnioski wynikające z analizy widm ^1H NMR. Na widmie tym zidentyfikowano charakterystyczne obszary pików krzyżowych pochodzących od grup metylowych ($-\text{CH}_3$), grup metylenowych ($-\text{CH}_2$), anomerycznych atomów węgla i protonów oraz pozostałych atomów węgla i protonów z reszt cukrowch (**Ryc. 13**).



Ryc. 13 Widmo HSQC NMR (39°C , 700 MHz) polisacharydu *L. pneumophila* szczepu T6-K13. Zielone ramki grupują piki krzyżowe z podobnych układów ^1H - ^{13}C . Wykres A) Widmo prezentujące piki krzyżowe jedynie z sygnałów protonowych o dużej intensywności na widmie ^1H NMR.

W analizie najbardziej intensywnych sygnałów na widmie HSQC zarejestrowanym dla polisacharydu mutantu T6-K13 zidentyfikowano pięć pików krzyżowych pochodzących od grup CH przy wartościach: 1) δ 4,057/72,6; 2) δ 3,994/72,72; 3) δ 3,920/67,91; 4) δ 3,913/55,43 i 5) δ 3,529/54,46, dwa piki krzyżowe jednej grupy metylenowej przy δ 2,635/1,630/39,51, jeden pik krzyżowy grupy metylowej przy δ 1,202/19,72, a także kilka pików krzyżowych z grup acetylowych zawierających grupy metylowe (**Ryc. 13A**). Na podstawie widma TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) stwierdzono, że wszystkie piki krzyżowe (z wyjątkiem sygnałów pochodzących od grup acetylowych) należą do jednego układu spinowego. Widmo COSY (*Correlation Spectroscopy*) zostało wykorzystane do określenia kolejności protonów w układzie spinowym począwszy od grupy metylowej. Dodatkowo widmo HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) dostarczające informacji o sprzężeniach ^1H - ^{13}C przez 2 i więcej wiązań wykorzystano do przypisania dwóch czwartorzędowych atomów węgla: C-2 i C-1, odpowiednio δ 101,87 i δ 174,36. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów wszystkich atomów węgla i protonów polisacharydu określono na podstawie widm 2D NMR, mianowicie widm homokorelacyjnych COSY i TOCSY oraz widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC (**Tabela 5**).

Tabela 5 Przesunięcia chemiczne protonów - ^1H oraz atomów węgla - ^{13}C określone na podstawie widm 2D NMR (700 MHz) zarejestrowanych dla polisacharydu wyizolowanego z mutantu T6-K13.

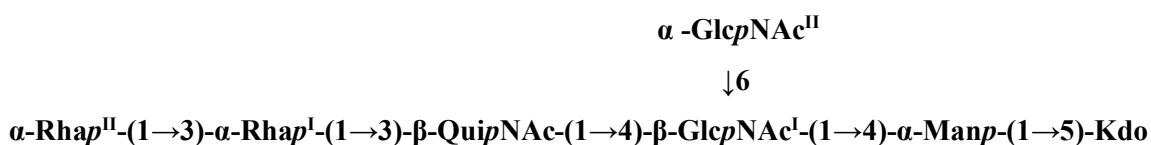
Reszta/ podstawnik	Przesunięcia chemiczne (ppm) ^1H i ^{13}C								
	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9
\rightarrow 4)- α -Legp-	-	-	2,635/1,630	4,057	3,529	3,994	3,913	3,920	1,202
(2 \rightarrow	174,36	101,87	39,51	72,06	54,46	72,72	55,43	67,91	19,72
N-acetylowy	-	2,103							
	175,24	23,29							
N-acetimidoi-	-	2,264							
lowa	167,73	20,11							

Identyfikację reszty cukrowej przeprowadzono poprzez porównanie wyników analiz spektroskopowych z danymi literaturowymi (Knirel i in., 1994; Knirel i in., 1996(a); Knirel i in., 1997; Edebrink i in., 1996). Wartości przesunięć chemicznych sygnałów w widmie

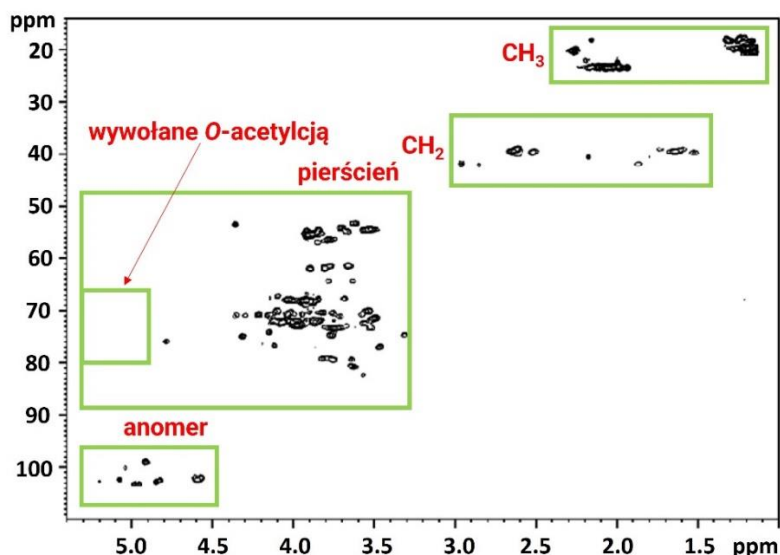
polisacharydu mutantu T6-K13 (**Tabela 5**) były praktycznie identyczne z danymi przedstawionymi dla łańcucha O-specyficznego *L. pneumophila* sg 1 przez Knirel i wsp. (Knirel i in., 1994). Stosunkowo wysoka wartość przesunięcia chemicznego dla C4 w reszcie ($\rightarrow 4$)- α -GlcP-(2 \rightarrow) polisacharydu szczepu T6-K13 (δ 72,06 ppm) wskazywała na pozycję podstawienia. Polisacharyd szczepu T6-K13 *L. pneumophila* jest homopolimerem zbudowanym z reszt kwasu 5-acetamidyno-7-acetamido-3,5,7,9-tetradeksoxy-D-glicero-D-galakto-nonulozonowego połączonych wiązaniami 2 \rightarrow 4.

Analiza widm NMR zarejestrowanych dla polisacharydów szczepu dzikiego Heysham-1 i komplementanta T24-K6-1 wykazała takie same wartości przesunięć chemicznych sygnałów, jak dla polisacharydu mutantu T6-K13. Praktycznie wszystkie sygnały w zakresie protonów anomerycznych (^1H - δ 4,5–5,2) na widmach ^1H NMR (700 MHz) polisacharydów *L. pneumophila* szczepu Heysham-1, T6-K13 i T24-K6-1, charakteryzujące się stosunkowo niską intensywnością, pochodziły od reszt cukrowych, z których zbudowana była część rdzeniowa (**Ryc. 12**). Duża liczba pików krzyżowych ze stosunkowo dużymi wartościami przesunięć chemicznych w domenie protonowej widma HSQC wskazywała na wysoki stopień O-acetylacji (**Ryc. 13**). Jest to zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na wysoki stopień acetylacji części rdzeniowej LPS *L. pneumophila* sg 1 (Knirel i in., 1996(b)).

Porównanie zarejestrowanych widm z danymi literaturowymi pozwoliło na wstępną identyfikację sygnałów i zaproponowanie następującej możliwej struktury części rdzeniowej LPS *L. pneumophila* szczepu Heysham-1 (Knirel i in., 1996(b)):

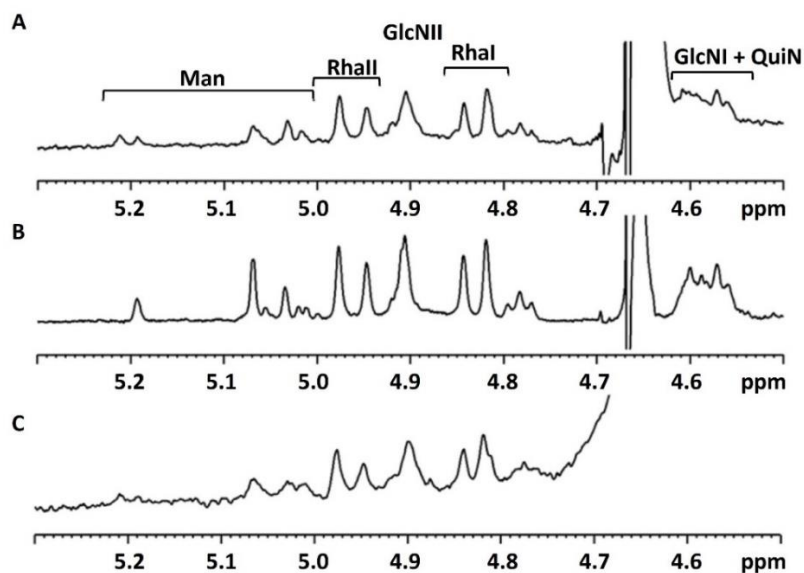


Widmo HSQC zarejestrowane dla O-deacetylowanej próbki polisacharydu T6-K13 potwierdziło przewidywany duży stopień acetylowania polisacharydu. W obszarze charakterystycznym dla sygnałów przesuniętych w kierunku wyższych wartości przesunięć chemicznych na skutek O-acetylowania nie zaobserwowano obecności żadnych pików krzyżowych (**Ryc. 15**) a widma protonowe w zakresie anomerycznym znacząco uległy uproszczeniu (**Ryc. 14**).



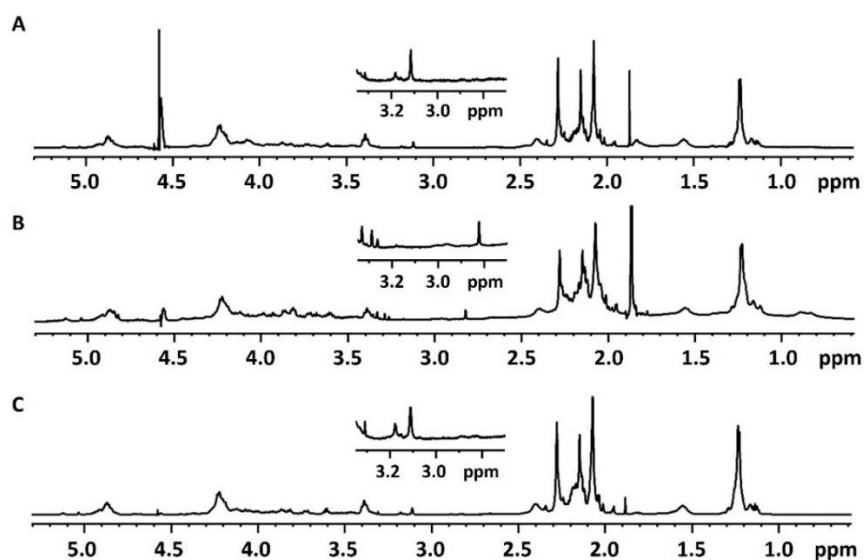
Ryc. 14 Widmo HSQC NMR (39°C, 700 MHz) *O*-deacetylowanego polisacharydu szczepu T6-K13. Zielone ramki grupują piki krzyżowe z podobnych układów ^1H - ^{13}C .

Widma ^1H NMR wszystkich analizowanych próbek *O*-deacetylowanych polisacharydów *L. pneumophila* wykazały duże podobieństwo. W widmach zarejestrowanych dla polisacharydu szczepu Heysham-1, T6-K13 i T24-K6-1 zarówno dla RhaI, jak i RhaII zidentyfikowano dwa sygnały anomeryczne. Porównanie anomerycznych obszarów widm ^1H NMR *O*-deacetylowanych polisacharydów badanych szczepów wykazało, że widma polisacharydów szczepu Heysham-1 i T24-K6-1 są prawie identyczne (**Ryc. 15**). Różnią się one jednak nieco od widma ^1H NMR mutantu T6-K13 w zakresie sygnałów anomerycznych protonów. Duża liczba anomerycznych sygnałów przypisanych reszcie mannozy wynikała z obecności różnych form reszty Kdo (efekt odszczepienia lipidu A), do której przyłączona jest reszta mannozy.



Ryc. 15 Anomeryczne obszary widm ^1H NMR (39°C , 700 MHz) *O*-deacetylowanych polisacharydów *L. pneumophila* szczepu: **A)** Heysham-1; **B)** T6-K13; **C)** T24-K6-1. Man – mannoza; RhaI/II – ramnoza I/II; GlcNII – glukozamina II; GlcNI + QuiN – glukozamina I + chinowozamina.

Profile widm ^1H NMR polisacharydów szczepów *L. pneumophila* były bardzo podobne (**Ryc. 16A**) szczep dziki 130b; **B)** mutant 16D12; **C)** komplementant pJBBORF8).



Ryc. 16 Widma ^1H NMR (39°C , 700 MHz) polisacharydu *L. pneumophila* szczepu: **A)** 130b; **B)** 16D12; **C)** pJBBORF8. Na widmach umieszczono powiększone fragmenty widm w zakresie 2,7-3,3 ppm.

Na widmach zidentyfikowano sygnały protonów w zakresach charakterystycznych dla polisacharydów i ich niecukrowych podstawników: protonów anomerycznych (δ 4,6–5,2), tzw. protonów z pierścienia cukrowego (δ 3,4–4,5), protonów metylowych 6-deoksymonosacharydów (δ 1,1–1,3) oraz protonów grup metylowych z grup acetylowych (δ 1,9–2,4). Wyraźne różnice zaobserwowano w zakresie δ 2,9–3,2, zawierającym stosunkowo mało intensywne sygnały pochodzące od grup N-CH₃ (powiększenia na **Ryc. 16**). Na fragmentach widm zarejestrowanych dla polisacharydów szczepu dzikiego 130b i komplementanta pJB-BORF8 wyraźnie widoczne są dwa sygnały pochodzące od wspomnianych grup N-CH₃. Brak podobnych sygnałów na widmie zarejestrowanym dla polisacharydu mutantu 16D12, świadczy o braku grup N-CH₃ a zarazem o istotnych różnicach strukturalnych.

4.2. Oznaczenie profilu lipidowego szczepów *L. pneumophila* z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UPLC- MS/MS)

Analiza lipidomiczna pozwoliła na kompleksową identyfikację około 200 lipidów *L. pneumophila* zarówno szczepów dzikich (Heysham-1, 130b), jak i mutantów z defektywną syntezą LPS (T6-K13, 16D12). Lipidy szczepu dzikiego Heysham-1 i 130b, wyekstrahowane z masy bakteryjnej metodą Bligh i Dyer, stanowiły około 7% suchej masy bakterii, natomiast lipidy mutantów T6-K13 oraz 16D12 około 6%. Lipidy analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UPLC-MS/MS, Thermo Scientific) w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

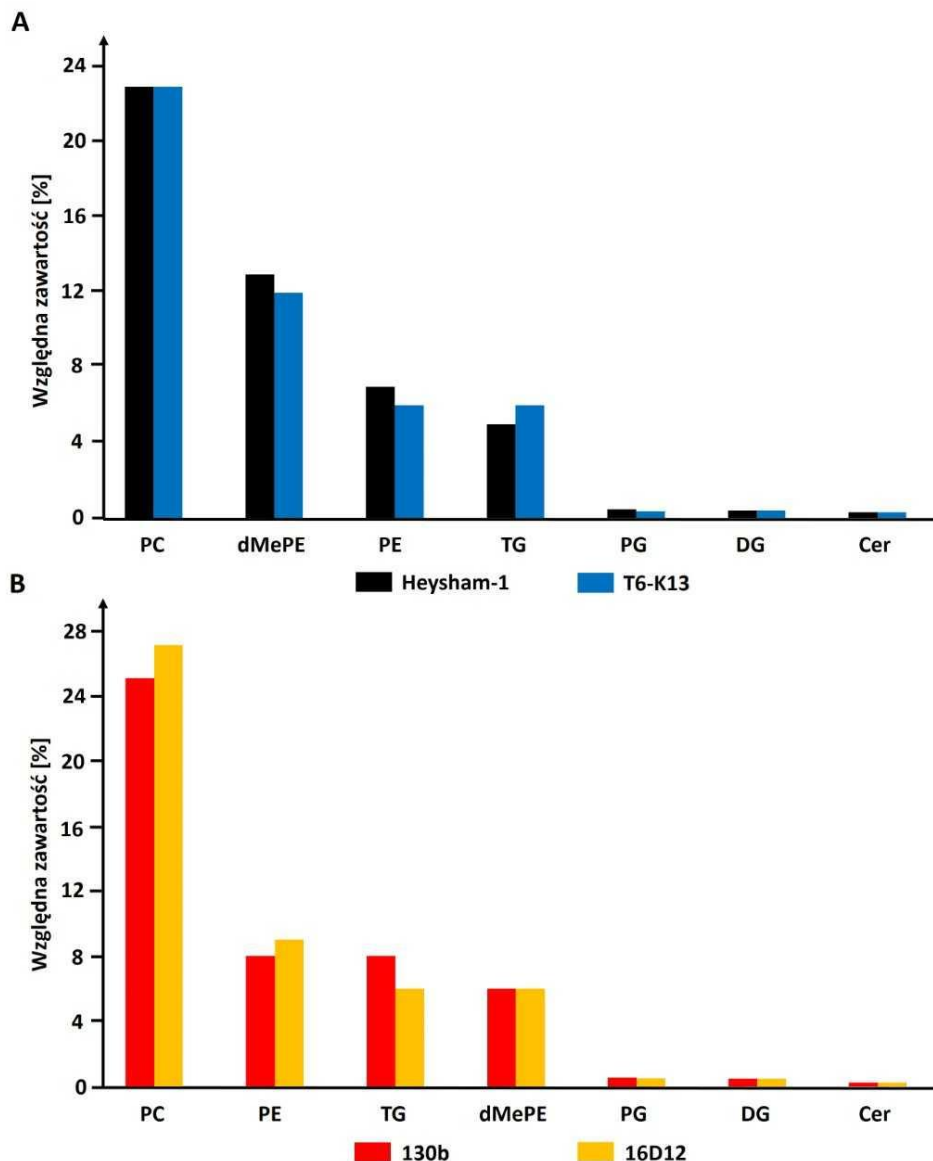
Badane szczepy charakteryzowały się złożonym składem lipidowym, który obejmował:

- lipidy obojętne (trójglicerydy, TG; dwuglicerydy, DG);
- fosfolipidy (PC, PE, PG, CL, dMePE);
- sfingolipidy (ceramidy, Cer).

Dominującą frakcją lipidów badanych szczepów *L. pneumophila* stanowiły fosfolipidy. Fosfolipidami, które występowały w największej ilości w szczepach Heysham-1 i T6-K13 były: PC, dMePE oraz PE, które w szczepie dzikim Heysham-1 stanowiły odpowiednio 23%, 13% i 7% lipidów, natomiast w mutancie T6-K13 23%, 12% i 6%. Zawartość TG w szczepie Heysham-1 wynosiła 5% wszystkich zidentyfikowanych lipidów, a w szczepie T6-K13 wynosiła 6% lipidów. Pozostałe lipidy występowały w mniejszej ilości (**Ryc. 17A**).

Do dominujących fosfolipidów szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12 należały PC, PE oraz dMePE, które stanowiły odpowiednio 25%, 8% i 6% względnej zawartości lipidów szczepu 130b oraz 27%, 9% i 6% lipidów szczepu 16D12. Wśród lipidów obojętnych szczepów 130b i 16D12 dominowały TG stanowiące odpowiednio 8% i 6% wszystkich lipidów. Pozostałe lipidy występowały w mniejszej ilości (**Ryc. 17B**).

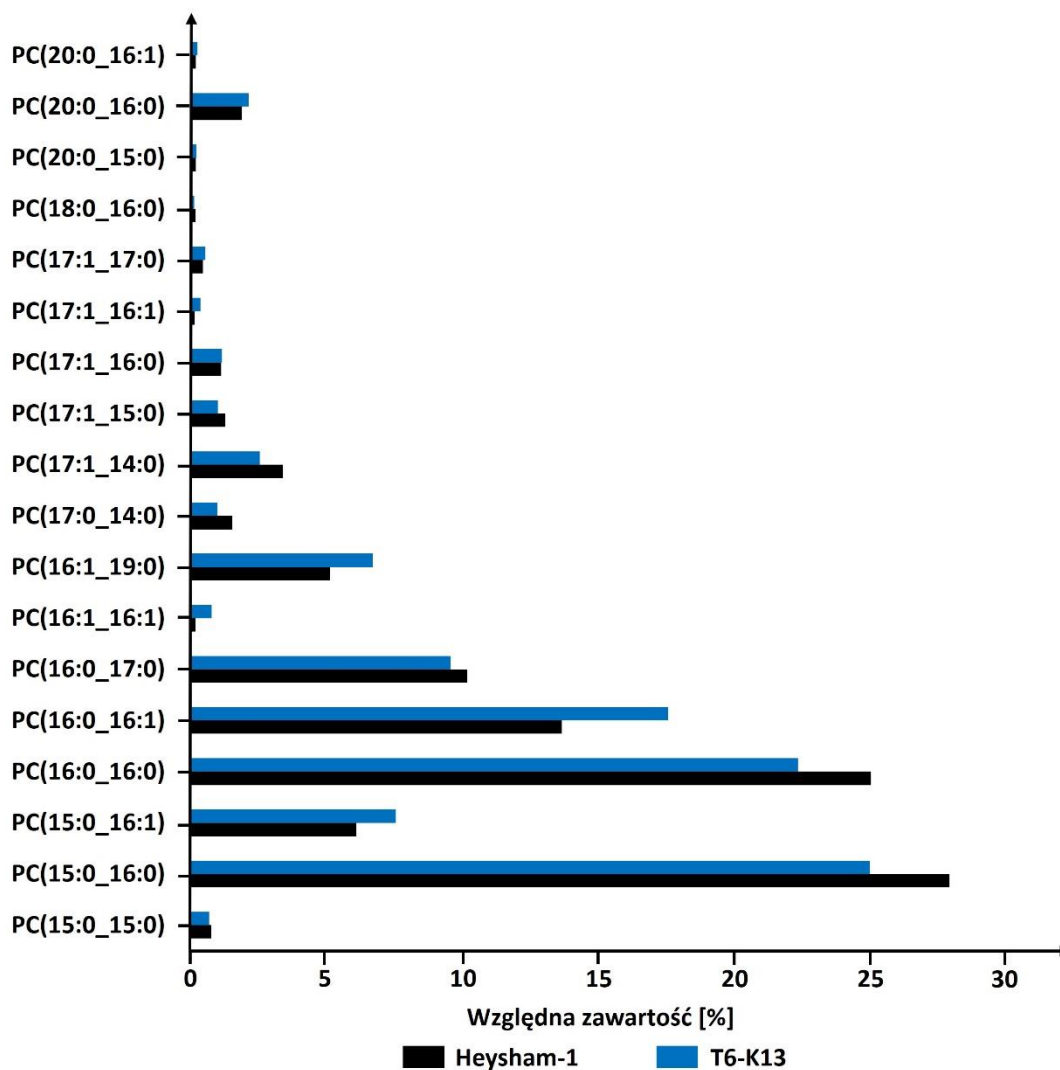
Główne lipidy szczepów komplementacyjnych T24-K6-1 i pJBBORF8 przedstawiono w Tabeli 1 w Aneksie (**Tabela 1A (Aneks)**).



Ryc. 17 Względna zawartość (%) lipidów *L. pneumophila* szczepów: **A)** Heysham-1, T6-K13; **B)** 130b, 16D12, analizowanych za pomocą UPLC-MS w trybie jonów dodatnich.

4.2.1. Analiza struktury lipidów *L. pneumophila* szczep Heysham-1 i T6-K13

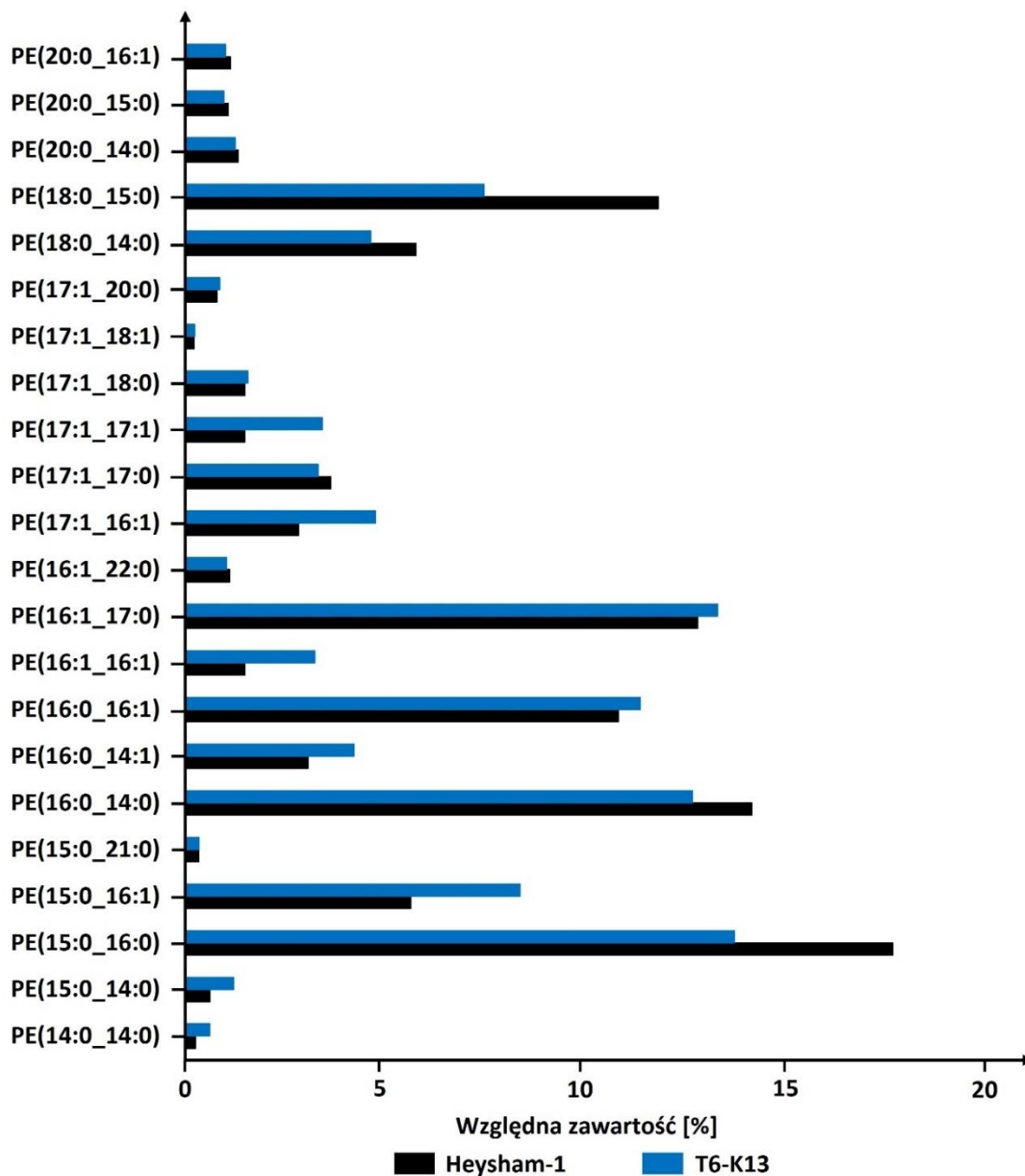
Analiza strukturalna fosfolipidów wykazała, że szczepy Heysham-1 i T6-K13 syntetyzowały 18 różnych PC z kwasami tłuszczowymi o długości łańcucha od 14 do 20 atomów węgla, nasyconymi i jednonienasyconymi (**Ryc. 18**).



Ryc. 18 Struktura i względna zawartość fosfatydylocholin (PC) *L. pneumophila* szczepów: Heysham-1 i T6-K13. Kwasy 17:1 i cyklopropanowy17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

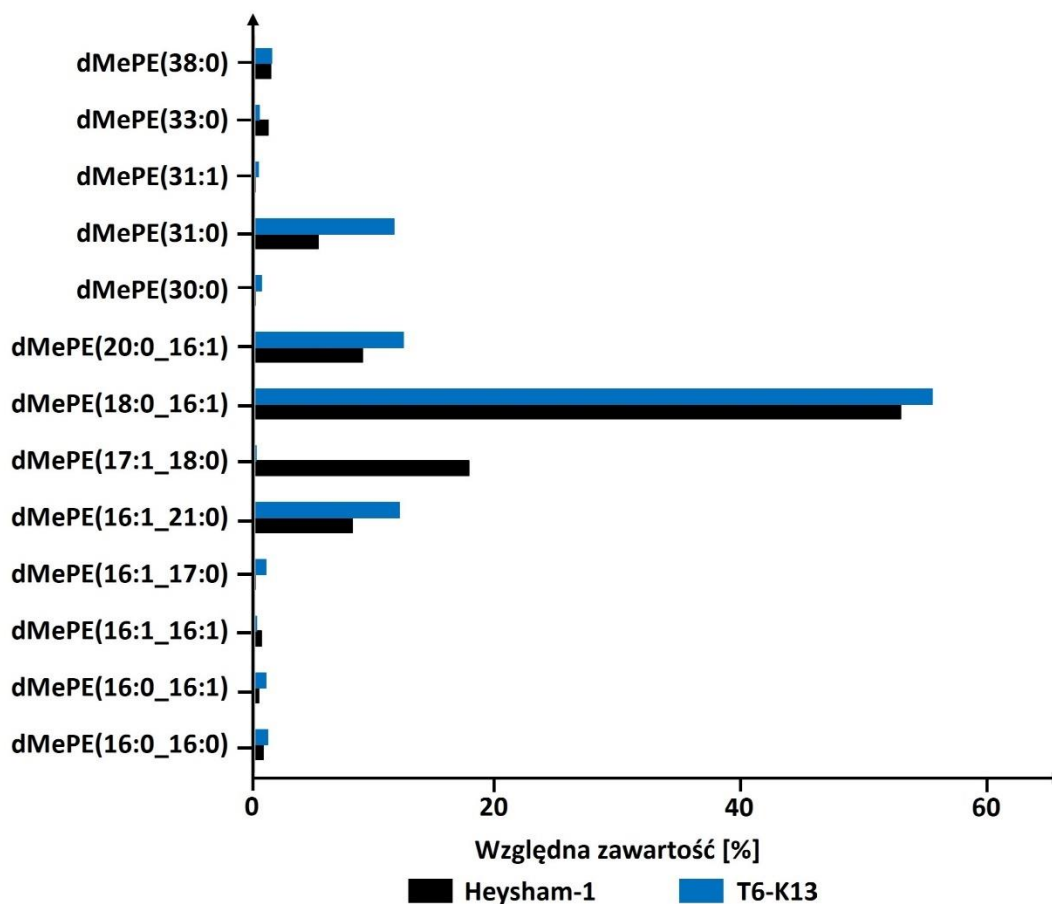
Głównymi fosfatydylocholinami obu szczepów były: PC(15:0_16:0), PC(16:0_16:0), PC(16:0_16:1). Szczep Heysham-1 syntetyzował o 3% więcej PC(15:0_16:0), PC(16:0_16:0) w porównaniu do mutantu. Szczep T6-K13 charakteryzował się wyższą zawartością PC(16:0_16:1), PC(16:1_19:0), odpowiednio o 4% i 2% w porównaniu do szczepu dzikiego.

W klasie PE występowały 22 różne fosfolipidy, wśród których zarówno w szczepie Heysham-1, jak i T6-K13 dominowały PE(15:0_16:0), PE(16:0_14:0) i PE(16:1_17:0) (**Ryc. 19**). Szczep dziki Heysham-1 syntetyzował o 4% więcej PE(15:0_16:0) i 5% więcej PE(18:0_15:0) w porównaniu do mutantu T6-K13. Natomiast szczep T6-K13 charakteryzował się dwukrotnie wyższą zawartością PE z nasyconymi kwasami tłuszczowymi PE(14:0_14:0) i PE(15:0_14:0) oraz nienasyconymi kwasami tłuszczowymi PE(16:1_16:1), PE(17:1_17:1) w porównaniu do szczepu dzikiego.



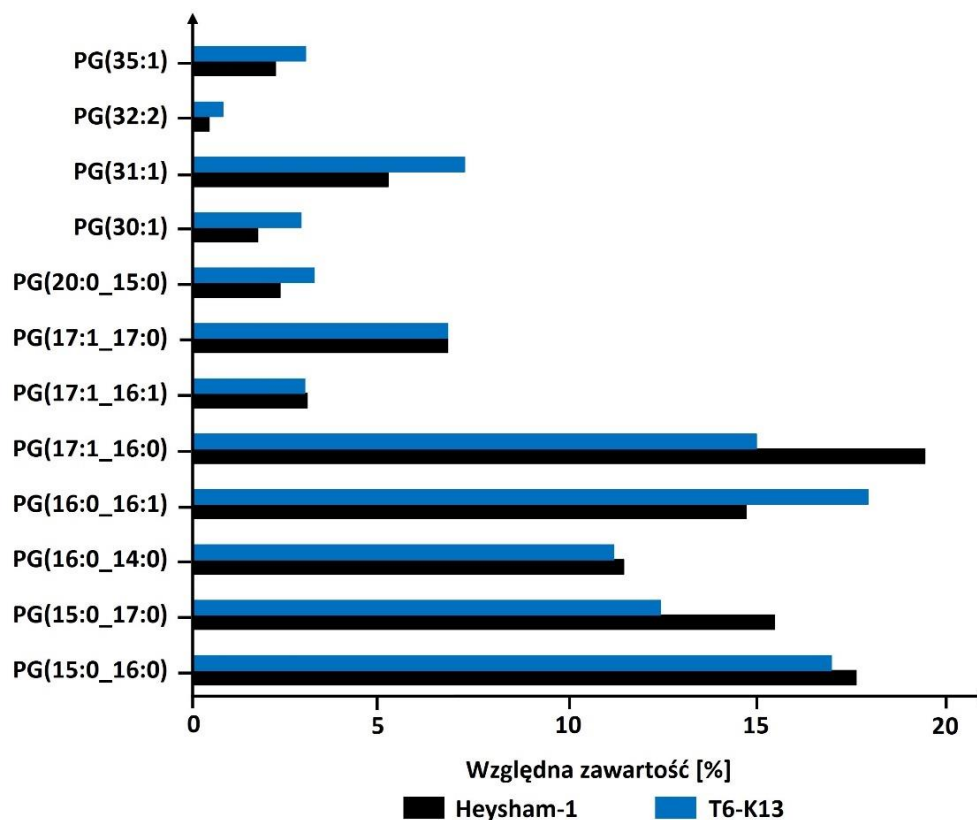
Ryc. 19 Struktura i zawartość fosfatydyloetanolamin (PE) syntetyzowanych przez szczep dziki Heysham-1 i mutantą T6-K13 *L. pneumophila*. Kwas 17:1 lub cyklopropa-nowy17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

Spośród metylowanych pochodnych PE szczepu Heysham-1 i T6-K13 głównym związkiem był dMePE(18:0_16:1), który stanowił około 60% wszystkich dMePE zarówno w szczepie dzikim, jak i w mutancie (**Ryc. 20**). Szczep T6-K13 charakteryzował się wyższą zawartością dMePE(16:1_21:0) (12%) oraz dMePE(31:0) (12%), w porównaniu do szczepu dzikiego, który syntetyzował te lipidy odpowiednio w ilości 8% i 5%. Szczep dziki Heysham-1 charakteryzował się większą zawartością dMePE(17:1_18:0) (18%), która w przypadku mutantu T6-K13 wynosiła zaledwie 0,12%.



Ryc. 20 Profil molekularny metylowanych pochodnych PE (dMePE) *L. pneumophila* szczepów: dzikiego Heysham-1 i mutantu T6-K13. Kwas 17:1 lub cyklopropanowy17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

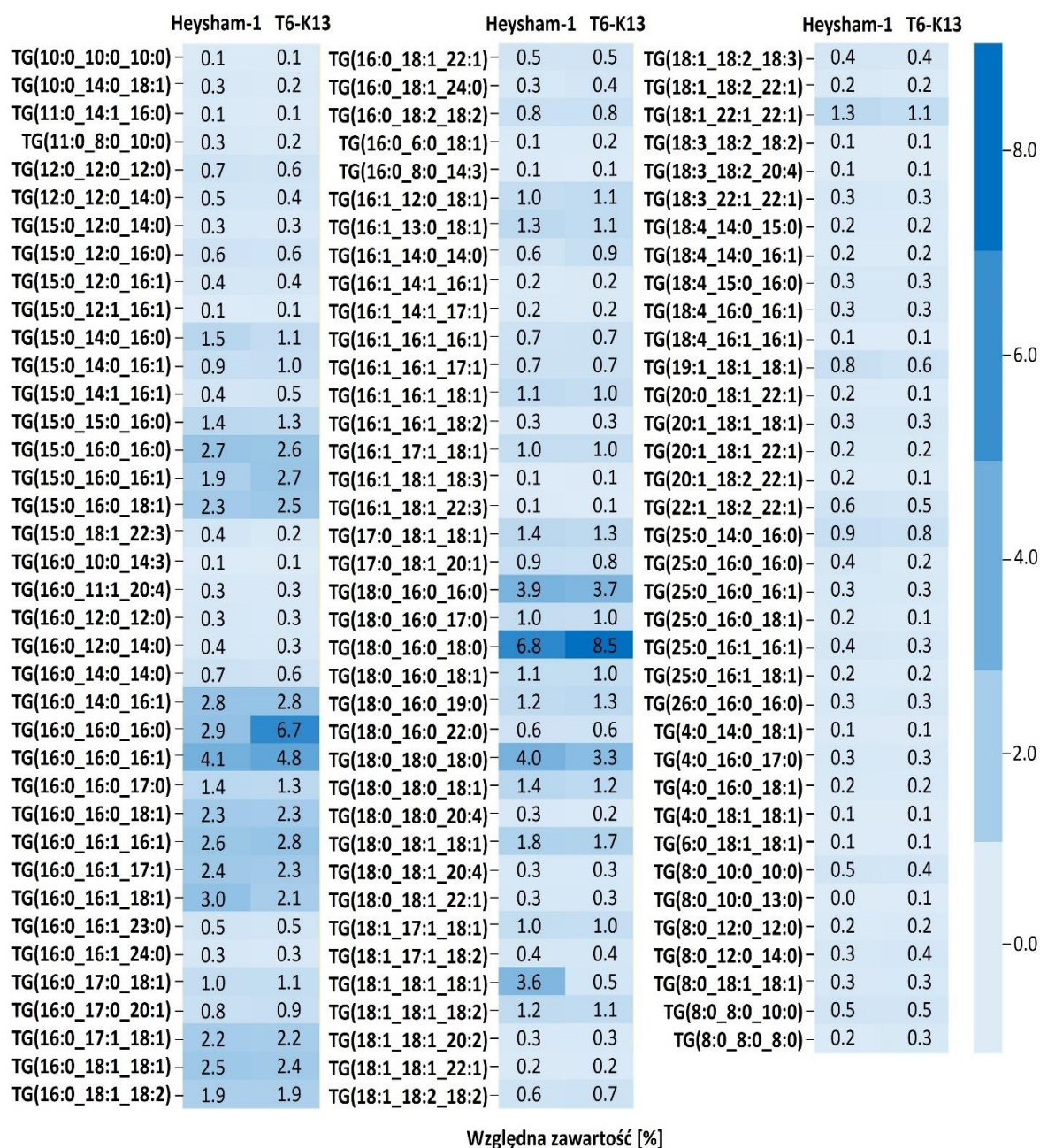
W klasie fosfatydylogliceroli występowało 12 różnych fosfolipidów, wśród których w szczepie Heysham-1 i T6-K13 dominowały PG(17:1_16:0), PG(15:0_16:0) i PG(16:0_16:1). Analiza porównawcza profilu PG wykazała, że szczep dziki charakteryzował się wyższą zawartością PG(17:1_16:0) (19%) i PG(15:0_16:0) (18%), w porównaniu do mutantu syntetyzującego odpowiednio 15% i 17% tych fosfolipidów. Mutant T6-K13 zawierał o 3% więcej PG(16:0_16:1) niż szczep Heysham-1 (**Ryc. 21**).



Ryc. 21 Struktura i zawartość fosfatydylogliceroli (PG) szczepu dzikiego Heysham-1 i mutantu T6-K13 *L. pneumophila*. Kwas 17:1 lub cyklopropanowy17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

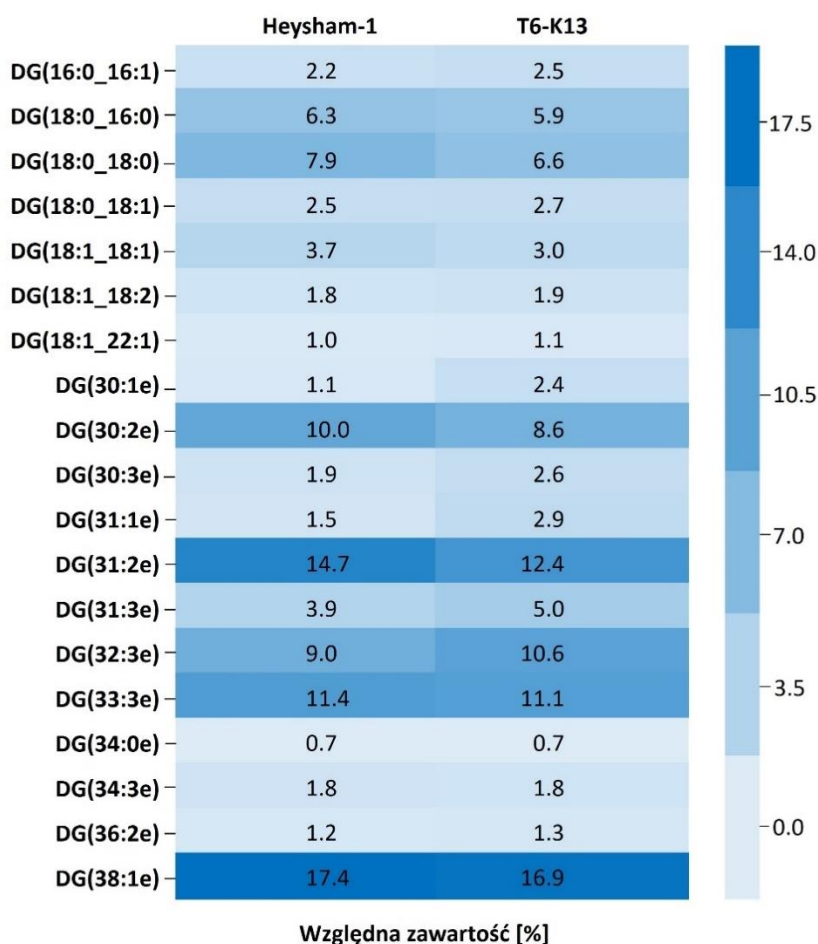
W klasie CL zarówno w szczepie Heysham-1, jak i T6-K13 dominowały: CL(72:1) i CL(72:0). Szczep dziki Heysham-1 syntetyzował 3,5-krotnie więcej CL(63:2) oraz ponad 2-krotnie mniej CL(74:1) w porównaniu do mutantu T6-K13.

Lipidy obojętne syntetyzowane przez szczep Heysham-1 i T6-K13 obejmowały dwuglicerydy oraz trójglicerydy, które charakteryzowały się największym strukturalnym zróżnicowaniem (**Ryc. 22**). Zarówno szczep dziki Heysham-1, jak i mutant T6-K13 syntetyzował 112 różnych trójglicerydów, wśród których dominowały lipidy o strukturze: TG(18:0_16:0_18:0), TG(16:0_16:0_16:1), TG(16:0_16:0_16:0). Mutant charakteryzował się wyższą zawartością TG(18:0_16:0_18:0) oraz TG(16:0_16:0_16:0) w porównaniu do szczepu dzikiego. Szczep dziki wykazywał wyższą zawartość TG(18:1_18:1_18:1).



Ryc. 22 Mapa cieplna przedstawiająca względną zawartość oraz strukturalną różnorodność trójglicerydów (TG) *L. pneumophila* szczepu dzikiego Heysham-1 i mutantu T6-K13.

W klasie DG w szczepach Heysham-1 i T6-K13 dominowały dwuglicerydy: DG(38:1e), DG(31:2e), DG(33:3e), DG(30:2e). Szczep dziki wykazywał wyższą o 2% zawartość DG(31:2e) oraz wyższą zawartość DG(30:2e), DG(18:0_18:0) w porównaniu do mutantu T6-K13. Z kolei mutant charakteryzował się około 2-krotnie wyższą zawartością DG(30:1e) oraz DG(31:1e) (**Ryc. 23**).

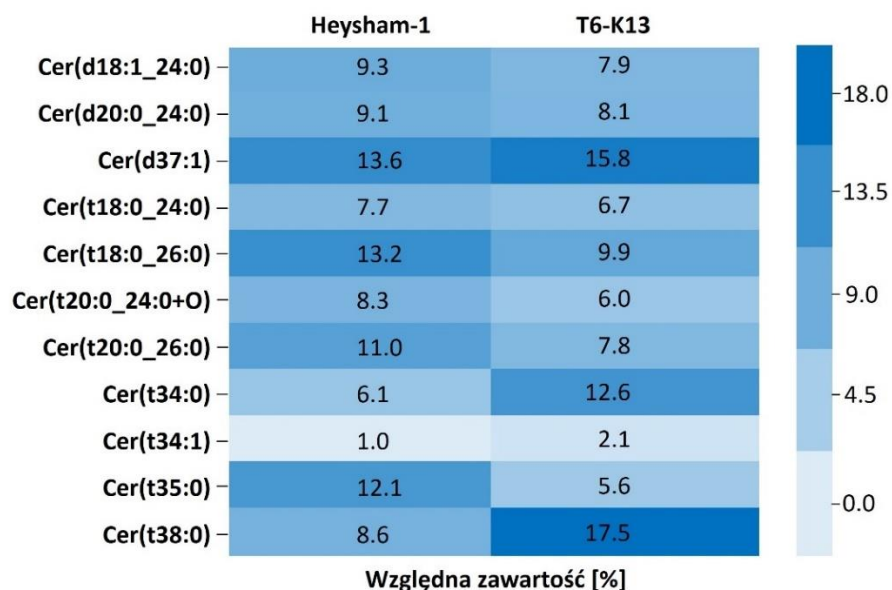


Ryc. 23 Analiza profilu molekularnego dwuglicerydów (DG) syntetyzowanych przez *L. pneumophila* szczep dziki Heysham-1 i mutantu T6-K13.

Lipidy obojętne należące do klasy TG i DG szczepu dzikiego Heysham-1 i T6-K13 charakteryzowały się występowaniem podwójnie nienasyconych kwasów tłuszczowych w odróżnieniu od pozostałych klas lipidów. Do lipidów zawierających podwójnie nienasycone kwasy tłuszczowe w klasie TG w szczepie Heysham-1 i T6-K13 należały: TG(16:0_18:1_18:2), TG(18:1_18:1_18:2) oraz TG(16:0_18:2_18:2).

Szczepy Heysham-1 i T6-K13 syntetyzowały także 10 różnych ceramidów zawierających nasycone oraz jednonienasycone kwasy tłuszczowe oraz 1 utlenowany ceramid (t20:0_24:0+O) (Ryc. 24). Do dominujących ceramidów szczepu Heysham-1 należały: Cer(d37:1) (14%), Cer(t18:0_26:0) (13%) oraz Cer(t35:0) (12%), natomiast w szczepie T6-K13: Cer(t38:0) (17%), Cer(d37:1) (16%) oraz Cer(t34:0) (13%). Mutant

charakteryzował się 2-krotnie wyższą zawartością Cer(t34:0) (13%), Cer(t34:1) (2%) i Cer(t38:0) (17%) oraz 2-krotnie niższą zawartością Cer(t35:0) (6%) w porównaniu do szczepu dzikiego.

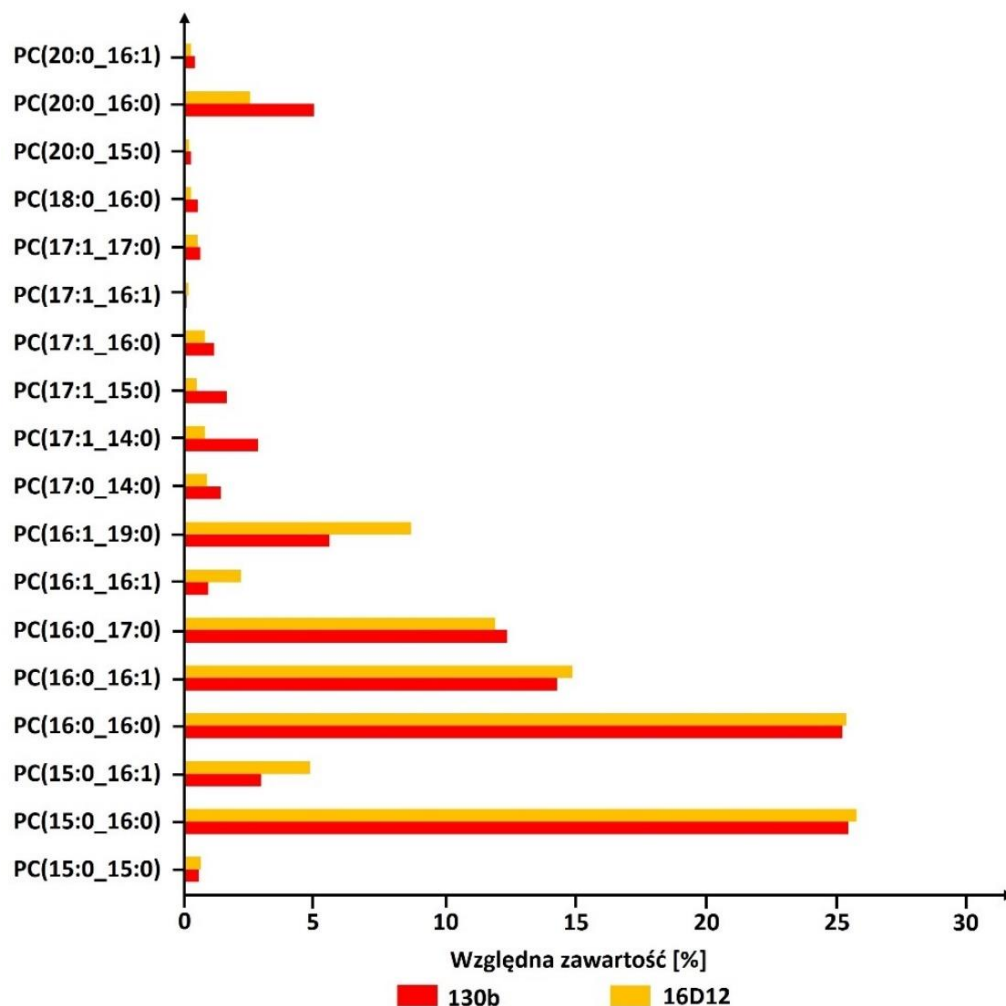


Ryc. 24 Względna zawartość ceramidów (Cer) *L. pneumophila* szczepu dzikiego Heysham-1 i mutantu T6-K13.

Analiza porównawcza profilu molekularnego lipidów szczepu dzikiego Heysham-1 *L. pneumophila* oraz mutantu T6-K13 wykazała wyraźne różnice we względnej zawartości poszczególnych lipidów we wszystkich zidentyfikowanych klasach.

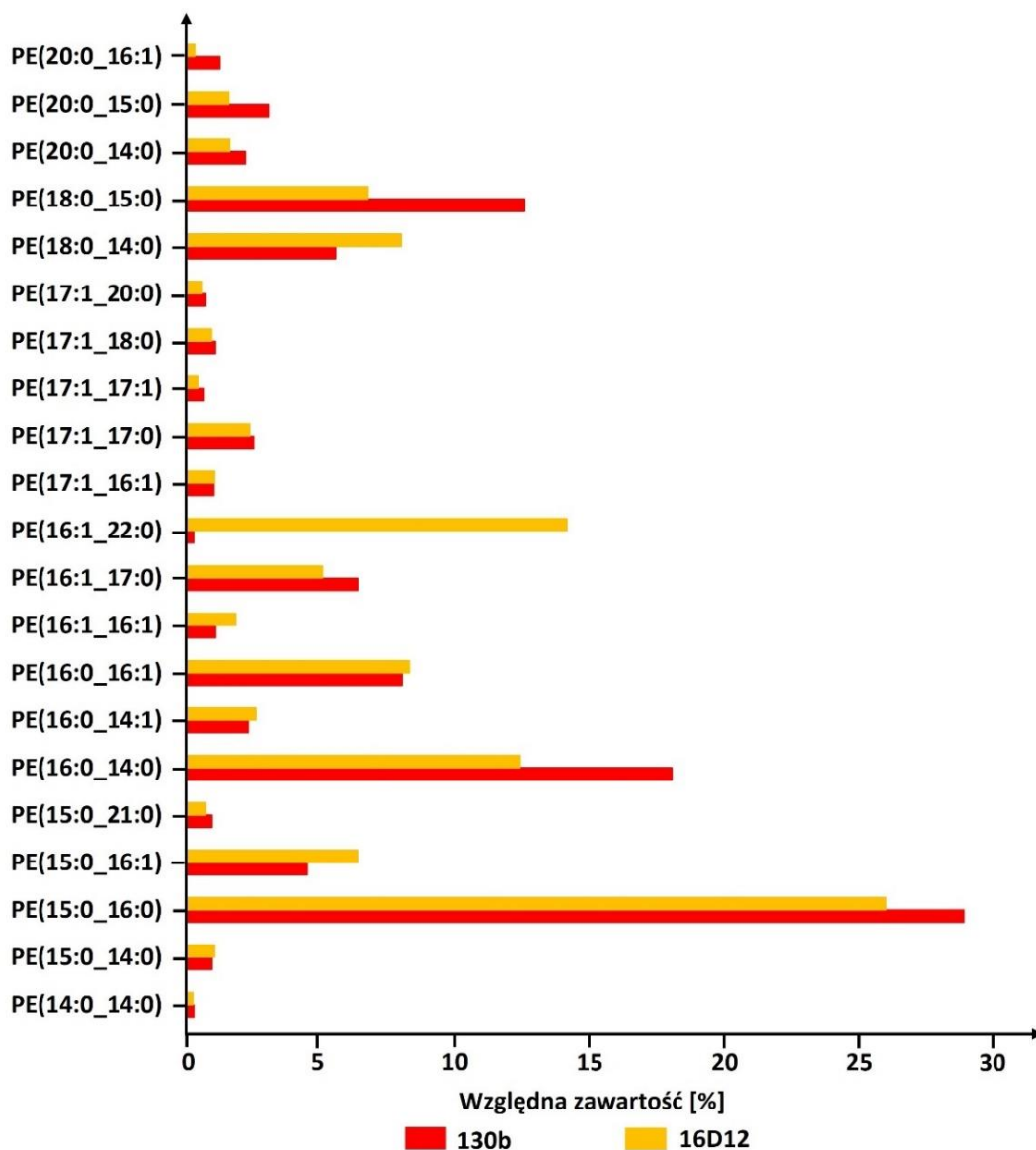
4.2.2. Profil molekularny lipidów syntetyzowanych przez *L. pneumophila* szczepy 130b i 16D12

Analiza strukturalna fosfatydylocholin szczepu dzikiego 130b *L. pneumophila* i mutantu 16D12 wykazała występowanie 18 różnych PC z kwasami tłuszczowymi zawierającymi od 14 do 20 atomów węgla w cząsteczce (**Ryc. 25**). W klasie PC zarówno w szczepie 130b, jak i w mutancie 16D12 dominowały fosfolipidy o strukturze: PC(15:0_16:0) oraz PC(16:0_16:0). Szczepy 130b i 16D12 syntetyzowały 25% PC(15:0_16:0) oraz 25% PC(16:0_16:0). Trzecią pod względem ilości PC była PC(16:0_16:1), której zawartość w szczepie 130b wynosiła 14%, a w 16D12 15%. Szczep dziki 130b syntetyzował 3-krotnie więcej PC(17:1_14:0), PC(17:1_15:0) oraz 2-krotnie więcej PC(20:0_16:0) w porównaniu do szczepu 16D12. Mutant 16D12 wykazywał wyższą o 3% zawartość PC(16:1_19:0) niż szczep dziki 130b.



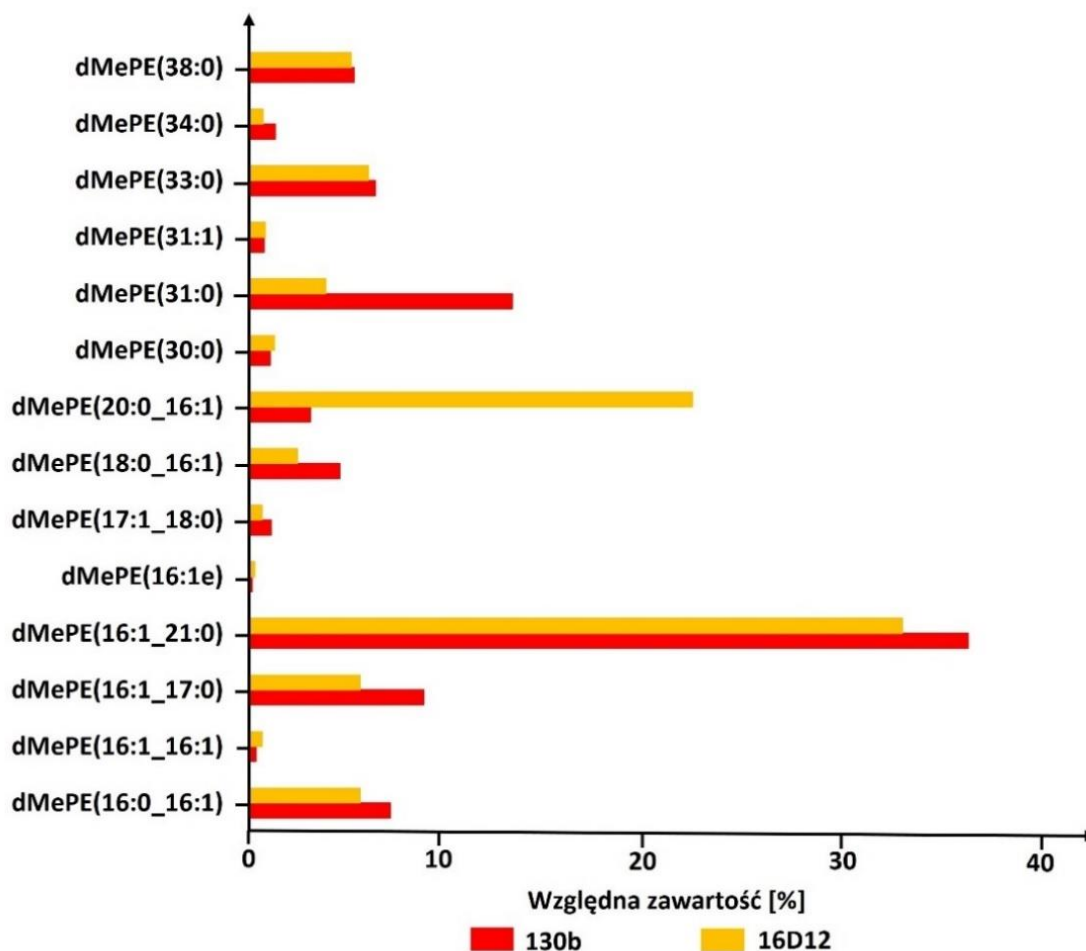
Ryc. 25 Profil molekularny fosfatydylocholin (PC) syntetyzowanych przez *L. pneumophila* szczep 130b oraz szczep 16D12. Kwas 17:1 lub cyklopropanowy 17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

W klasie PE zidentyfikowano 21 różnych lipidów z kwasami tłuszczowymi zawierającymi od 14 do 22 atomów węgla (**Ryc. 26**). Główne PE syntetyzowane przez szczepy 130b i 16D12 to PE(15:0_16:0) i PE(16:0_14:0), które w szczepie dzikim występowały w ilości odpowiednio 28% i 18%, natomiast w mutancie 25% i 12%. Lipidy mutantu 16D12 charakteryzowały się większą zawartością PE(16:1_22:0) (14%), która w szczepie 130b wynosiła zaledwie 0,2%. Szczep dziki zawierał 2-krotnie więcej PE(18:0_15:0) i PE(20:0_15:0) oraz 4-krotnie więcej PE(20:0_16:1) w porównaniu do mutantu.



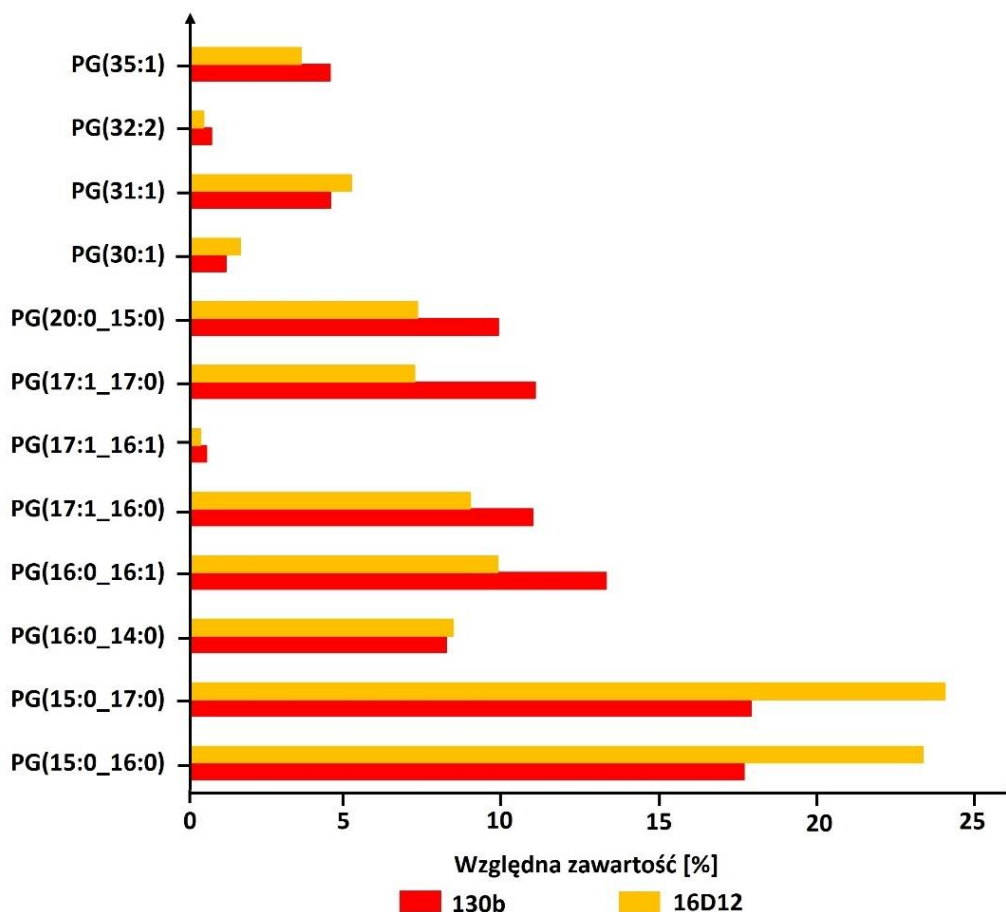
Ryc. 26 Względna zawartość fosfatydyloetanolamin (PE) w lipidach *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12. Kwas 17:1 lub cyklopropanowy 17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

L. pneumophila szczep 130b oraz mutant 16D12 syntetyzował 14 różnych metylowanych form PE (**Ryc. 27**). Fosfolipidem występującym w największej ilości w klasie dMePE była dMePE(16:1_21:0), która w szczepie dzikim 130b stanowiła 36%, a w 16D12 32% wszystkich zidentyfikowanych dMePE. Szczep 130b wykazywał 2-krotnie wyższą zawartość dMePE(17:1_18:0), dMePE(18:0_16:1) oraz dMePE(34:0), a także ponad 3-krotnie wyższą zawartość dMePE(31:0) w porównaniu do szczepu 16D12. Mutant 16D12 charakteryzował się wysoką zawartością dMePE(20:0_16:1) (22%), która w szczepie dzikim była ponad 7-krotnie niższa (3%).



Ryc. 27 Względna zawartość dimetylofosfatydyloetanolamin (*dMePE*) zidentyfikowanych w lipidach *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12. Kwas 17:1 lub cyklopropanowy 17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

W klasie PG w obu szczepach dominowały PG(15:0_16:0), PG(15:0_17:0) i PG(16:0_16:1), które w szczepie 130b stanowiły odpowiednio 18%, 18% i 13%, natomiast w mutancie 16D12 23%, 24% i 10%. Szczep dziki charakteryzował się wyższą o 3% zawartością PG(16:0_16:1) i PG(20:0_15:0) oraz o 4% wyższą zawartością PG(17:1_17:0) w porównaniu do mutantu 16D12 (**Ryc. 28**).

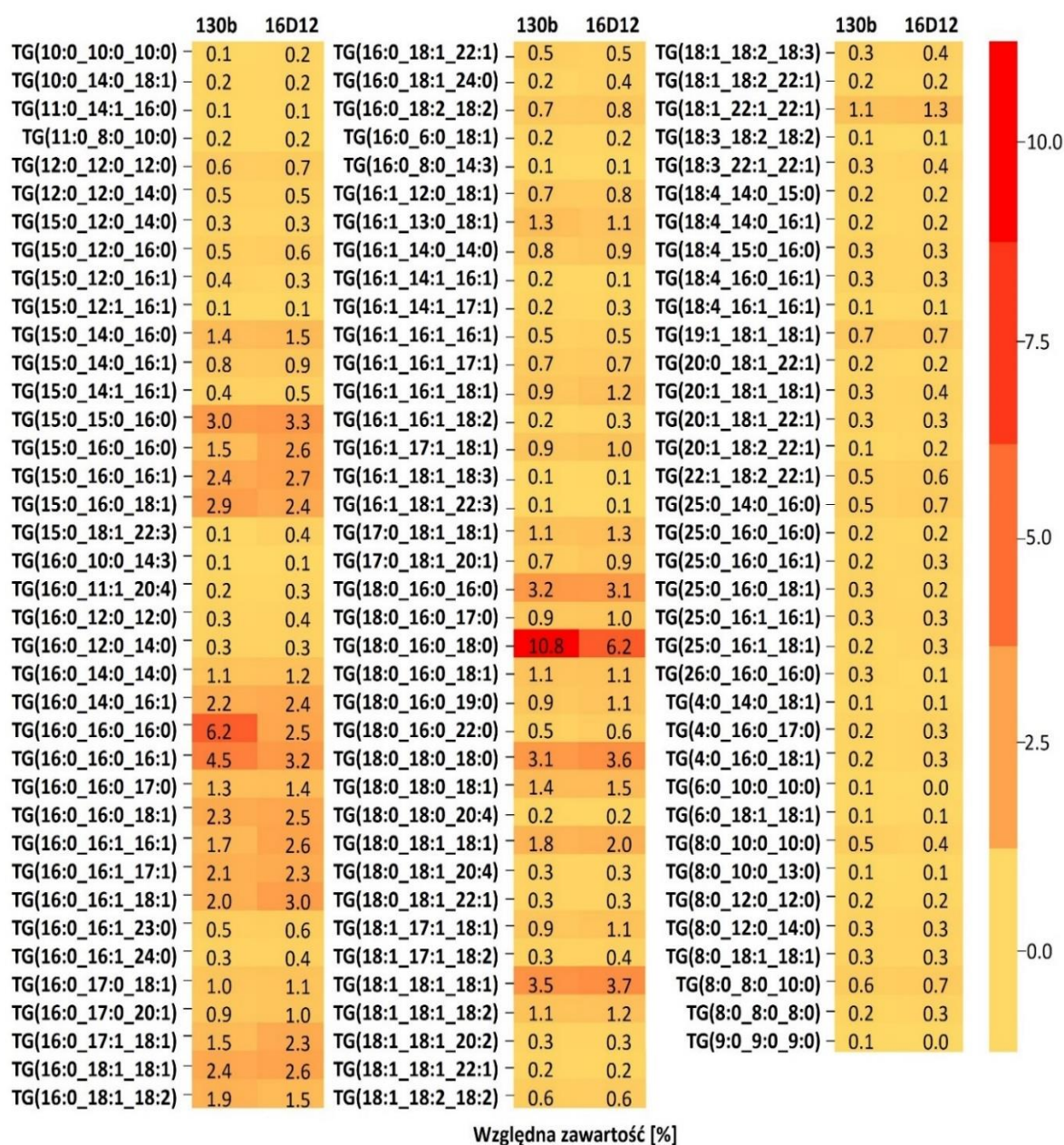


Ryc. 28 Struktura i zawartość fosfatydylogliceroli (PG) szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12 *L. pneumophila*. Kwasy 17:1 lub cyklopropanowy17:0 nie do odróżnienia metodą UPLC-MS/MS.

Dominującymi lipidami w klasie CL szczepu dzikiego 130b, mutantu 16D12 oraz komplementanta pJBBORF8 były CL(74:1), CL(70:0) oraz CL(72:1). Szczep 130b charakteryzował się blisko 2-krotnie wyższą zawartością CL(70:0) oraz 2-krotnie niższą zawartością CL(72:1) w porównaniu do mutantu 16D12.

Do lipidów obojętnych występujących w szczepie 130b oraz 16D12 należały TG, które charakteryzowały się dużą różnorodnością strukturalną. Zidentyfikowane TG zawierały kwasy tłuszczowe o długości łańcucha od 8 do 26 atomów węgla (**Ryc. 29**). Spośród 112 zidentyfikowanych TG w szczepie 130b dominowały: TG(18:0_16:0_18:0), TG(16:0_16:0_16:0) i TG(16:0_16:0_16:1), natomiast w szczepie 16D12: TG(18:0_16:0_18:0), TG(18:1_18:1_18:1) i TG(18:0_18:0_18:0). Szczep dziki charakteryzował się około 2-krotnie wyższą zawartością TG(18:0_16:0_18:0) oraz 2,5-krotnie wyższą zawartością TG(16:0_16:0_16:0) w porównaniu do szczepu 16D12. Mutant

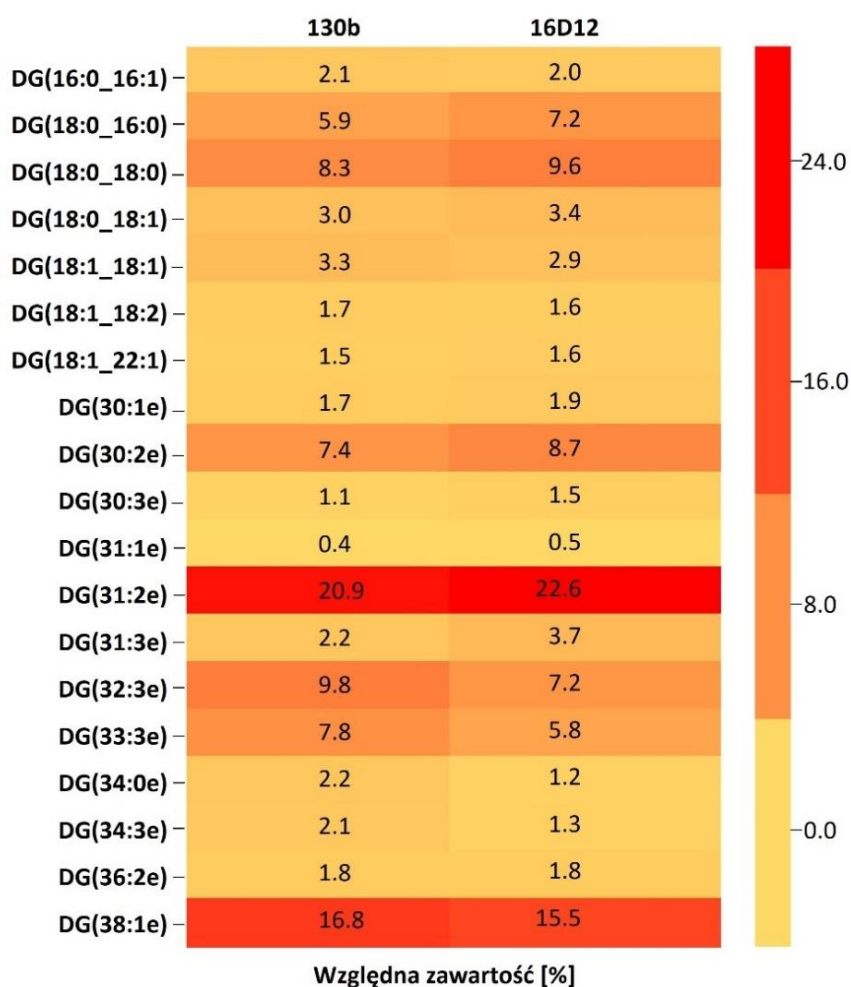
syntetyzował około 2-krotnie więcej TG(15:0_16:0_16:0).



Ryc. 29 Struktura i zawartość trójglicerydów (TG) zidentyfikowanych w lipidach *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12.

Drugą pod względem zawartości frakcją lipidów obojętnych występujących w komórkach szczepu 130b oraz mutantu 16D12 były dwuglicerydy. Zidentyfikowano 19 różnych DG, spośród których dominowały DG(31:2e) i DG(38:1e). W szczepie dzikim stanowiły one odpowiednio 21% i 17%, a w mutancie 23% i 15%. Szczep 130b charakteryzował się wyższą o około 3% zawartością DG(32:3e) oraz wyższą o 2% zawartością DG(33:3e). Szczep dziki syntetyzował 2-krotnie więcej DG(34:0e)

w porównaniu do mutantu 16D12, natomiast blisko 2-krotnie mniej DG(31:3e) (**Ryc. 30**).

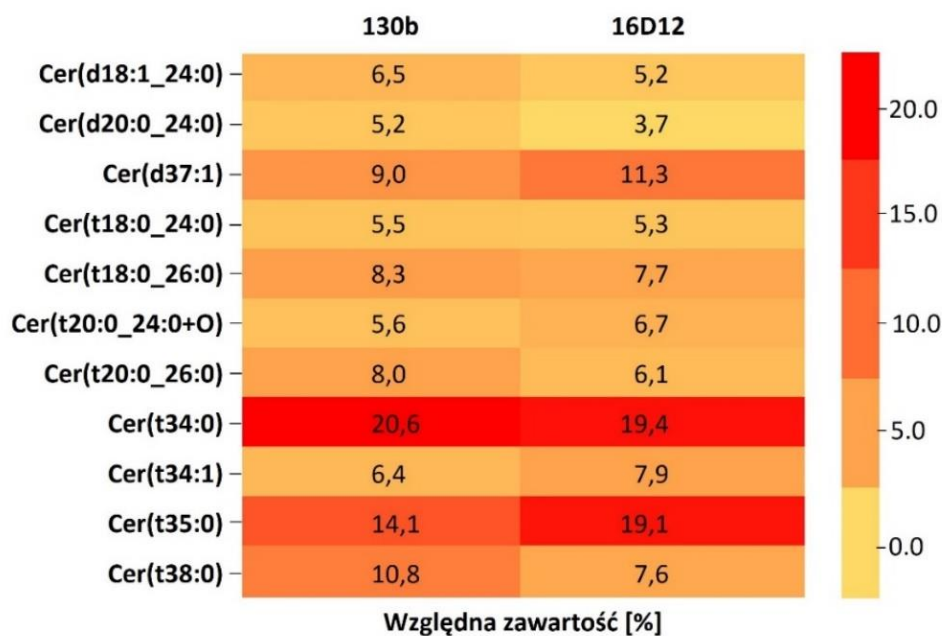


Ryc. 30 Profil dwuglicerydów (DG) *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12.

TG i DG syntetyzowane przez szczep 130b i 16D12 zawierały kwasy tłuszczowe z dwoma podwójnymi wiązaniami, w przeciwieństwie do pozostałych klas lipidów. W klasie TG w szczepie 130b i 16D12 występowały na przykład: TG(16:0_18:1_18:2), TG(18:1_18:1_18:2) oraz TG(16:0_18:2_18:2), natomiast w klasie DG na przykład: DG(31:2e) i DG(30:2e). W klasie DG szczepu 130b i 16D12 występowała 5-krotnie wyższa zawartość lipidów z dwoma podwójnymi wiązaniami w porównaniu do lipidów z dwoma podwójnie nienasyconymi kwasami tłuszczowymi w klasie TG.

Zarówno szczep 130b i 16D12 syntetyzował 10 różnych ceramidów z nasyconymi i jednonienasyconymi kwasami tłuszczowymi oraz utlenowany ceramid (t20:0_24:0+O) (**Ryc. 31**). Do dominujących ceramidów szczepu dzikiego należały: Cer(t34:0) (21%), Cer(t35:0) (14%), Cer(t38:0) (11%), a w szczepie 16D12: Cer(t34:0) (19%), Cer(t35:0)

(19%), Cer(d37:1) (11%). Mutant charakteryzował się wyższą zawartością Cer(t35:0) (19%), Cer(d37:1) (11%) i Cer(t34:1) (8%) w porównaniu do szczepu dzikiego, który syntetyzował odpowiednio 14%, 9% oraz 6% tych ceramidów. Natomiast szczep dziki wykazywał o 3% wyższą zawartość Cer(t38:0) w porównaniu do mutantu 16D12.



Ryc. 31 Względna zawartość ceramidów (Cer) *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b i mutantu 16D12.

Analiza porównawcza profilu molekularnego lipidów *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b oraz mutantu 16D12 defektywnego w syntezie LPS wykazała różnice ilościowe w badanych klasach lipidów.

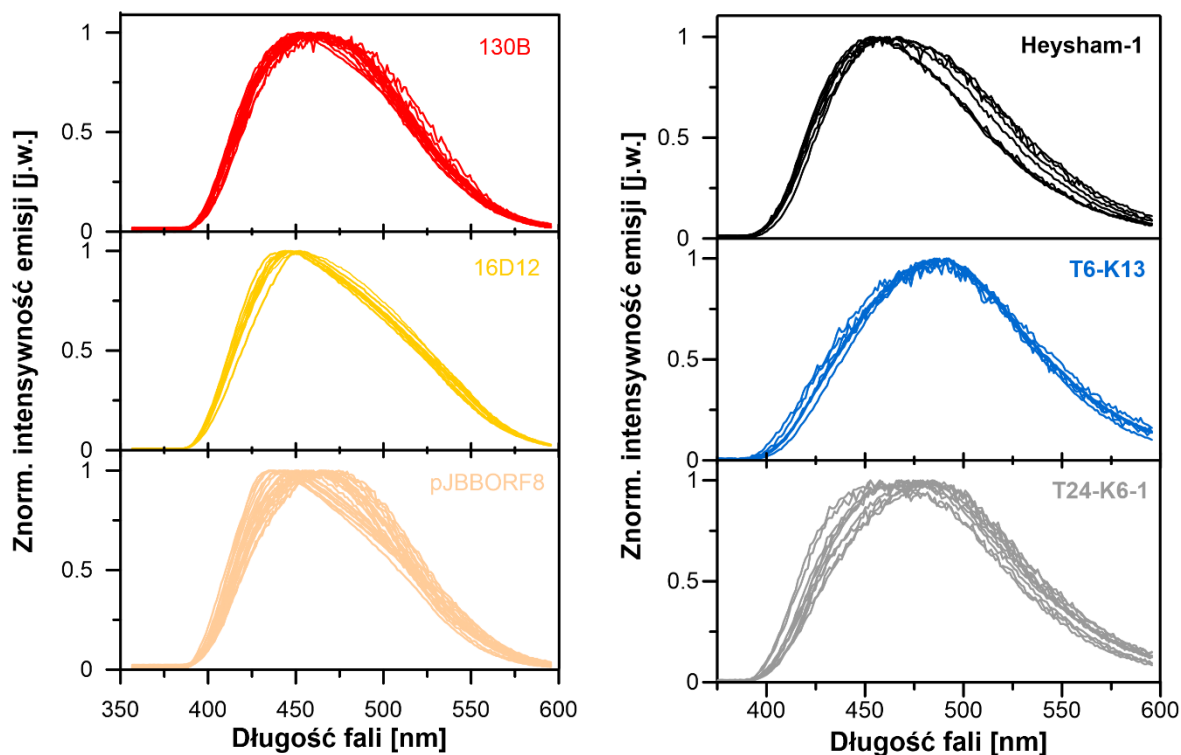
4.3. Oddziaływanie bakterii *L. pneumophila* z komórkami gospodarza

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy struktura LPS determinuje oddziaływanie bakterii *L. pneumophila* z komórkami gospodarza.

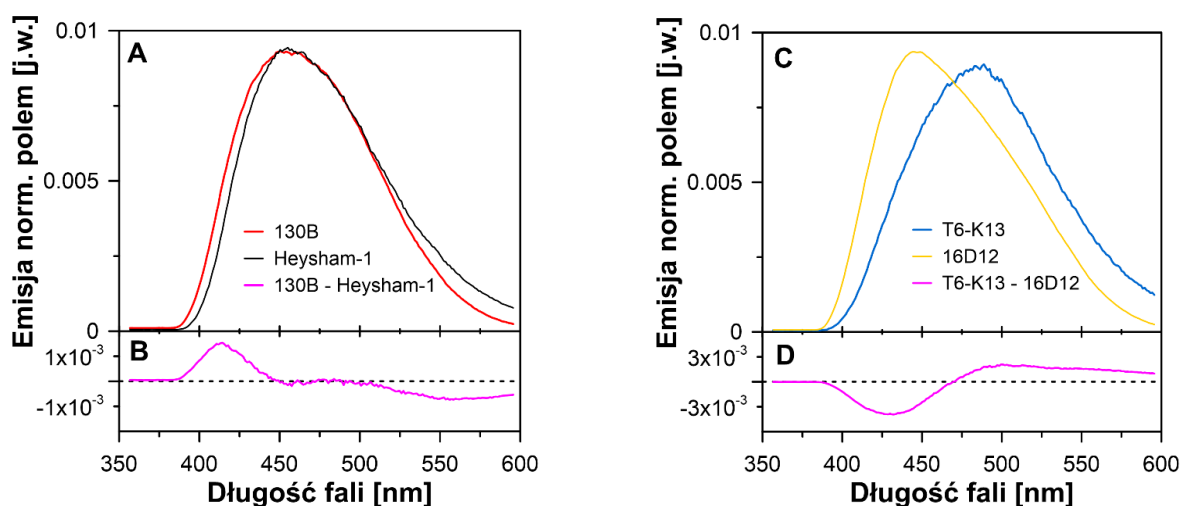
4.3.1. Pomiar stopnia polarności powierzchni bakterii *L. pneumophila*

W pierwszym etapie badań przeprowadzono pomiar stopnia polarności powierzchni bakterii *L. pneumophila* określony na podstawie własności spektroskopowych barwnika flu-

orescencyjnego prodanu (**Ryc. 32; Ryc. 33**). Prodan jest wskaźnikiem polarności środowiska, jak jest eksponowany na różne grupy chemiczne, a jego widmo przesuwają się na skali długości fal. Badania wykonano przy wykorzystaniu mikroskopu FLIM.



Ryc. 32 Widma emisji fluorescencji sondy molekularnej prodanu znakującego powierzchnię komórek *L. pneumophila* szczepów (130b, linia czerwona; 16D12, linia żółta; pJB-BORF8, linia pomarańczowa; Heysham-1, linia czarna; T6-K13, linia niebieska; T24-K6-1, linia szara) zarejestrowane przy wzbudzeniu linią laserową 375 nm oraz obserwacji powyżej 405 nm.



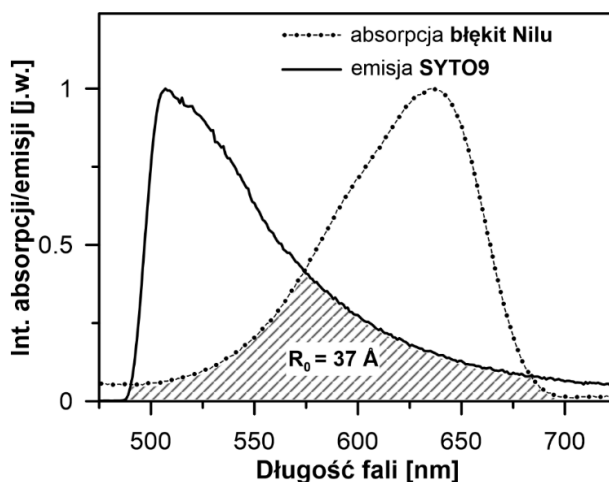
Ryc. 33 Widma emisji fluorescencji prodanu znakującego szczepu 130b oraz Heysham-1 A) oraz szczepu T6-K13 i 16D12 C) wraz z widmami różnicowymi odpowiednio w panelach B i D.

Przesunięcie widma w stronę krótkofalową wskazuje na obecność środowiska hydrofobowego, przesunięcie zaś w stronę batochromową wskazuje na właściwości polarne powierzchni komórek. Szczep dziki 130b cechował się wyższym stopniem hydrofobowości w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1 (Ryc. 33A;B), a mutant 16D12 wyższym stopniem hydrofobowości niż mutant T6-K13 (Ryc. 33C;D). Powierzchnia mutantów 16D12 i T6-K13 była bardziej polarna niż szczepów dzikich 130b i Heysham-1 na co wskazują również widma różnicowe (Ryc. 32; Ryc. 33).

4.3.2. Oddziaływanie *L. pneumophila* z *A. castellanii* oraz makrofagami linii THP-1 techniką bezpromistego przekazu energii

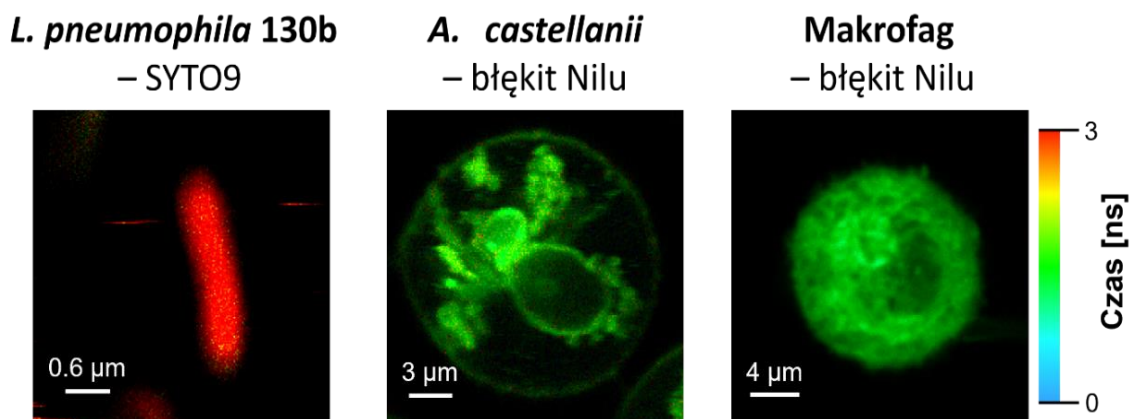
Badania mikroskopowe oddziaływania różnych szczepów bakterii *L. pneumophila* z *A. castellanii* oraz makrofagami linii THP-1 wykonano przy użyciu obrazowania czasowo-rozdzielczego FLIM oraz wykorzystaniu zjawiska przekazu energii typu Försterowskiego, które umożliwia bardzo precyzyjne określenie odległości pomiędzy oddziaływującymi cząsteczkami i wyrażeniu ich w skali nano.

Bakterie zostały wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym SYTO9, który służył jako donor energii, a ameby i makrofagi błękitem Nilu pełniącym rolę akceptora wzbudzeń elektronowych. Wybrane własności spektroskopowe obydwu zastosowanych barwników przedstawia Ryc. 34.



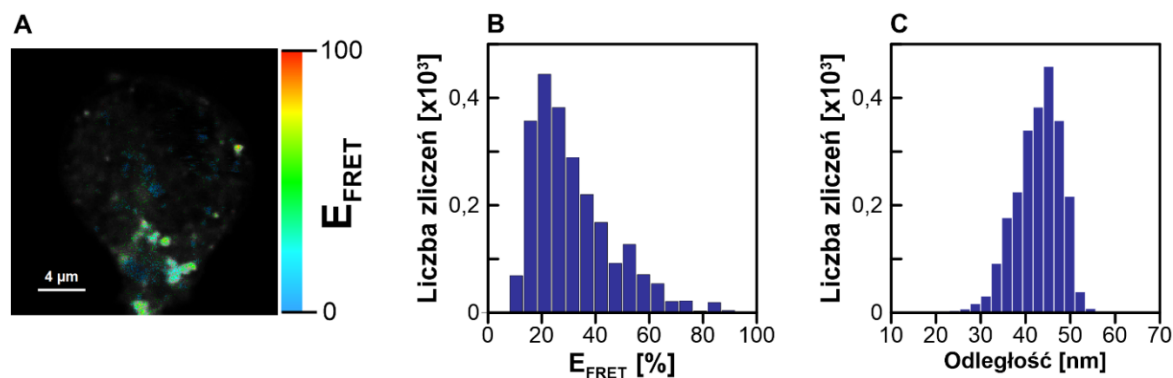
Ryc. 34 Charakterystyka spektroskopowa barwników fluorescencyjnych: widmo absorpcji SYTO 9 oraz widmo emisji fluorescencji błękitu Nilu. Własności spektralne znaczników luminescencyjnych posłużyły do wyznaczenia wartości R_0 .

Sygnaly emisji fluorescencji pochodzące od obydwu znaczników filtrowano odpowiednio poprzez ich rejestrację na dwóch osobnych, identycznych detektorach. W pierwszym kroku przeprowadzono charakterystykę czasowo-rozdzielczą wydajności i efektywności znakowania wybranymi barwnikami. Przykłady tak uzyskanych obrazów FLIM przedstawia **Ryc. 35**.



Ryc. 35 Przykłady obrazów FLIM *L. pneumophila* szczep Heysham-1, komórki *A. castellanii* oraz komórki makrofaga linii THP-1. Obrazy bakterii zbierano przy wzbudzeniu 470 nm i oknie emisji 520/35 nm. Obrazy *A. castellanii* i makrofagów linii THP-1 rejestrowano przy wzbudzeniu 635 nm i oknie emisji 690/70 nm.

Wyodrębnienie wydajności przekazu energii, a co za tym idzie wyznaczenie rzeczywistej odległości pomiędzy oddziaływującymi cząsteczkami przeprowadzano na dwa różne, a zarazem komplementarne sposoby: poprzez wyznaczanie wartości czasu życia donora oraz poprzez pomiary wielkości intensywności fluorescencji ubywającej w kanale spektralnym donora i pojawiającej się w kanale spektralnym akceptora energii. Miejsca dla których zachodził transfer energii (w wybranym przykładzie pomiędzy bakterią *L. pneumophila* szczep Heysham-1, a komórką *A. castellanii*) zaprezentowano na **Ryc. 36**.

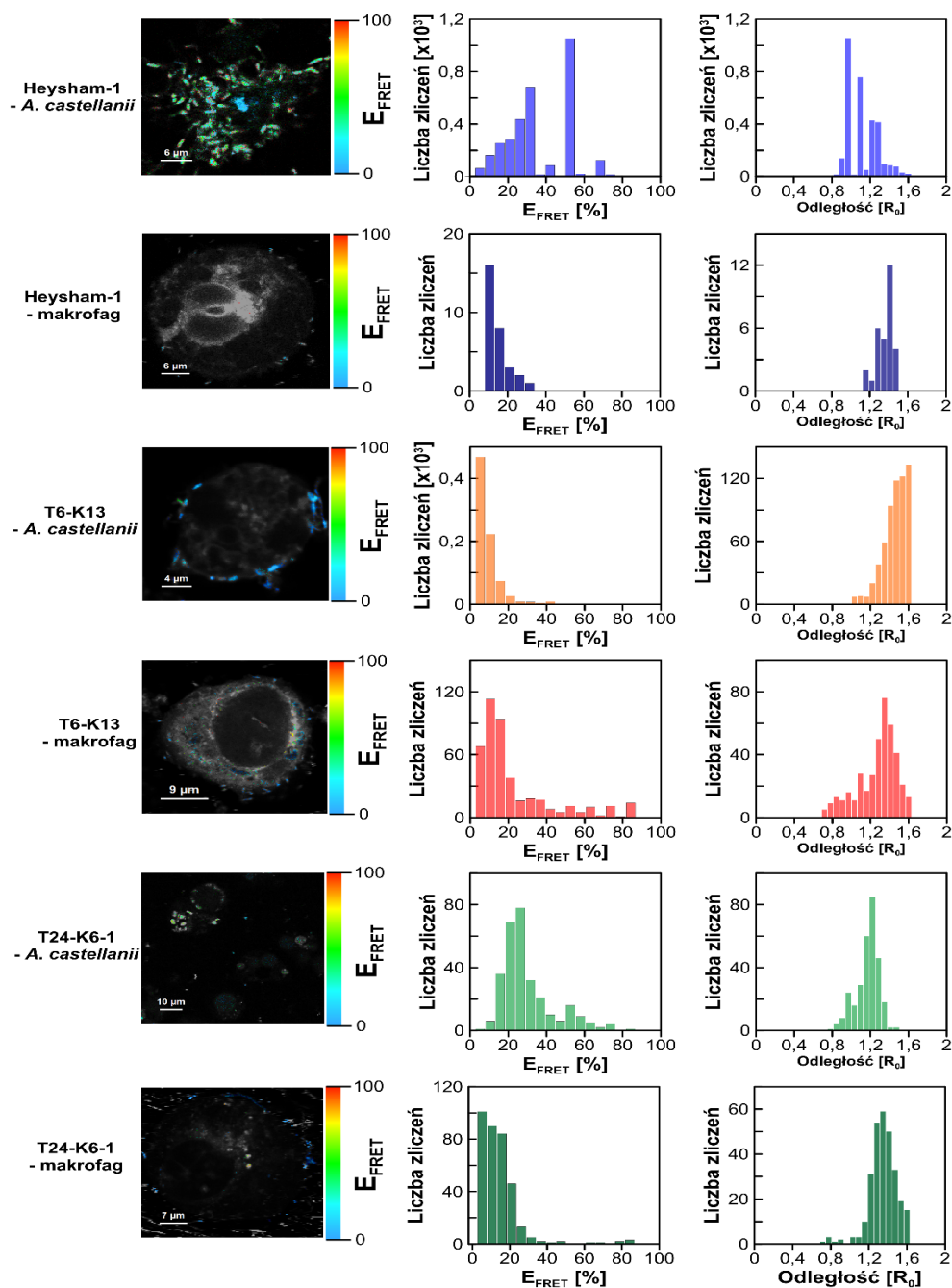


Ryc. 36 A) Obraz FLIM prezentujący miejsca oddziaływania bakterii *L. pneumophila* (szczep Heysham-1), a komórką *A. castellanii*. Kolor odzwierciedla wydajność transferu energii (E_{FRET}) z miejsc jego występowania. B) Histogram obrazujący re-dystrybucję wartości efektywności transferu energii, który ma swoje odzwierciedlenie w rozkładzie rzeczywistych odległości występujących pomiędzy donorem i akceptorem energii, co zaprezentowano w panelu C).

Wydajność przekazu energii została przedstawiona przy użyciu kolorów tęczy oraz na histogramie umieszczonym po prawej stronie obrazu. Efektywność przekazu energii układała się na kształt pewnej dystrybucji wartości z wyraźnie zaznaczonym maksimum. Na podstawie tak uzyskanych wartości można odtworzyć rozkład rzeczywistych odległości pomiędzy oddziaływującymi cząsteczkami. Oddziaływanie *L. pneumophila* szczep Heysham-1, T6-K13 oraz T24-K6-1 z *A. castellanii* oraz makrofagami przedstawia **Ryc. 37**.

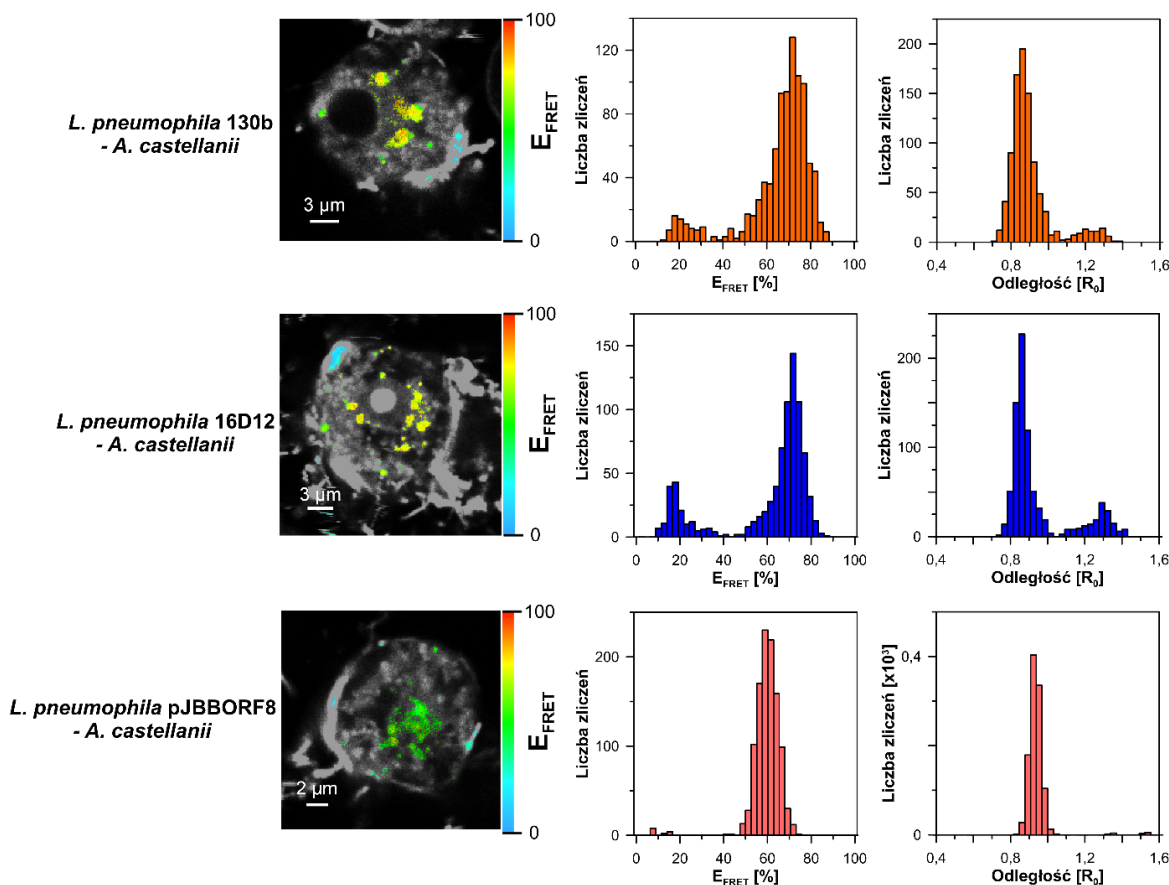
Najwyższą wydajnością transferu energii, a co za tym idzie najsilniejszym oddziaływaniem charakteryzował się szczep Heysham-1, a następnie komplementant T24-K6-1 oraz mutant T6-K13 – z maksimumami histogramów odpowiednio przy wartościach 34%, 28% oraz 6%. Pomiar wielkości oddziaływania tych samych szczepów bakteryjnych z makrofagami

ponownie wskazały na silniejsze oddziaływanie z bakteriami szczepów Heysham-1, T24-K6-1 (wydajność transferu energii odpowiednio 16% i 15%), a słabsze z T6-K13 (10%).



Ryc. 37 Obrazy prezentujące miejsca, dla których zachodził bezpromienisty transfer energii między bakteriami Heysham-1, T6-K13 i T24-K6-1 wybarwionymi SYTO9, a amebami/makrofagami wybarwionymi błękitem Nilu oraz rozkład wydajności transferu energii. Kolor na obrazach odzwierciedla efektywność przekazu energii elektronicznej. Wzbudzenia realizowano przy użyciu linii laserowej 470 nm, a obserwację w oknie emisyjnym 520/35 nm.

Analogiczne pomiary zostały wykonane dla *L. pneumophila* szczep 130b oraz mutantu 16D12 i komplementanta pJBBOR8 (Ryc. 38).

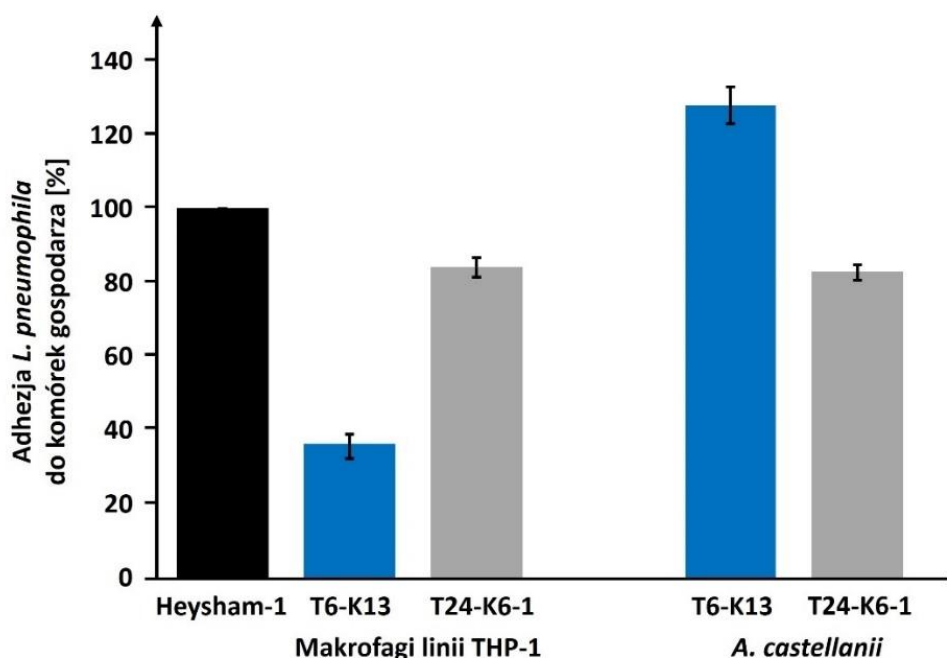


Ryc. 38 Obrazy FLIM oparte na analizie intensywności fluorescencji szczepów *L. pneumophila* 130 oraz 16D12, komplementanta pJBBOR8, a także *A. castellanii*. Szczepy bakterii zostały znakowane fluoroforem SYTO9, natomiast ameba i makrofagi fluoroforem błękit Nilu. Długość fali wzbudzającej wynosząca 470 nm umożliwiła selektywne i efektywne obrazowanie luminescencji pochodzącej od komórek bakteryjnych. W kontekście analizy oddziaływania szczepów *L. pneumophila* z amebami lub makrofagami (gdzie brak obserwacji transferu energii typu FRET), sygnał fluorescencji był selektywnie rejestrowany w dwóch różnych kanałach obserwacyjnych, przy długościach fal 550/88 nm dla SYTO9 oraz przy długościach fal reprezentujących wyłącznie emisję światła dla fluoroforu błękit Nilu (690/70 nm). Po prawej stronie obrazów FLIM (panele środkowe) zaprezentowano histogramy rozkładu wydajności transferu energii typu FRET odpowiadające miejscom oddziaływania zaznaczone skalą kolorów na obrazach FLIM. Rzeczywisty rozkład odległości (wyrażony w wartościach $R_0 = 37\text{\AA}$) zamieszczono w panelach po prawej stronie ryciny.

Efektywność transferu energii FRET zarówno dla szczepów 130b, 16D12 oraz pJB-BOR8 była stosunkowo wysoka, osiągając maksimum w okolicach 70%. Zaobserwowano znaczną liczbę zdarzeń o tej wartości efektywności transferu energii. Oba szczepy bakterii wykazywały dodatkowy gaussowski rozkład wartości efektywności transferu, chociaż z mniejszą liczbą zdarzeń, przy maksimum wartości efektywności wynoszącej 20%. Nie zaobserwowano transferu energii FRET między bakteriami 130b i 16D12, a makrofagami linii THP-1.

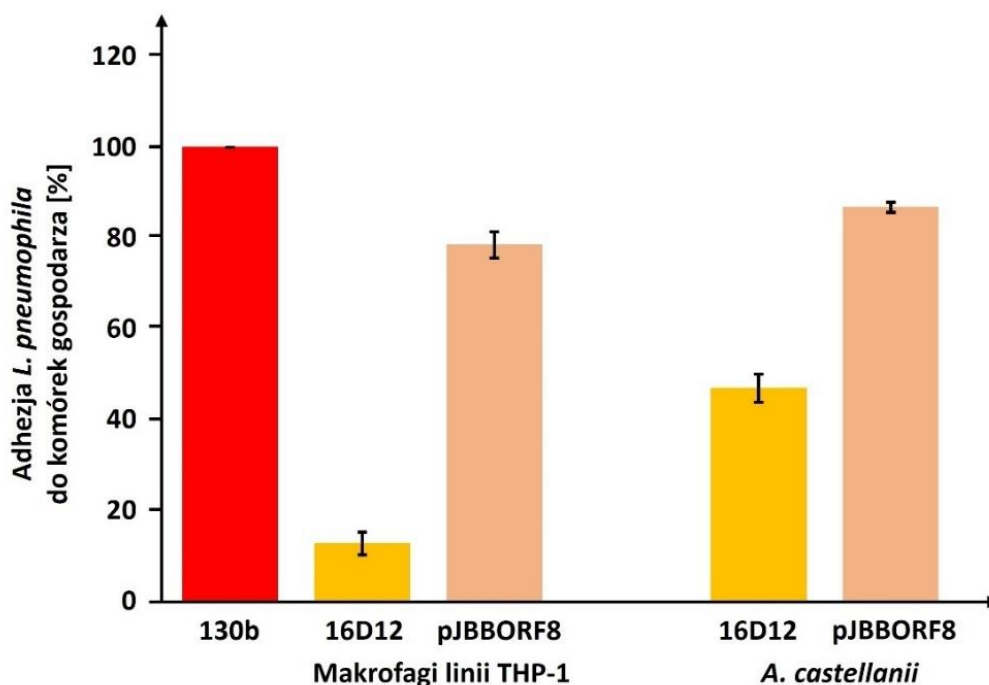
4.3.3. Adhezja *L. pneumophila* do makrofagów linii THP-1 oraz komórek *A. castellanii*

Szczep T6-K13 o 64% słabiej ulegał adhezji do makrofagów linii THP-1 niż szczep dziki Heysham-1. Mutant T6-K13 wykazywał 28% wzrost zdolności adhezji do komórek *A. castellanii* w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1. Zdolność adhezji komplementanta T24-K6-1 do komórek makrofagów linii THP-1 wynosiła 84%, a do komórek ameb 83% (Ryc. 39).



Ryc. 39 Adhezja *L. pneumophila* szczepu dzikiego Heysham-1, mutantu T6-K13 oraz komplementanta T24-K6-1 do makrofagów linii THP-1 oraz komórek *A. castellanii*.

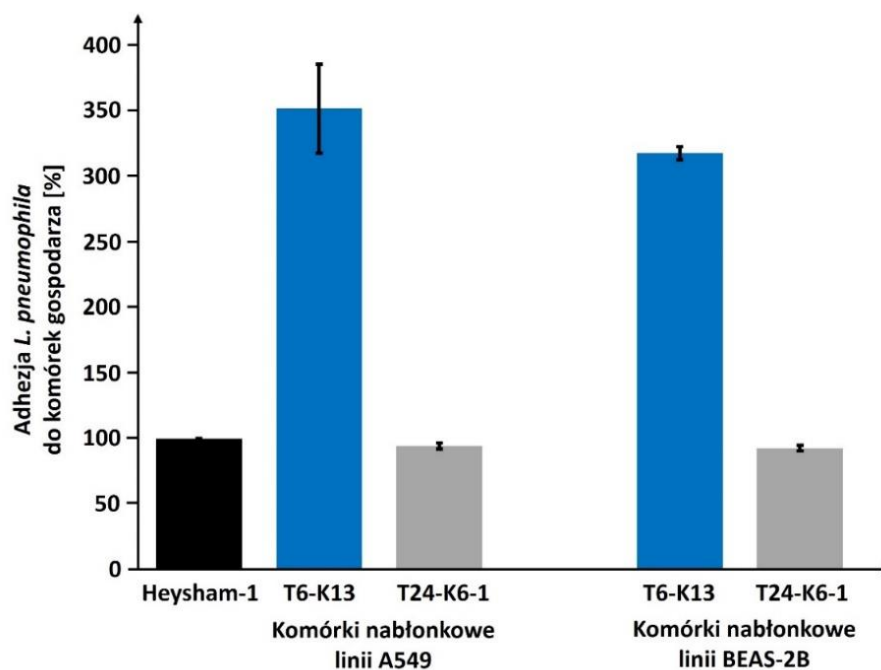
Adhezja szczepu 16D12 do makrofagów linii THP-1 była mniejsza o 87% w porównaniu do szczepu dzikiego 130b, a do komórek *A. castellanii* o 53% w porównaniu do szczepu dzikiego 130b. Adhezja szczepu komplementacyjnego pJBBORF8 do komórek THP-1 wynosiła 80%, natomiast do komórek ameb 87% (**Ryc. 40**).



Ryc. 40 Zdolność adhezji *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b, mutantu 16D12 oraz komplementanta pJBBORF8 do makrofagów linii THP-1 oraz komórek ameb *A. castellanii*.

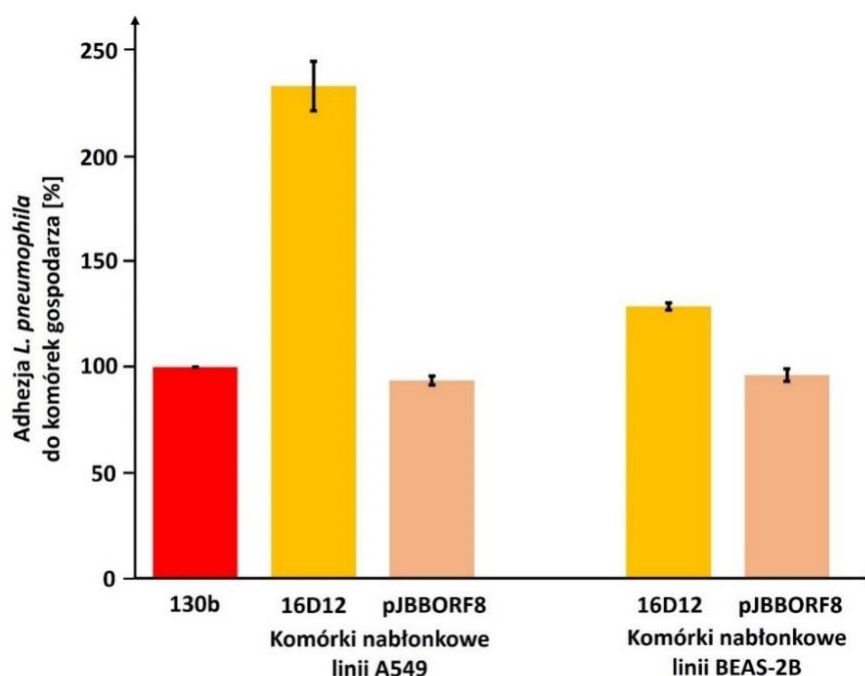
4.3.4. Adhezja *L. pneumophila* do komórek linii nabłonkowych A549 i BEAS-2B

Mutant T6-K13 wykazywał ponad 3,5-krotny wzrost adhezji do komórek linii A549 oraz 3-krotny wzrost adhezji do komórek linii BEAS-2B w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1 (**Ryc. 41**).



Ryc. 41 Adhezja *L. pneumophila* szczepu dzikiego Heysham-1 i mutantu T6-K13 do komórek nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B.

Mutant 16D12 również cechował się lepszą zdolnością adhezji do komórek nabłonkowych w porównaniu do szczepu dzikiego 130b (**Ryc. 42**). Szczep 16D12 wykazywał 2,3-krotny oraz 1,3-krotny wzrost zdolności adhezji odpowiednio do komórek linii A549 oraz BEAS-2B w porównaniu do szczepu dzikiego 130b. Komplementant pJBBORF8 charakteryzował 80% zdolnością adhezji do komórek THP-1 oraz 87% zdolnością adhezji do komórek ameb.



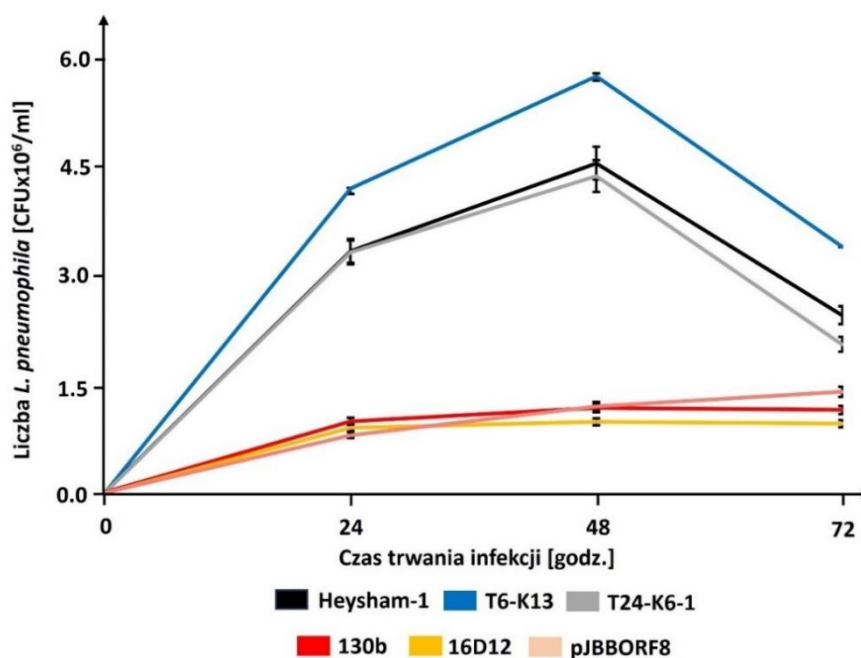
Ryc. 42 Adhezja *L. pneumophila* szczepów 130b i 16D12 do komórek nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B.

Mutanty z defektywną syntezą regionu polisacharydowego LPS wykazywały lepszą zdolność adhezji do komórek nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B w porównaniu do szczepów dzikich. Największa różnica zdolności adhezji między szczepem dzikim, a mutantem wystąpiła dla szczepu T6-K13, którego zdolność adhezji do komórek nabłonkowych obu linii była ponad 3-krotnie wyższa od szczepu dzikiego Heysham-1.

4.3.5. Test infekcji *A. castellanii* i makrofagów linii THP-1 przez *L. pneumophila*

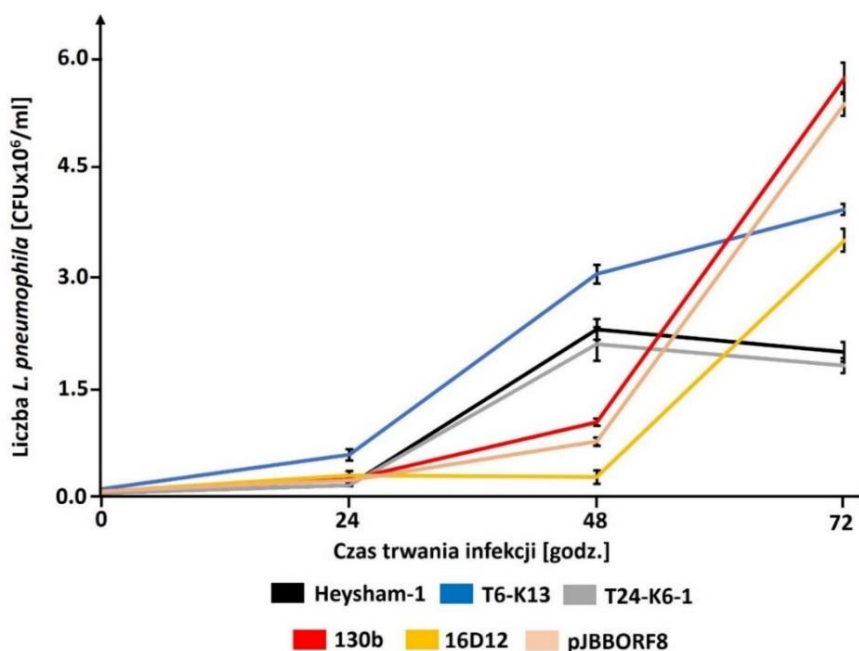
Test infekcji wykazał, że mutant T6-K13 efektywniej namnażał się zarówno w komórkach makrofagów linii THP-1, jak i w komórkach ameb, w każdym z badanych punktów czasowych (**Ryc. 43**; **Ryc. 44**). Największa różnica wystąpiła po 72 godzinach od zakażenia ameb, gdzie liczba komórek mutantu, które uległy namnożeniu w komórkach ameb była blisko 2-krotnie wyższa od szczepu dzikiego Heysham-1. Po 48 i 72 godzinach od zakażenia liczba komórek T6-K13 uwolnionych z makrofagów była około 1,4-krotnie wyższa w porównaniu do komórek szczepu dzikiego Heysham-1 (**Ryc. 43**). Szczep komplementacyjny

T24-K6-1 wykazywał zbliżoną do szczepu dzikiego Heysham-1 zdolność do wewnątrzkomórkowego namnażania się zarówno w komórkach makrofagów linii THP-1, jak i w komórkach ameb.



Ryc. 42 Infekcja komórek makrofagów linii THP-1 szczepami dzikimi *L. pneumophila* (Heysham-1, 130b), mutantami defektywnymi w syntezie LPS (T6-K13, 16D12) oraz szczepami komplementacyjnymi (T24-K6-1, pJBBORF8).

W makrofagach linii THP-1 mutant 16D12 namnażał się słabiej w porównaniu do szczepu dzikiego 130b. Po 48 oraz 72 godzinach od zakażenia liczba komórek 16D12 uwolnionych z makrofagów była około 1,2-krotnie niższa w porównaniu do szczepu dzikiego 130b (**Ryc. 42**).



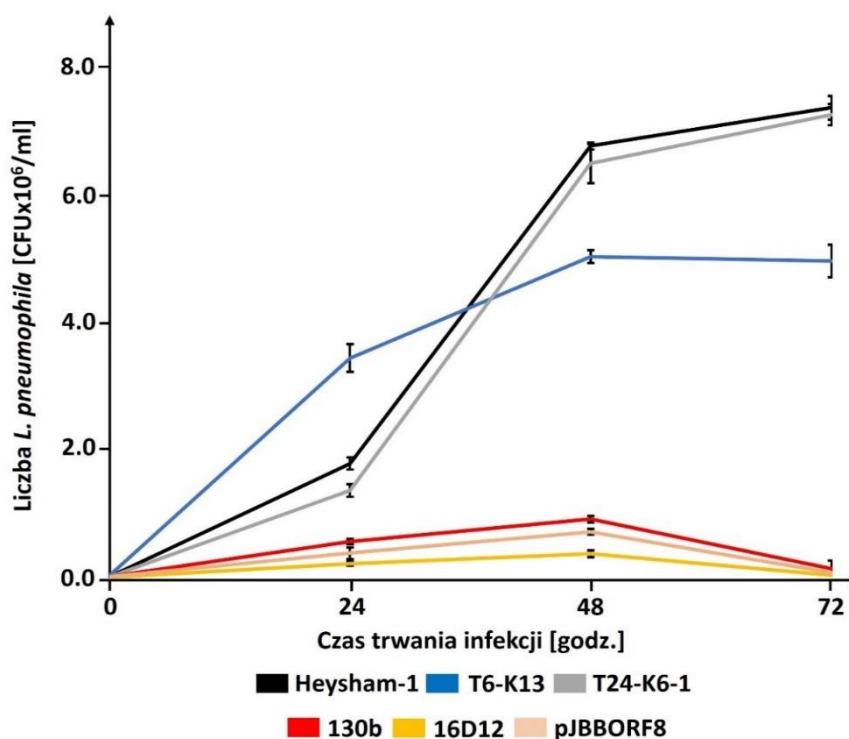
Ryc. 43 Infekcja komórek *A. castellanii* przez szczepy dzikie *L. pneumophila*, mutanty defektywne w syntezie LPS oraz szczepy komplementacyjne.

Mutant 16D12 wykazywał nieznacznie lepszą (o około 6%) zdolność do wewnątrzkomórkowego namnażania się w amebach po 24 godzinach od zakażenia w porównaniu do szczepu dzikiego 130b (**Ryc. 43**). Wyraźna różnica w namnażaniu się bakterii wewnątrz komórek ameb wystąpiła po 48 godzinach i 72 godzinach od zakażenia, gdzie liczba komórek szczepu dzikiego 130b była wyższa w porównaniu do mutantu 16D12 odpowiednio 4-krotnie oraz 1,6-krotnie (**Ryc. 43**). Szczep komplementacyjny pJBBORF8 wykazywał porównywalną do szczepu 130b zdolność do wewnątrzkomórkowej proliferacji zarówno w komórkach makrofagów linii THP-1, jak i w komórkach ameb.

4.3.6. Infekcja komórek linii nabłonkowych A549 i BEAS-2B przez *L. pneumophila*

Badano również zdolność *L. pneumophila* szczepów dzikich Heysham-1 i 130b oraz mutantów defektywnych w syntezie regionu polisacharydowego LPS – T6-K13 i 16D12 do namnażania się w komórkach nabłonkowych linii A549 oraz BEAS-2B.

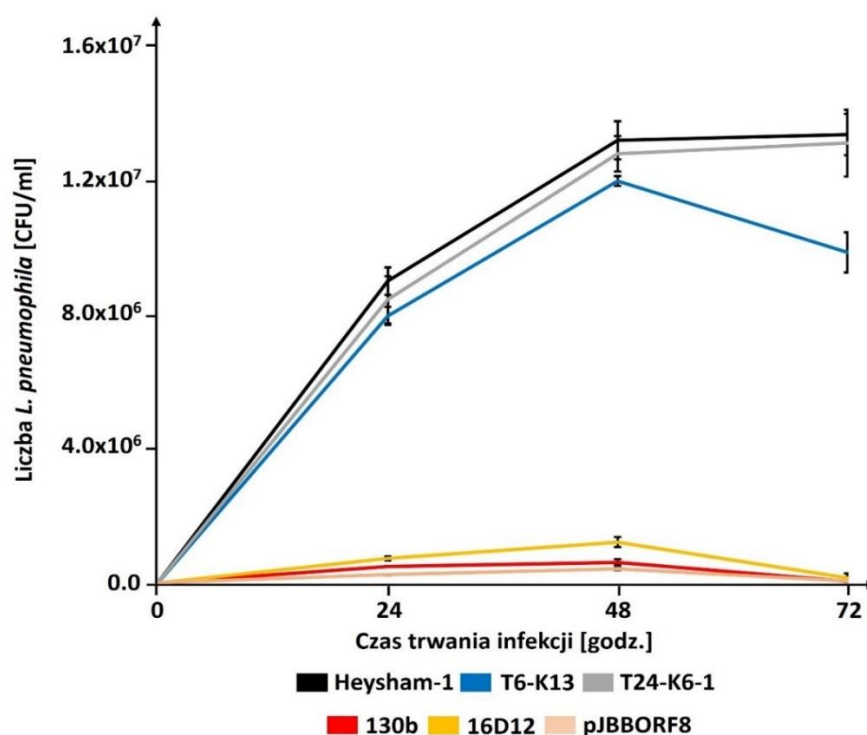
Mutant T6-K13 dwukrotnie lepiej namnażał się w komórkach nabłonkowych linii A549 po 24 godzinach od zakażenia w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1 (**Ryc. 44**). Po upływie 48 oraz 72 godzinach od zakażenia liczba komórek szczepu T6-K13 uwolnionych z komórek gospodarza była blisko 1,5-krotnie niższa od liczby komórek szczepu Heysham-1. Komplementant T24-K6-1 wykazywał zbliżoną zdolność do wewnątrzkomórkowej proliferacji w komórkach linii A549 w porównaniu do szczepu Heysham-1.



Ryc. 44 Wewnątrzkomórkowa replikacja bakterii w komórkach nabłonkowych linii A549. Komórki zostały zakażone szczepami dzikimi *L. pneumophila* (Heysham-1, 130b) i mutantami (T6-K13, 16D12) oraz szczepami komplementacyjnymi T24-K6-1 i pJBBORF8.

Szczep dziki 130b charakteryzował się lepszą zdolnością do wewnątrzkomórkowego namnażania się w komórkach linii A549 w porównaniu do mutantu 16D12 (**Ryc. 44**). Liczba komórek szczepu dzikiego uwolnionych po 24 i 48 godzinach od zakażenia była 2,5-krotnie wyższa w porównaniu do liczby komórek szczepu 16D12. Komplementant pJBBORF8 wykazywał porównywalną do szczepu dzikiego 130b zdolność do namnażania się w komórkach linii A549.

Mutant T6-K13 charakteryzował się słabszą zdolnością do proliferacji w komórkach linii BEAS-2B w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1, przy czym największa różnica wystąpiła po 72 godzinach od zakażenia (**Ryc. 45**). Szczep komplementacyjny T24-K6-1 wykazywał porównywalną do szczepu dzikiego Heysham-1 zdolność do namnażania się w komórkach linii BEAS-2B.



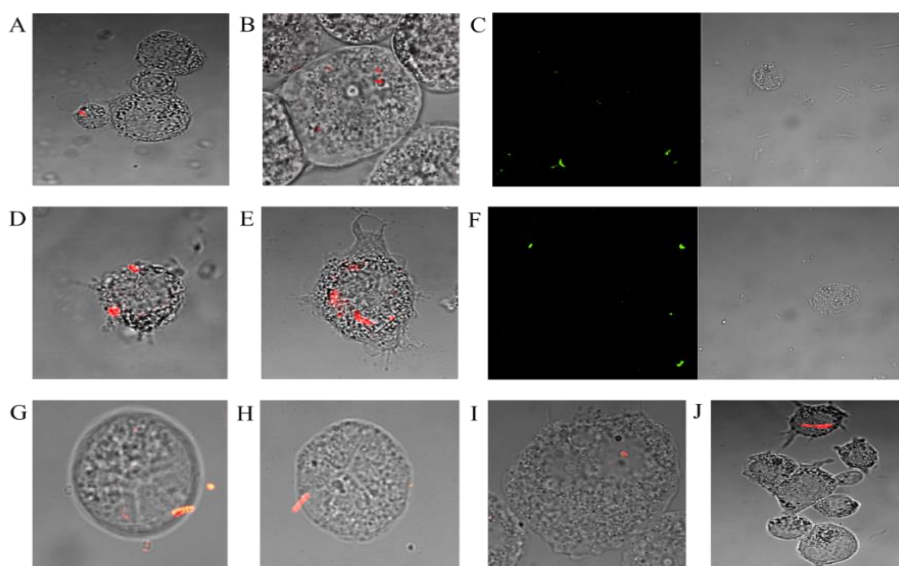
Ryc. 45 Wewnątrzkomórkowa proliferacja *L. pneumophila* szczepów dzikich (*Heysham-1*, *130b*), mutantów defektywnych w syntezie LPS (*T6-K13*, *16D12*) oraz komplementantów (*T24-K6-1*, *pJBBOR8*) w komórkach nabłonkowych linii BEAS-2B.

Szczep 130b wykazywał słabszą zdolność proliferacji w komórkach nabłonkowych linii BEAS-2B w porównaniu do mutantu 16D12. Po 24 i 48 godzinach od zakażenia komórek linii BEAS-2B liczba komórek szczepu dzikiego 130b była odpowiednio 1,5-raza i blisko 2-krotnie niższa od liczby komórek szczepu 16D12.

Porównując zdolność do wewnątrzkomórkowego namnażania się szczepów dzikich Heysham-1 i 130b w komórkach linii A549 i BEAS-2B, szczep Heysham-1 charakteryzował się znacznie lepszą zdolnością do namnażania się w komórkach nabłonkowych, szczególnie po 24 i 48 godzinach od zakażenia, w porównaniu do szczepu 130b. Po 24 godzinach od zakażenia, liczba bakterii szczepu Heysham-1, uwolnionych z komórek linii A549, była 4-krotnie większa, a po 48 godzinach, 8-krotnie większa w porównaniu do szczepu 130b.

4.3.7. Test inwazji komórek *A. castellanii* i makrofagów linii THP-1 bakteriami *L. pneumophila*

W celu sprawdzenia czy struktura LPS *L. pneumophila* może wpływać na inwazję komórek eukariotycznych określono stosunek bakterii wewnątrzkomórkowych do całkowitej liczby bakterii związanych z komórkami za pomocą różnicowego barwienia immunofluorescencyjnego. Inwazja szczepu T6-K13 była niższa do obu rodzajach komórek gospodarza, przy czym wskaźnik inwazji wynosił 80% dla makrofagów i 90% dla *A. castellanii*. Podobnie wskaźnik inwazji szczepu 16D12 wynosił 85% dla makrofagów i 92% dla *A. castellanii* (Ryc. 46).



Ryc. 46 Przykładowe zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego procesu inwazji szczepów: **A)** Heysham-1 do komórek *A. castellanii*; **B)** T6-K13 do komórek *A. castellanii*; **C)** T6-K13 do komórek *A. castellanii*; **D)** Heysham-1 do makrofagów linii THP-1; **E)** T6-K13 do makrofagów linii THP-1; **F)** 130b do komórek *A. castellanii*; **G)** Heysham-1 do komórek *A. castellanii*; **H)** T6-K13 do komórek *A. castellanii*; **I)** 130b do komórek *A. castellanii*; **J)** 16D12 do makrofagów linii THP-1 (pow. 630x).

Badania oddziaływania szczepów dzikich i mutantów defektywnych w syntezie LPS z komórkami eukariotycznymi wykazały, że struktura LPS determinuje zdolność do adhezji, inwazji i wewnątrzkomórkowego namnażania się w komórkach gospodarza.

4.4. Oznaczenie poziomu indukcji cytokin prozapalnych w makrofagach linii THP-1 stymulowanych komórkami *L. pneumophila*

Bakterie szczepu Heysham-1 oraz szczepu T24-K6-1 w dawce infekcyjnej 20 MOI i 100 MOI indukowały mierzalny poziom IL-6 (**Tabela 6**). Szczepy te w dawce 20 MOI indukowały około 1,5 razy wyższy poziom IL-6 niż w dawce 100 MOI. Komórki mutantu T6-K13 w dawce 100 MOI indukowały niski poziom tej cytokiny wynoszący 96 pg/ml i porównywalny do próby kontrolnej. Szczep dziki Heysham-1 w dawce 20 MOI indukował około dwukrotnie wyższy poziom TNF- α w porównaniu do dawki 100 MOI. Mutant T6-K13 w dawce 20 MOI indukował 1,3-krotnie niższy poziom TNF- α w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1.

Komórki szczepu dzikiego 130b oraz komplementacyjnego pJBBORF8 nie indukowały IL-6 w dawce 20 MOI oraz 100 MOI. Mutant 16D12 indukował IL-6 jedynie w dawce 20 MOI na poziomie 112 pg/ml. W dawce 20 MOI szczep dziki 130b indukował około dwukrotnie niższy poziom TNF- α w stosunku do mutantu 16D12. Komórki mutantu 16D12 w dawce 20 MOI indukowały około dwukrotnie wyższy poziom TNF- α w porównaniu do dawki 100 MOI.

Tabela 6 Poziom indukcji prozapalnych cytokin (IL-6, TNF- α) w makrofagach linii THP-1 stymulowanych komórkami *L. pneumophila*.

Szczep	Dawka infekcyjna [MOI]	Poziom cytokin	
		IL-6 [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]
Heysham-1	20	260 \pm 25	612 \pm 74 ^a
	100	166 \pm 20	316 \pm 10
T6-K13	20	0	472 \pm 34
	100	96 \pm 8	0
T24-K6-1	20	286 \pm 22	590 \pm 32
	100	172 \pm 18	295 \pm 20
	20	0	316 \pm 22

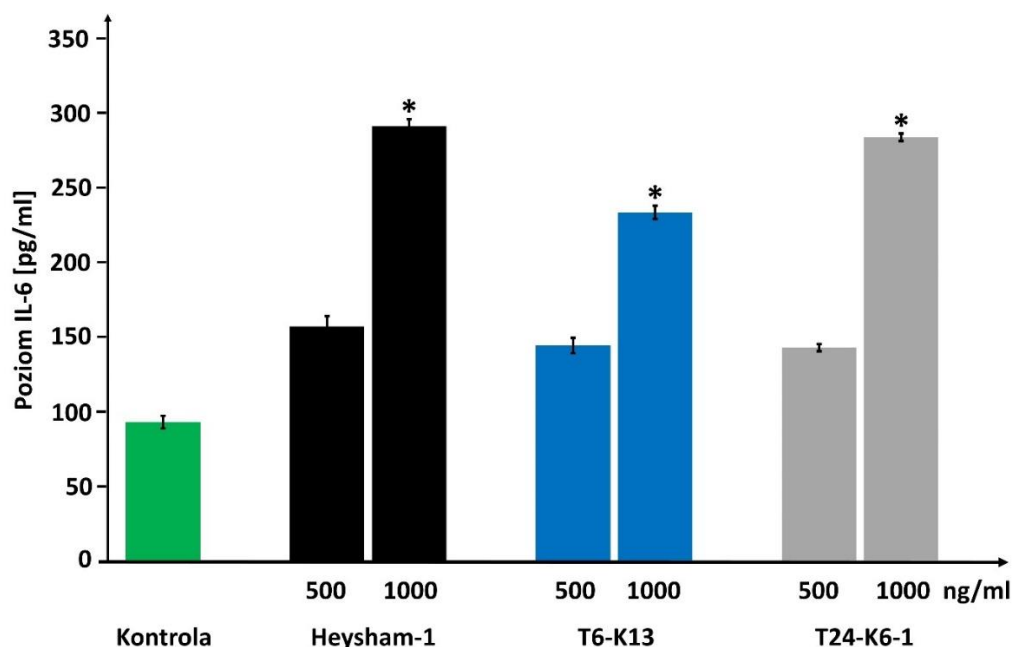
130b	100	0	0
16D12	20	112±14	692±44 ^a
	100	0	372±42
pJBBORF8	20	0	290±44
	100	0	0
Kontrola		94±8,8	142,8±38

a - istotne statystycznie w porównaniu z wyższą dawką bakterii, test *t* Studenta, $p \leq 0.05$.

Komórki szczepów dzikich *L. pneumophila* i mutantów defektywnych w syntezie LPS były słabymi induktorami prozapalnych cytokin (IL-6 i TNF- α) zarówno w dawce infekcyjnej 20 MOI, jak i 100 MOI. Szczepy dzikie *L. pneumophila* oraz mutanty skuteczniej indukowały wytwarzanie prozapalnych cytokin (IL-6, TNF- α) w dawce 20 MOI niż w dawce 100 MOI.

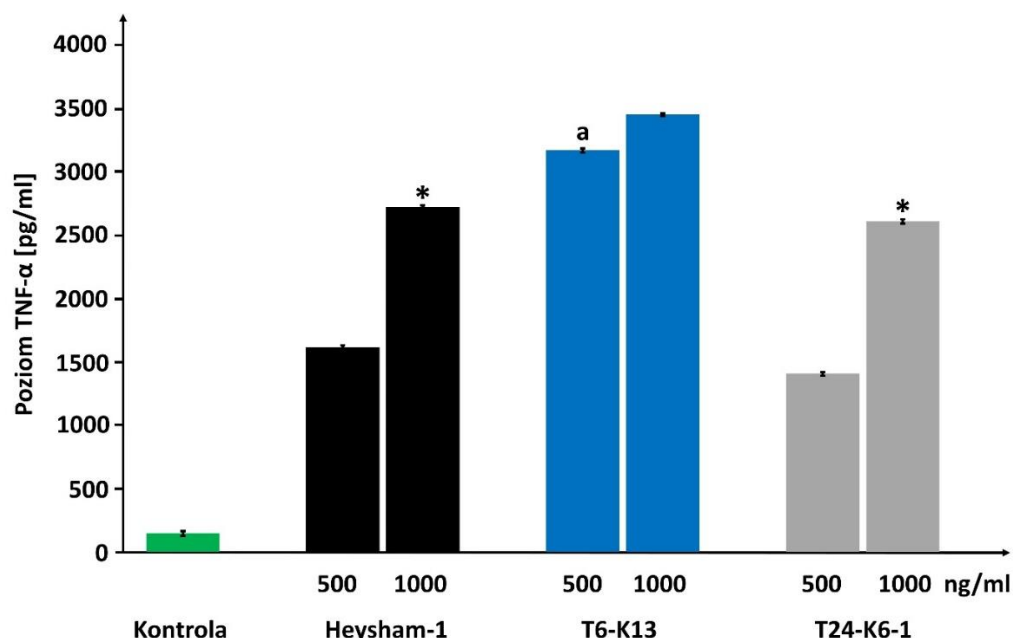
4.4.1. Oznaczenie poziomu indukcji cytokin prozapalnych w makrofagach linii THP-1 indukowanych LPS *L. pneumophila*

LPS w stężeniu 500 ng/ml wyizolowany ze wszystkich trzech szczepów (Heysham-1, T6-K13 i T24-K6-1) indukował porównywalne poziomy IL-6 w makrofagach linii THP-1. Wyższe stężenie LPS (1000 ng/ml) powodowało istotny wzrost produkcji IL-6 w porównaniu z niższym stężeniem LPS, jednak nie odnotowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi szczepami *L. pneumophila* (**Ryc. 47**).



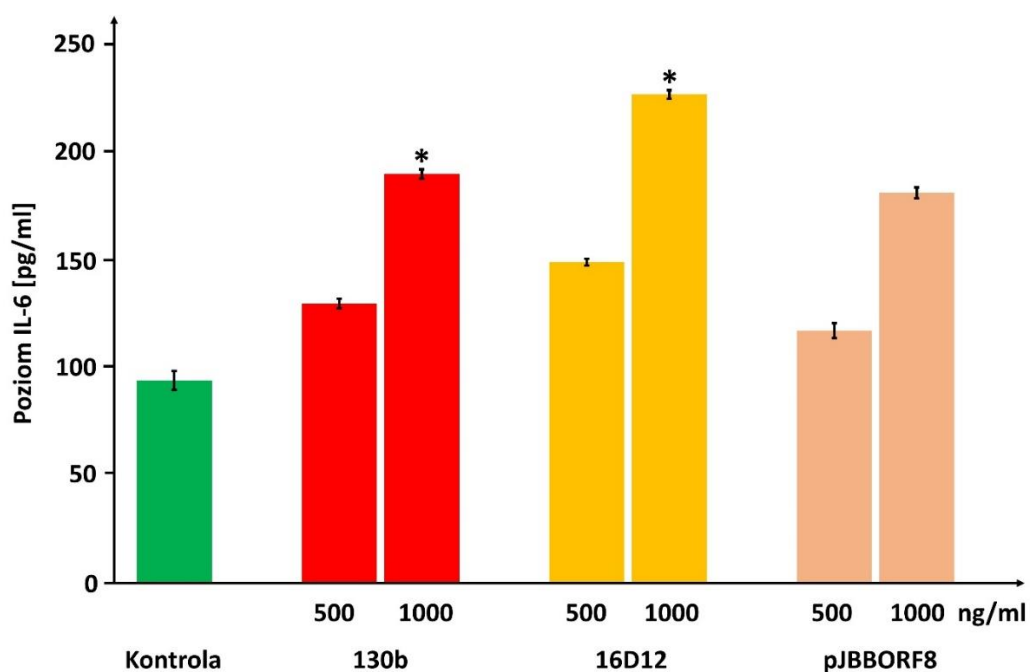
Ryc. 47 Poziom indukcji IL-6 w makrofagach linii THP-1 stymulowanych preparatami LPS szczepu Heysham-1, T6-K13 oraz T24-K6-1 (500 ng/ml, 1000 ng/ml). Próba kontrolna: IL-6 – 94 pg/ml. * istotne statystycznie w porównaniu z niższym stężeniem LPS, test *t* Studenta, $p \leq 0.05$.

W porównaniu do LPS wyizolowanego ze szczepu Heysham-1, LPS wyizolowany z komórek mutantu T6-K13 w stężeniu 500 ng/ml był dwukrotnie silniejszym induktorem TNF- α (różnica statystycznie istotna), natomiast LPS w wyższym stężeniu 1000 ng/ml tylko w nieznacznym (różnica statystycznie nieistotna) stopniu zwiększał produkcję tej cytokiny (**Ryc. 48**). Poziom indukcji obu cytokin przez preparat LPS wyizolowany ze szczepu komplementacyjnego T24-K6-1, zarówno w stężeniu 500 ng/ml, jak i 1000 ng/ml był porównywalny do poziomu indukowanego przez LPS szczepu dzikiego Heysham-1.



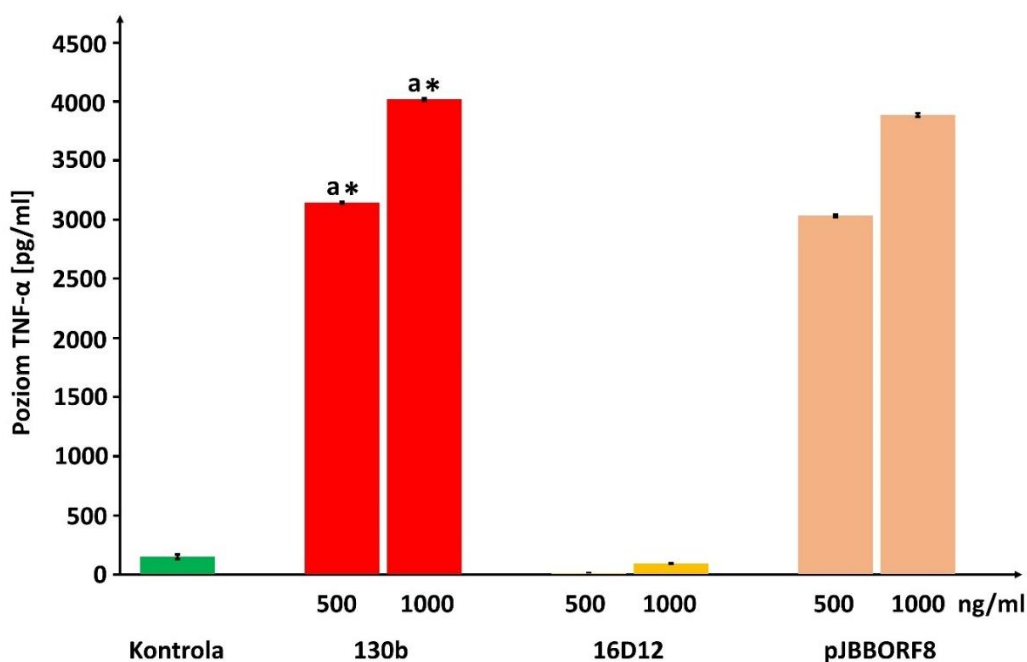
Ryc. 48 Poziom indukcji TNF- α w makrofagach linii THP-1 stymulowanych preparatami LPS szczepu Heysham-1, T6-K13 oraz T24-K6-1 (500 ng/ml, 1000 ng/ml). Próba kontrolna TNF- α – 142,8 pg/ml. * istotne statystycznie w porównaniu z niższym stężeniem LPS, test *t* Studenta, $p \leq 0.05$. *a* – różnica statystycznie istotna w porównaniu ze szczepami Heysham-1 i T24-K6-1, $p \leq 0.05$, Test Anova, post-hoc Tukeya.

W przypadku LPS izolowanych ze szczepu dzikiego 130b oraz mutantu 16D12 nie obserwowano istotnych różnic w zdolności tych szczepów do indukcji IL-6 w makrofagach linii THP-1. Warto jednak podkreślić, że wyższe stężenie LPS obu szczepów wykazało większą skuteczność w indukowaniu tej cytokiny w porównaniu do niższego stężenia endotoksyny, a różnica ta była istotna statystycznie (**Ryc. 49**).



Ryc. 49 Poziom indukcji IL-6 w makrofagach linii THP-1 stymulowanych preparatami LPS szczepu 130b oraz 16D12 (500 ng/ml, 1000 ng/ml). Próba kontrolna: IL-6 - 94 pg/ml, * istotne statystycznie w porównaniu z niższym stężeniem LPS, test *t* Studenta, $p \leq 0.05$.

Porównując zdolność do indukcji TNF- α przez LPS wyizolowany ze szczepów 130b i 16D12, jedynie LPS szczepu dzikiego 130b powodował znaczące wytwarzanie tej cytokiny, podczas gdy LPS mutantu 16D12 indukował produkcję TNF- α na poziomie zbliżonym do próby kontrolnej (**Ryc. 50**).



Ryc. 50 Poziom indukcji TNF- α w makrofagach linii THP-1 stymulowanych preparatami LPS szczepu 130b oraz szczepu 16D12 (500 ng/ml, 1000 ng/ml). Próba kontrolna: TNF- α - 142,8 pg/ml, * istotne statystycznie w porównaniu z niższym stężeniem LPS, test *t* Studenta, $p \leq 0.05$. a – różnica statystycznie istotna w porównaniu ze szczepem 16D12, $p \leq 0.05$, Test Anova, post-hoc Tukeya.

Badane szczepy *L. pneumophila* nie stymulowały wytwarzania mierzalnego poziomu IFN- γ z wyjątkiem LPS wyizolowanego ze szczepu Heysham-1, który w stężeniu 1000 ng/ml, indukował IFN- γ na poziomie 312 pg/ml.

Preparaty LPS badanych szczepów *L. pneumophila* były silniejszymi induktorami prozapalnych cytokin w porównaniu do komórek bakterii. Synteza cytokin pod wpływem LPS *L. pneumophila* była zależna od użytej dawki i wzrastała wraz ze wzrostem stężenia LPS. Poziom indukowanego TNF- α pod wpływem LPS *L. pneumophila* był znacząco wyższy w porównaniu z poziomem IL-6.

Wyniki badań przeprowadzone na szczepach Heysham-1, T6-K13 i T24-K6-1 zostały opublikowane w pracy: **Kowalczyk B.**, Petzold M., Kaczyński Z., Szuster-Ciesielska A., Luchowski R., Gruszecki W.I., Fuchs B., Galuska C.E., Choma A., Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. **2023**. Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 facilitates interaction with host cells. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 14602.

V DYSKUSJA

Na przełomie lipca i sierpnia 2023 roku na terenie Rzeszowa i okolic miała miejsce największa, jak do tej pory w Polsce, epidemia zapalenia płuc wywołana przez bakterie *L. pneumophila*. Zachorowało wówczas 166 osoby, a 23 zmarły (WHO, 2023). W ciągu ostatniej dekady liczba zachorowań na chorobę legionistów znacznie wzrosła wśród mieszkańców Unii Europejskiej i Stanów Zjednoczonych, co wskazuje, że choroba ta może stać się poważnym problemem zdrowotnym, szczególnie w kontekście starzejących się społeczeństw, zmian klimatycznych i wzrastającej presji na zasoby wodne (Barskey i in., 2022; Samuelsson i in., 2023). Badania seroprewalencji przeprowadzone w różnych krajach świata wykazały potencjalne, ciągłe narażenie ludzi na różne serogrupy i gatunki bakterii z rodzaju *Legionella* (Graham i in., 2020). Pomimo, że znanych jest ponad 70 gatunków zaliczonych do rodzaju *Legionella*, to nie wszystkie gatunki i serogrupy w jednakowym stopniu odpowiedzialne są za wywołanie choroby legionistów (Euzéby, 2024). Badania przeprowadzone na 259 szczepach klinicznych i 3128 szczepach środowiskowych wyizolowanych we Francji wykazały, że *L. pneumophila* sg 1 stanowi 28,2% izolatów środowiskowych i 95,4% izolatów klinicznych, co pokazuje, że wysoki odsetek przypadków klinicznych wywołanych przez *L. pneumophila* sg 1 nie znajduje odzwierciedlenia w rozmieszczeniu środowiskowym (Doleans i in., 2004). Analizy porównawcze genomu ponad 200 szczepów legionell wykazały, że wspólną cechą szczepów *L. pneumophila* sg 1 była obecność klastra genów kodujących białka zaangażowane w biosyntezę LPS. Sugeruje to, że unikalna struktura LPS jest przynajmniej częściowo odpowiedzialna za dominującą rolę *L. pneumophila* sg 1 w zakażeniach człowieka (Cazalet i in., 2008). W genomie *L. pneumophila* sg 1 szczepu PtVFX/2014, który był zdolny do przełamania bariery immunologicznej i transmisji między ludźmi, wykryto osiem regionów przenoszonych na drodze horyzontalnego transferu genów, wśród których występowały geny zaangażowane w biosyntezę LPS (Correia, 2016). Wszystkie te badania wskazują z jednej strony na szczególną rolę LPS w zwiększonej wirulencji szczepów *L. pneumophila* sg 1, z drugiej zaś pozostaje otwarte pytanie jakie elementy struktury LPS i w jaki sposób decydują o zdolności do zakażenia i wewnątrzkomórkowego namnażania się tych bakterii w komórkach eukariotycznego gospodarza.

Analiza porównawcza genów odpowiedzialnych za syntezę polisacharydowej części LPS *L. pneumophila* wykazała obecność dwóch głównych regionów: wysoce konserwatywnego o wielkości 15 kbp zawierającego geny od *wecA* (ORF 14) do *lpg0748* (ORF 28) oraz

heterogenego regionu o wielkości 18 kbp, który obejmuje geny od *lpg0779* (ORF 1) do *lpg0764* (ORF 13) (Petzold i in., 2013). Region ORF 8 – ORF 12 występuje wyłącznie w szczepach *L. pneumophila* sg 1 i odpowiada za modyfikację polisacharydowej części LPS (Lüneberg i in., 2000).

Do badań zostały wykorzystane bakterie *L. pneumophila* sg 1 szczep 130b należący do grupy Pontiac, którego kwas polilegionaminowy jest w pełni 8-*O*-acetylowany oraz bakterie *L. pneumophila* sg 1 szczep Heysham-1 nienależący do grupy Pontiac, którego kwas polilegionaminowy jest częściowo 8-*O*-acetylowany. W badaniach wykorzystano również pochodne szczepów dzikich z wprowadzonymi nonsensownymi mutacjami w genach: ORF 8 (szczep 16D12, pochodna szczepu 130b) i ORF 7 (szczep T6-K13, pochodna szczepu Heysham-1). Pozwoliło to na skorelowanie: **1/** poszczególnych mutacji w genach specyficznych dla serogrupy 1 z modyfikacją struktury LPS, **2/** specyficznej modyfikacji LPS ze zmianami właściwości biofizycznych interakcji między bakteriami, a gospodarzem, **3/** specyficznej modyfikacji LPS ze zmianą odpowiedzi immunologicznej makrofagów.

Analiza sygnałów na widmach NMR zarejestrowanych dla polisacharydów *L. pneumophila* szczepu dzikiego 130b oraz mutantu 16D12 wykazała, że mutant pozbawiony jest grup *N*-metylowych związanych z grupą 5-acetylimidoilową kwasu legionaminowego, dostarczając w ten sposób bezpośredniego dowodu, że gen ORF 8 koduje *N*-metylotransferazę, która odpowiada za metylację grupy 5-acetylimidoilowej kwasu legionaminowego. Analiza porównawcza widm NMR części polisacharydowej LPS *L. pneumophila* szczepu Heysham-1 i T6-K13 wykazała różnice w resztach ramnozy pochodzących z regionu rdzeniowego LPS. Pomimo, że analiza widm NMR tych próbek nie wykazała różnic w stopniu ich acetylacji, mutant T6-K13 charakteryzował się niższą hydrofobowością powierzchni komórek w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1. Sugeruje to, że mutant T6-K13 pozbawiony jest grup *O*-acetylowych przyłączonych do ramnoz rdzenia LPS. Brak zaś różnic w sygnałach odpowiadających grupom *O*-acetylowym przyłączonych do ramnoz rdzenia na widmach NMR szczepu dzikiego i mutantu może wynikać z faktu, że hydroliza LPS w buforze octanowym indukuje częściową migrację oraz częściowe usunięcie grupy *O*-acetylowej przyłączonej do ramnozy regionu rdzeniowego (Zähringer, 1995).

Gospodarzem dla bakterii *Legionella*, w środowisku naturalnym są pierwotniaki, głównie z rodzaju *Acanthamoeba*. Zdolność do wewnątrzkomórkowego przeżycia i replikacji w komórkach ameb jest kluczowym krokiem w ewolucji tych bakterii ze środowiska wodnego do organizmu człowieka, gdyż na poziomie komórkowym obserwuje się wiele podobieństw w cyklu zakażenia ameb i makrofagów przez *L. pneumophila* jak np. pobieranie

bakterii na drodze fagocytozy, utworzenie w cytoplazmie gospodarza wakuoli replikacyjnej, unikając fuzji z lizosomami (Escoll i in., 2013). Podobne mechanizmy oddziaływania między *L. pneumophila*, a amebami i makrofagami umożliwiły tym bakteriom nabycie rzadkiej wśród mikroorganizmów zdolności do namnażania się w makrofagach alveolarnych, które są unikalnymi komórkami ewolucyjnie i funkcjonalnie zaadaptowanymi do mikrośrodowiska charakterystycznego dla płuc. W płucach poza makrofagami bakterie *L. pneumophila* namnażają się w komórkach nabłonkowych pęcherzyków płucnych, a efektywna komunikacja między tymi komórkami zapobiega nadmiernej miejscowej rekrutacji komórek odpornościowych do miejsca zakażenia i nadprodukcji cytokin prozapalnych. Wskazuje to na ważną, ale ambiwalentną immunomodulacyjną rolę makrofagów w infekcji płuc wywołanej przez *L. pneumophila* (Schulz i in., 2017). Złożony proces rozpoznawania *L. pneumophila* jest ściśle regulowany, a przełamanie mechanizmów bójczych makrofagów jest wypadkową uruchamianych mechanizmów promujących i hamujących odpowiedź zapalną.

Bardzo wczesnym i jednocześnie istotnym etapem oddziaływania między patogenem a komórką gospodarza, który determinuje dalszy przebieg infekcji jest proces przyłączania się bakterii do komórek eukariotycznych. Adhezja jest procesem dwuetapowym, obejmującym zarówno oddziaływania niespecyficzne i specyficzne. W początkowym etapie adhezji decydującą rolę odgrywają czynniki związane z fizykochemicznymi właściwościami powierzchni bakterii, takimi jak potencjał elektrostatyczny, hydrofobowość i siły van der Waalsa. Pomiar stopnia polarności powierzchni bakterii określony na podstawie własności spektroskopowych barwnika fluorescencyjnego prodanu (o amfifilowej budowie chemicznej) wykazał różnice w hydrofobowości badanych szczepów *L. pneumophila* sg 1. Porównując polarność szczepów dzikich, powierzchnię bakterii szczepu 130b cechowała wyższa hydrofobowość niż szczepu Heysham-1, a zbliżoną do mutanta 16D12. Szczep dziki Heysham-1 charakteryzował się wyższą hydrofobowością niż mutant T6-K13. Badania te pozwalają przypuszczać, że różnice w stopniu polarności powierzchni bakterii mogą wpływać na oddziaływanie z komórkami gospodarza.

Wykorzystanie do badań niezwykle czułej metody mikroskopii obrazowania fluorescencji czasowo-rozdzielczej (FLIM) w celu pomiaru procesu bezpromienistego przekazu energii typu Försterowskiego (FRET) umożliwiło określenie odległości przestrzennej między parami fluorescencyjnych barwników donorowych i akceptorowych, którymi zostały wybarwione szczepy dzikie (Heysham-1, 130b) i mutanty (T6-K13 i 16D12) oraz komórki gospodarza (*A. castellanii* i makrofagi).

Siłę tej metody dodatkowo wzmacnia połączenie pomiarów FLIM-FRET z fotowyciepleniem akceptora, co umożliwiło precyzyjny pomiar czasów życia fluorescencji populacji jedynie donora oraz tła komórkowego. Wysoka efektywność transferu energii FRET wynosząca 70% wystąpiła między szczepem 130b, a *A. castellanii* oraz między mutantem 16D12, a komórkami ameb. Wskazuje to, że brak grup *N*-metylowych związanych z grupą 5-acetylmidoilową kwasu legionaminowego nie wpłynął na oddziaływanie z komórkami *A. castellanii*. Wysoka efektywność transferu energii może być wynikiem bliskiego kontaktu oraz świadczyć o skoncentrowanej lokalizacji *L. pneumophila* szczepu 130b na powierzchni komórek ameb. Odległość między *L. pneumophila* szczepem 130b oraz szczepem 16D12, a komórkami *A. castellanii* wynosiła 33,5 Å i była najniższa spośród badanych szczepów. Obecność dodatkowego rozkładu wartości efektywności transferu energii (o charakterze gaussowskim) przy niższych wartościach może wskazywać na różnorodność oddziaływań między tymi bakteriami, a komórkami ameb. Wartości efektywności transferu energii w tym zakresie mogą sugerować, że istnieją obszary, gdzie oddziaływanie jest mniej skuteczne lub istnieją różne mechanizmy interakcji. Brak obserwowanego transferu energii FRET między *L. pneumophila* szczep 130b, a makrofagami linii THP-1 w kontekście badanego systemu może być interpretowany w świetle kilku potencjalnych scenariuszy, zależnych od specyfiki eksperymentu oraz charakterystyki interakcji między fluoroforami. Jednym z możliwych wyjaśnień jest brak fizycznego kontaktu pomiędzy badanymi komórkami, co prowadzi do nieefektywnego transferu energii między fluoroforami. Przeprowadzone odrębne badania polegające na wyznakowaniu makrofagów błękitem Nilu wykluczyły niską wydajność znakowania. Prawdopodobnie makrofagi wykazują specyficzne właściwości, które mogą wynikać ze zmian ich morfologii w trakcie oddziaływania z bakteriami, co potencjalnie może prowadzić do zablokowania transferu energii i uniemożliwić obserwację efektu FRET. Brak transferu energii wystąpił również w badaniach oddziaływania między *L. pneumophila* szczep Corby, którego kwas polilegionaminowy jest całkowicie 8-*O*-acetylowany a makrofagami linii THP-1, przy efektywnym transferze energii w trakcie oddziaływania tych bakterii z komórkami *A. castellanii* (Palusińska-Szysz i in., 2019(b)). Natomiast w przypadku szczepu dzikiego Heysham-1, który był zdolny do oddziaływania z makrofagami i amebami, poziom transferu energii między tym szczepem, a *A. castellanii* był znacznie niższy w porównaniu do szczepu 130b. Niższy poziom transferu energii może wynikać z większej odległości między szczepem Heysham-1, a komórkami ameb i makrofagów, która wynosiła odpowiednio 36 Å oraz 55,3 Å. Mutant T6-K13 niezdolny do syntezy grup *O*-acetylowych przyłączonych do ramnoz rdzenia LPS wykazywał słabsze oddziaływanie z komórkami

A. castellanii i makrofagami linii THP-1 w porównaniu do szczepu dzikiego. Odległość między komórkami mutanta, a komórkami ameb i makrofagów wynosiła odpowiednio 60 Å i 62 Å.

Analizy FLIM-FRET wykazały, że decydującą rolę na wczesnym etapie oddziaływania *L. pneumophila* z komórkami gospodarza, przed wejściem bakterii do komórek eukariotycznych, odgrywają grupy *O*-acetylowe kwasu legionaminowego LPS. Wyniki tych analiz są spójne z badaniami przeprowadzonymi przez Gosselini i in. na szczepach *L. pneumophila* mAb3/1 pozytywnych i negatywnych, które wykazały, że obecność grup *O*-acetylowych w LPS *L. pneumophila* sg 1 może pośrednio wpływać na kontrolę nieswoistego oddziaływania dalekiego zasięgu - odpychania elektrostatycznego, pod wpływem którego znajdują się bakterie zbliżające się do ujemnie naładowanych komórek gospodarza. Obecność grupy 8-*O*-acetylowej kwasu legionaminowego prowadzi do zmniejszenia gęstości ładunku powierzchniowego, dzięki czemu bakterie mogą silniej oddziaływać z komórkami eukariotycznymi (Gosselin i in., 2011).

Występowanie grup *O*-acetylowych, zarówno kwasu legionaminowego, jak i rdzenia LPS *L. pneumophila*, przypuszczalnie ułatwia pokonanie bariery elektrostatycznej i kontakt z komórkami gospodarza, szczególnie z *A. castellanii*.

W kolejnym etapie oddziaływania bakterii z komórkami eukariotycznymi decydującą rolę odgrywają specyficzne interakcje między ligandami bakterii a receptorami gospodarza. Bakterie *L. pneumophila* nie syntetyzują otoczka, ani też zewnątrzkomórkowych polisacharydów, dlatego LPS, który jest najbardziej eksponowanym do środowiska składnikiem okrywy komórkowej „zakotwicza” bakterie w błonie komórek eukariotycznych (Palusińska-Szys i in., 2019(b)). Grupy *O*-acetylowe rdzenia LPS oraz grupy *N*-metylowe związane z grupą 5-acetimidolową kwasu legionaminowego są również zaangażowane w interakcje z receptorami makrofagów linii THP-1, gdyż mutanty pozbawione tych grup znacznie słabiej ulegały adhezji do makrofagów. Brak grup *N*-metylowych kwasu legionaminowego był również przyczyną słabszego przylegania bakterii do komórek *A. castellanii*. Natomiast brak grup *O*-acetylowych rdzenia LPS wpływał na silniejszą adhezję do komórek ameb. Rozpoznanie *L. pneumophila* przez *A. castellanii* odbywa się za pośrednictwem domeny α 1-3D-mannobiozy receptora wiążącego mannozę zlokalizowanego na komórkach *A. castellanii* (Declerck i in., 2007) i przypuszczalnie brak grup *O*-acetylowych przyłączonych do ramnoz sprawia, że mannoza rdzenia LPS staje się bardziej dostępna dla receptora ameb. Wskazuje na to analiza porównawcza sygnałów na widmach NMR części polisacharydowej LPS wyizolowanego ze szczepu dzikiego Heysham-1 i mutanta T6-K13, która wykazała niewielką

różnicę w zakresie sygnałów mannozy. Testy adhezji szczepu dzikiego Heysham-1 i mutantu T6-K13 z komórkami ameb pokazują, że receptory powierzchniowe *A. castellanii* mogą oddziaływać z wewnętrznymi cukrami regionu rdzeniowego części polisacharydowej LPS i tym samym pośredniczyć w przyłączaniu *L. pneumophila* do tych komórek. Skład i struktura zarówno regionu rdzeniowego, jak i części O-swoistej LPS innych Gram-ujemnych bakterii np. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* również odgrywają ważną rolę w regulowaniu wychwytu bakterii przez ameby i makrofagi (Liu i Koudelka, 2023(a); Liu i Koudelka, 2023(b); March i in., 2013).

Badania zdolności adhezyjnych szczepów Heysham-1 i 130b oraz mutantów T6-K13 i 16D12 do komórek linii A549 i BEAS-2B, które są modelem komórek nabłonkowych, odpowiednio dolnych i górnych dróg oddechowych, wykazały silniejsze oddziaływanie szczepów z mutacją w syntezie LPS w porównaniu do szczepów dzikich. Przeciwnie, niż w oddziaływaniach tych szczepów z makrofagami, co wskazuje na odmienny mechanizm przyłączania się bakterii do różnych komórek eukariotycznych i że modyfikacje LPS promują interakcje *L. pneumophila* z makrofagami. Potwierdzają to również badania przeprowadzone przez Xiong i in. na liniach komórek fagocytujących i nefagocytujących, które wykazały, że internalizacja *L. pneumophila* przez makrofagi była łatwiejsza niż w przypadku nefagocytarnych linii komórkowych i że przewaga komórek fagocytarnych jako gospodarza dla *L. pneumophila* rozpoczyna się na etapie przylegania (Xiong i in., 2017).

Proces adhezji bakterii *L. pneumophila* do komórek gospodarza jest złożonym procesem, w którym poza LPS, który umożliwia przyłączenie bakterii zarówno do komórek pierwotniaków, jak i komórek ssaczy, uczestniczy cały szereg czynników adhezyjnych. Pojedyncze lub synergistyczne działanie tych czynników pozwala na związanie się *L. pneumophila* z powierzchnią komórek eukariotycznych, w tym z makrofagami alweolarnymi, prowadząc do kolonizacji układu oddechowego człowieka. W procesie przyłączania bakterii *L. pneumophila* do makrofagów można wyróżnić adhezję zależną od dopełniacza, której kluczowymi składnikami są białka C3 i C3bi oraz adhezję niezależną od dopełniacza (Payne i Horwitz, 1987). Składniki dopełniacza C3 i C3bi wiążą się z zlokalizowanym na powierzchni bakterii białkiem MOMP, a następnie łączą się z receptorem dopełniacza CR1 i CR3 makrofagów (Krinos i in., 1999). Białko MOMP może hamować fagocytozę i ułatwiać chemotaksję makrofagów RAW 264.7 (Yang i in., 2021). W procesie adhezji niezależnej od dopełniacza uczestniczą wici, pile i białka powierzchniowe, które oddziałują z makrofagami za pośrednictwem białka MIP, białka szoku cieplnego Hsp 60, pili typu IV oraz flageliny. Ponadto w procesie adhezji do makrofagów zaangażowane jest kolagenopodobne

białko (Lcl, *Collagen-like*) wiążące glukozyloaminoglikan (GAG, *Glycosaminoglycan*) (Vandersmissen i in., 2010; Abdel-Nour i in., 2019) i specyficzna dla *L. pneumophila* cyklaza adenylanowa - LadC (Newton i in., 2008) oraz białko zewnętrznej membrany - PilY1, które umożliwia również przyłączanie bakterii do komórek nabłonkowych (Hoppe i in., 2017). Adhezydami odpowiedzialnymi za przyłączenie *L. pneumophila* do komórek *A. castellanii* są: toksyna strukturalna – RtxA (Cirillo i in., 2002) i białko zewnętrznej membrany PilE_L wchodzące w skład pilusów typu IV (Stone i Abu Kwaik, 1998). Białka RtxA i PilE_L pośredniczą także w adhezji *L. pneumophila* do komórek nabłonkowych oraz monocytów (Cirillo i in., 2000; Stone i Abu Kwaik, 1998). Białko EnhC również odgrywa istotną rolę w procesie adhezji *L. pneumophila* do komórek *A. castellanii*, a także do komórek linii nabłonkowych i monocytów (Cirillo i in., 2000). W procesie adhezji *L. pneumophila* do komórek nabłonkowych płuc pośredniczą m.in.: receptory E-kadheryny i integryny β1 (Prashar i in., 2012) oraz białko LaiA - homolog integryny *Saccharomyces cerevisiae* (Chang i in., 2005). Niezbędne są dalsze badania w celu wyjaśnienia, czy jedną cząsteczkę adhezyjną *L. pneumophila* może zastąpić inną lub czy istnieje potrzeba wielu współdziałających, dobrze zsynchronizowanych w czasie i przestrzeni, interaktywnych zdarzeń między adhezywą a ligandem, w celu produktywnej kolonizacji komórek gospodarza.

Przyłączone do komórek gospodarza bakterie *L. pneumophila* zostają pobrane na drodze fagocytozy konwencjonalnej lub spiralnej przez makrofagi i pierwotniaki, a dzięki pokonaniu naturalnych mechanizmów obronnych tych komórek, bakterie tworzą bezpieczną do namnażania się wewnątrzkomórkową niszę. Mutant T6-K13 pozbawiony grup O-acetylowych ramnoz rdzenia LPS lepiej namnażał się w komórkach ameb i makrofagów w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1, co wskazuje, że obecność tych grup wpływa na zdolność *L. pneumophila* do wewnątrzkomórkowego namnażania się. Stopień acetylacji O-swoistego łańcucha LPS jest regulowany w zależności od fazy wzrostu bakterii *L. pneumophila*. Fernandez-Moreira wykazał, że bakterie w fazie replikacyjnej zwiększają stopień acetylacji O-swoistego łańcucha w celu podniesienia tolerancji na niesprzyjające warunki panujące w wakuolach zainfekowanej komórki gospodarza. W fazie transmisyjnej bakterie deacetylują i wydłużają LPS do form, które blokują fuzję fagosomu z lizosomem i dojrzewanie makrofagów (Fernandez-Moreira i in., 2006). Bardziej hydrofilny LPS *L. pneumophila* ułatwia bliskość przestrzenną bakterii w fagosomie (Richards i in., 2010). Brak grup O-acetylowych ramnoz rdzenia LPS w szczepie T6-K13 zwiększa polarność powierzchni bakterii i ich wzajemny kontakt w fagosomie, co wpływa na bardziej intensywne namnażanie się *L. pneumophila* w komórkach gospodarza, w porównaniu do szczepu dzikiego.

W komórkach nabłonkowych linii A549 po 24 godzinach od zakażenia mutant T6-K13 namnażał się bardziej efektywnie, zaś po 48 i 72 godzinach namnażał się mniej efektywnie w porównaniu do szczepu dzikiego. W komórkach nabłonkowych BEAS-2B mutant T6-K13 namnażał się słabiej w porównaniu do szczepu dzikiego. Mutant 16D12 namnażał się w komórkach linii A549 nie tak efektywnie jak szczep dziki. Ten sam mutant namnażał się lepiej w komórkach BEAS-2B niż szczep dziki 130b, wskazując na odmienny mechanizm namnażania się bakterii *L. pneumophila* w różnych komórkach gospodarza. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem makrofagów linii THP-1 i komórek nabłonkowych A549 nad rolą białka adhezyjnego PilY1 zlokalizowanego w zewnętrznej membranie *L. pneumophila*, wykazały różny efekt w zależności od komórek gospodarza. Brak syntezy białka PilY1 spowodował drastyczny spadek inwazji *L. pneumophila* do komórek nabłonkowych, ale nie wpłynął na zdolność bakterii do namnażania się wewnątrz tych komórek. Natomiast brak białka PilY1 znacznie osłabił zdolność *L. pneumophila* do namnażania się w makrofagach (Hoppe i in., 2017). Różnice w charakterystyce błony, dynamice białek cytoszkieletu oraz integralności strukturalnej komórki między makrofagami, a komórkami niefagocytującymi mogą decydować o oddziaływaniu i efektywności namnażania się *L. pneumophila* w różnych komórkach gospodarza (Xiong i in., 2017; Prashar i in., 2018).

Grupy *N*-metylowe przypuszczalnie promują wewnątrzkomórkową replikację szczepu 130b, gdyż mutant 16D12 słabiej namnażał się w komórkach ameb i makrofagów. Choć badania przeprowadzone przez Kooistra na szczepie dzikim *L. pneumophila* RC1 oraz mutancie 5215 pozbawionym grup *N*-metylowych reszt kwasu legionaminowego wykluczyły, że te grupy mogą być czynnikiem zjadliwości *L. pneumophila* szczepu RC1 (Kooistra i in., 2002). Grupy *N*-metylowe nadając ładunek reszcie kwasu legionaminowego wpływają na wzajemne przyciąganie i odpychanie między kwasem legionaminowym, a innymi składnikami osłony komórkowej zwłaszcza lipidami, których acylowe łańcuchy ulegają hydrofobowym interakcjom z lipidem A LPS, co wpływa na stabilizację konformacji makrocząsteček i błony zewnętrznej jako całości. Ścisła równowaga między fosfolipidami a LPS jest niezbędna do zachowania prawidłowej asymetrii architektury ściany komórkowej *L. pneumophila*, integralności komórki bakteryjnej oraz jej adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Zaburzenia syntezy LPS wpłynęły na różnice ilościowe w profilu lipidów *L. pneumophila*. Szczep T6-K13 pozbawiony grup *O*-acetylowych przyłączonych do ramnozdzenia LPS wykazywał dwukrotny wzrost zawartości PE z nasyconymi kwasami tłuszczowymi: PE(14:0_14:0) i PE(15:0_14:0) oraz PE z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi: PE(16:1_16:1) i PE(17:1/17:1) w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1. Ponadto,

mutant T6-K13 syntetyzował zaledwie 0,12% dMePE(17:1_18:0), której zawartość w szczepie Heysham-1 wynosiła 20%. Mutant charakteryzował się także dwukrotnie wyższą zawartością Cer(t34:0), Cer(t34:1) i Cer(t38:0) w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1. Różnice w zawartości lipidów wystąpiły również między dzikim szczepem 130b oraz mutantem 16D12, który syntetyzował 3-krotnie mniej PC(17:1_14:0), PC(17:1/15:0) oraz dwukrotnie więcej PC(16:1_16:0). Mutant 16D12 charakteryzował się wysoką zawartością dMePE(20:0_16:1), która w szczepie dzikim była ponad 7-krotnie niższa. Różnice w zawartości lipidów w tych szczepach wystąpiły również w ceramidach. Mutant 16D12 charakteryzował się wyższą zawartością Cer(t35:0), Cer(d37:1) i Cer(t34:1) w porównaniu do szczepu dzikiego.

Obecność ceramidów jest unikalną wśród mikroorganizmów cechą błon *L. pneumophila*. Ceramidy należą do sfingolipidów, których szkieletem jest sfingozyna - długołańcuchowy nienasycony alkohol. Cząsteczka sfingozyny, z dołączonym do grupy aminowej kwasem tłuszczowym, tworzy ceramid.

Sfingolipidy występują głównie w warstwie zewnętrznej błon komórek eukariotycznych i odgrywają kluczową rolę w tworzeniu tratw lipidowych, które służą czasowej i przestrzennej organizacji komórkowej maszyneryi sygnalizacyjnej, a także decydują o fizykochemicznych właściwościach komórek (Nelson i Cox, 2017). Sfingolipidy występują głównie w komórkach bakteryjnych, których cykl życiowy jest ściśle związany z eukariotycznym gospodarzem. Na podstawie analizy homologii genów zaangażowanych w syntezę ceramidów, genu *spt* – kodującego palmitoilotransferazę serynową, *bcerS* – kodującego bakteryjną syntazę ceramidową oraz *cerR* – kodującego reduktazę ceramidową wykazano, że zaledwie 5% bakterii należących do 17 taksonomicznych klas produkuje ceramidy (Stankeviciute i in., 2022). Większość bakterii syntetyzujących sfingolipidy należy do typu *Bacteroidetes* (np. z rodzajów *Flectobacillus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*) i typu Chlorobi (np. z rodzaju *Chlorobium*). Bakterie syntetyzujące sfingolipidy reprezentują także typ α -Proteobacteria (*Acetobacter spp.*, *Sphingomonas spp.*, *Novosphingobium spp.*) i Δ -Proteobacteria (*Myxococcus spp.*, *Bdellovibrio spp.*) (Heaver i in., 2018). Wśród bakterii należących do rodzaju *Legionella* ceramidy, utlenowane ceramidy oraz heksozyloceramidy zidentyfikowano w lipidach *L. gormanii* (Chmiel i in., 2022). Ceramidy *L. gormanii* i *L. pneumophila* zawierają głównie nasycone lub jednonienasycone kwasy tłuszczowe, podobnie do tych występujących w komórkach eukariotycznych, których łańcuchy acylowe mają długość od 14 do 26 lub więcej atomów węgla. Mutant T6-K13 zawierał więcej ceramidów z kwasami tłuszczowymi o krótszych łańcuchach acylowych Cer(t34:0), Cer(d37:1)

oraz Cer(t38:0) w porównaniu do szczepu dzikiego. Podobnie mutant 16D12 zawierał więcej ceramidów z kwasami tłuszczowymi o krótszych łańcuchach Cer(t35:0), Cer(d37:1) w porównaniu do szczepu dzikiego. U Gram-ujemnych bakterii pozbawionych LPS, takich jak np. *Sorangium cellulosum* So ce56 sfingolipidy, lipidy zawierające ornitynę oraz lipidy eterowe funkcjonalnie zastępują ten składnik błony zewnętrznej (Keck i in., 2011). *Acetobacter malorum* S24, który syntetyzuje zarówno LPS, jak i sfingolipidy w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, takie jak obniżenie pH lub wzrost temperatury, indukuje aktywność enzymów zaangażowanych w syntezę sfingolipidów i zwiększoną produkcję ceramidów lub sfingolipidów (Ogawa i in., 2010). Zdolność do syntezy anionowego sfingolipidu, fosfoglicerynianu ceramidu w komórkach *Caulobacter crescentus* umożliwia przeżycie bakteriom, które pozbawione są LPS (Zik i in., 2022).

Ceramidy mogą być syntetyzowane *de novo* z seryny i palmitynianu, bądź powstawać wskutek rozpadu sfingomielin z udziałem sfingomielinaz: SMase Cs, (SMPD1) i SMase Ds. Sfingomielinaza SMPD1 hydrolizuje wiązanie estrowe między ceramidem, a fosforylocholiną. Sfingomielinaza SMase Ds hydrolizuje wiązanie fosfodiestrowe między cer-1-fosforanem i choliną (Flores-Díaz i in., 2016). Spośród arsenału białek efektorowych kodowanych przez geny eukariotyczne pozyskane przez *L. pneumophila* w wyniku ko-ewolucji z pierwotniakami, co najmniej trzy białka: sfingomielinaza, kinaza sfingozynowa i liaza sfingozyno-1-fosforanowa wykazują aktywność podobną do enzymów eukariotycznych działających w szlaku degradacji sfingolipidów (Rolando i Buchrieser, 2019). Aktywność liazy sfingozyno-1-fosforanowej wytwarzanej przez *L. pneumophila* hamuje wzrost stężenia sfingozyny w makrofagach zakażonych bakteriami, prowadząc do zahamowania procesu autofagii (Rolando i in., 2016). Bakteryjne patogeny wykorzystują aktywność sfingomielinazy do wzrostu poziomu ceramidów w błonie, co prowadzi do tworzenia bogatych w ten lipid domen, które wychwytyują cząsteczki receptorów oraz cząsteczki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, w której pośredniczy TLR4. W ten sposób błonowe ceramidy odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu sygnału i modulacji metabolizmu komórkowego. Reorganizacja cząsteczek w komórce wywołana działaniem ceramidów, pozwala bakteriom regulować ich internalizację, uwalnianie cytokin oraz odpowiedź zapalną, a także hamować śmierć komórkową (Gulbins i in., 2004). Sfingomielinaza jest aktywowana przez wydzielane czynniki wirulencji, toksyny oraz LPS (Kornhuber i in., 2015). Obniżenie poziomu glikozyloceramidów w domenach lipidowych zmniejsza indukowaną LPS odpowiedź zapalną, zarówno mysich, jak i ludzkich makrofagów (Mobarak i in., 2018).

Kluczowym elementem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie płuc wywołane przez bakterie *L. pneumophila* jest cytokina TNF- α , wytwarzana przez zainfekowane i aktywowane makrofagi alweolarne, które zabijają bakterie poprzez rekrutację lizosomów i zakwaszanie wakuoli zawierających *L. pneumophila* (Ziltener i in., 2016). Biologiczna aktywność TNF- α uwarunkowana jest wiązaniem się z receptorami TNFR1 i TNFR2 zlokalizowanymi na powierzchni makrofagów, które następnie aktywują jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B), który po translokacji do jądra komórkowego kontroluje transkrypcję genów kodujących TNF- α (Webster i in., 2020).

Komórki dzikich szczepów Heysham-1 i 130b indukowały niski poziom TNF- α , przy czym szczep 130b w dawce 20 MOI był dwukrotnie słabszym induktorem tej cytokiny. Wyższa dawka bakterii (100 MOI) zarówno szczepu Heysham-1, jak i 130b powodowała spadek produkcji TNF- α . Zdolność do indukcji TNF- α przez różne szczepy *L. pneumophila* była bardzo zróżnicowana. Badania przeprowadzone na dwóch dominujących wśród izolatów klinicznych szczepach *L. pneumophila* o typach sekwencji ST1 i ST47 wykazały, że szczep ST1 powodował silniejszą aktywację szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B, a następnie dwukrotnie wyższy poziom TNF- α w makrofagach linii THP-1 w porównaniu do szczepu ST47. Taka zróżnicowana odpowiedź zapalna może być związana z różną podatnością gospodarza na szczepy bakterii *L. pneumophila* (Guillemot i in. 2022).

Komórki mutanta T6-K13 w dawce 20 MOI indukowały niższy poziom TNF- α w porównaniu do szczepu dzikiego. Natomiast mutant 16D12 w dawce 20 MOI indukował dwukrotnie wyższy poziom TNF- α w porównaniu do szczepu dzikiego 130b. Komórki mutanta T6-K13 w dawce 20 MOI nie indukowały mierzalnego poziomu IL-6, a w dawce 100 MOI poziom produkowanej cytokiny był zbliżony do próby kontrolnej. Mutant 16D12 w dawce 20 MOI był lepszym induktorem IL-6 niż szczep dziki 130b. Badania te wskazują, że grupy *O*-acetylowe i *N*-metylowe występujące w części polisacharydowej LPS komórek *L. pneumophila* mogą pośrednio wpływać na indukcję TNF- α i IL-6.

LPS *L. pneumophila* pomimo wysokiej reaktywności w teście żelowania amebocytów skrzypłocza ponad 1000 razy słabiej indukował TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 w komórkach Mono Mac6 w porównaniu do LPS wyizolowanego z *Salmonella enterica* serowar Minnesota (Neumeister i in., 1998). Badania własne nad indukcją IL-6 i TNF- α w makrofagach linii THP-1 stymulowanych LPS wyizolowanym ze szczepu Heysham-1 i 130b potwierdziły słabą zdolność do produkcji tych prozapalnych cytokin. Poziom IL-6 produkowanej przez makrofagi linii THP-1 pod wpływem LPS wyizolowanego ze wszystkich badanych szcze-

pów był ponad 10 krotnie niższy niż poziom TNF- α , co pokazuje istotny udział TNF- α w zakażeniach wywołanych badanymi szczepami legionell. Brak istotnych statystycznie różnic między szczepami dzikimi i mutantami wskazuje, że grupy *O*-acetylowe rdzenia i *N*-metylowe kwasu legionaminowego LPS bezpośrednio nie wpływają na poziom indukowanej IL-6.

Niski poziom wytwarzanych cytokin spowodowany jest słabą zdolnością wiązania się LPS *L. pneumophila* z białkiem wiążącym lipopolisacharyd (LBP, *Lipopolysaccharide Binding Protein*), a także z receptorem CD14 związanym z błoną makrofagów oraz jego rozpuszczalną formą (sCD14) (Neumeister i in., 1998). Słaba zdolność do wiązania się z receptorami wynika z obecności w lipidzie A *L. pneumophila* długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [28:0(27-okso) i 27:0-diowy], o długości 2-krotnie większej niż kwasy tłuszczowe przyłączone do szkieletu cukrowego lipidu A, wysoce toksycznych LPS bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (Zähringer i in., 1995). Lipid A *L. pneumophila* rozpoznawany jest przez TLR4 zlokalizowany zarówno na powierzchni makrofagów człowieka, jak i na wakuolach utworzonych wewnątrz makrofagów, w których namnażają się bakterie (Grigorieva i Cianciotto, 2021).

LPS wyizolowany ze szczepu 130b silniej indukował TNF- α w porównaniu do LPS wyizolowanego ze szczepu Heysham-1, zarówno w stężeniu 500 i 1000 ng/ml. LPS wyizolowany z mutantu T6-K13 w stężeniu 500 ng/ml był dwukrotnie silniejszym induktorem TNF- α , w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1. Wyższe stężenie 1000 ng/ml LPS mutantu T6-K13 tylko w nieznacznym stopniu zwiększało produkcję tej cytokiny. Badania te wskazują, że nie tylko lipid A, ale również część polisacharydowa LPS *L. pneumophila* szczepu Heysham-1 wpływa na indukcję TNF- α , a występowanie grup *O*-acetylowych ramnoz rdzenia może być jednym z mechanizmów ucieczki tych bakterii spod kontroli układu immunologicznego człowieka. LPS wyizolowany z mutantu 16D12 indukował TNF- α na bardzo niskim, zbliżonym do kontroli poziomie, co również pokazuje, że modyfikacje regionu polisacharydowego LPS *L. pneumophila* mogą wpływać na indukcję prozapalnych cytokin. Pozostaje do wyjaśnienia w jaki sposób region polisacharydowy LPS i za pośrednictwem jakich receptorów uruchamia odpowiedź zapalną. Wiadomo, że ten region LPS nie angażuje receptora TLR4 w odpowiedź, gdyż cztery różniące się budową antygeny O serogrupy *L. pneumophila*, wywołały podobną, zależną od TLR4 indukcję cytokin (Shevchuk i in., 2011; Grigorieva i Cianciotto, 2021). Chociaż łańcuch polisacharydu O wydaje się zbędny do aktywacji i sygnalizacji TLR4, cukry rdzenia oligosacharydu, w tym Kdo odgry-

wają znaczącą rolę w aktywacji TLR4. Ponadto ważnym parametrem decydującym o skuteczności oddziaływania LPS z receptorem TLR4/MD-2 jest tendencja ligandów do tworzenia w roztworze agregatów. Obecność różnych grup części polisacharydowej, jak również długość i rozmieszczenie kwasów tłuszczowych lipidu A, może wpływać na stabilność agregatów LPS i właściwe dopasowanie do receptorów (Cochet i Peri, 2017).

Kompletny antygen O *E. coli* był niezbędny do pełnej aktywacji monocytów, w tym fosforylacji kinaz aktywowanych mitogenami MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), zwiększonej syntezy mRNA dla TNF- α i IL-10 oraz zwiększonego wydzielania obu tych cytokin, w sposób zależny od receptora CD14. Częściowa utrata antygeny O powodowała zmniejszoną aktywację każdego z tych szlaków komórkowych, w porównaniu z komórkami stymulowanymi LPS wyizolowanym ze szczepu dzikiego *E. coli* (Plevin i in., 2016).

Zbliżenie się, przyłączenie i inwazja komórek gospodarza (makrofagów i pierwotniaków) należą do krytycznych etapów cyklu infekcji komórkowej *L. pneumophila*. Zaburzenie każdego z tych etapów prowadzi do spadku liczby, żywych, zdolnych do wewnątrzkomórkowej replikacji bakterii. Jednym z czynników, który odgrywa decydujące znaczenie na każdym etapie cyklu życiowego *L. pneumophila* jest lipopolisacharyd. Poznanie złożonych mechanizmów modulacji struktury, funkcji i sposobu oddziaływania LPS *L. pneumophila* z komórkami gospodarza ma istotne znaczenie w projektowaniu nowych leków i ocenie nowych strategii terapeutycznych w ochronie przed infekcjami wywołanymi przez te bakterie.

VI PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Bakterie *L. pneumophila* są cennym modelowym organizmem do badań nad mechanizmami interakcji między wewnątrzkomórkowym patogenem, a jego gospodarzem oraz wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie. Bakterie po przedostaniu się do organizmu człowieka za pośrednictwem skontaminowanego aerozolu, namnażają się w makrofagach alweolarnych, prowadząc do rozwoju zapalenia płuc. Podczas fagocytozy indukowanej przez *L. pneumophila*, bakterie są kluczowym i aktywnym partnerem złożonego oddziaływania pomiędzy atakującym drobnoustrojem i komórką gospodarza. Powodzenie infekcji zależy od skutecznego procesu przyłączenia się bakterii do eukariotycznych komórek, w który zaangażowane są struktury powierzchniowe. LPS jest najbardziej eksponowanym do środowiska składnikiem ściany komórkowej bakterii, który nie tylko umożliwia przyłączenie do komórek gospodarza, ale również jest zaangażowany na każdym etapie cyklu rozwojowego *L. pneumophila*.

Zastosowanie do badań mutantów defektywnych w syntezie części polisacharydowej LPS *L. pneumophila* sg 1 pozwoliło na skorelowanie: **1/** poszczególnych mutacji w genach specyficznych dla serogrupy 1 z modyfikacją struktury LPS, **2/** specyficznej modyfikacji LPS ze zmianami właściwości biofizycznych interakcji między bakteriami, a gospodarzem, **3/** specyficznej modyfikacji LPS ze zmianą odpowiedzi immunologicznej makrofagów. Unikalna dla serogrupy 1 struktura lipopolisacharydu *L. pneumophila*, w tym obecność *N* i *O* acetylowych grup w części polisacharydowej LPS wpływa na fizyko-chemiczne właściwości powierzchni bakterii i moduluje oddziaływanie z komórkami *A. castellanii* i makrofagami linii THP-1 oraz komórkami nabłonkowymi linii A549 i BEAS-2B. Badania nad indukcją prozapalnych cytokin wykazały, że nie tylko struktura lipidu A, ale również modyfikacje części polisacharydowej LPS *L. pneumophila* sg 1 mogą wpływać na indukcję TNF- α .

Wnioski

1. Analiza widm NMR części polisacharydowej LPS *L. pneumophila* sg 1 sugeruje, że mutacje w genach ORF 7 i ORF 8 zaangażowanych w biosyntezę LPS, skutkowały utratą odpowiednio: *O*-acetylowych grup przyłączonych do ramnoz rdzenia oligosacharydowego oraz utratą grup *N*-metylowych acetimidoilowych podstawników kwasu legionaminowego.
2. Bakterie pozbawione grup *O*-acetylowych ramnoz rdzenia i grup *N*-metylowych przyłączonych do podstawników acetimidoilowych kwasu legionaminowego syntetyzują lipidy obojętne, sfingolipidy i ceramidy o zmienionym profilu w stosunku do szczepów dzikich.
3. Polarność powierzchni bakterii *L. pneumophila* sg 1 wpływa na oddziaływanie tych bakterii z komórkami *A. castellanii* i makrofagami linii THP-1.
4. Grupy *O* acetylowe przyłączone do ramnoz rdzenia i grupy *N*-metylowe przyłączone do podstawników acetimidoilowych kwasu legionaminowego modulują zdolność do adhezji, inwazji i wewnątrzkomórkowego namnażania się bakterii w komórkach *A. castellanii* i w makrofagach linii THP-1 oraz w komórkach nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B.
5. Poziom IL-6 produkowanej przez makrofagi linii THP-1 pod wpływem LPS wyizolowanego ze wszystkich badanych szczepów *L. pneumophila* sg 1 był znacznie niższy niż poziom TNF- α .
6. Obecność grup *O*-acetylowych przyłączonych do ramnoz rdzenia LPS *L. pneumophila* sg 1 może wpływać na spadek produkcji TNF- α przez makrofagi linii THP-1.

VII BIBLIOGRAFIA

1. **Abdel-Nour M.**, Su H., Duncan C., Li S., Raju D., Shamoun F., Valton M., Ginevra C., Jarraud S., Guyard C., Kerman K., Terebiznik M.R. **2019**. Polymorphisms of a collagen-like adhesin contributes to *Legionella pneumophila* adhesion, biofilm formation capacity and clinical prevalence. *Front. Microbiol.* 10, 604.
2. **Abu-Zant A.**, Jones S., Asare R., Suttles J., Price C., Graham J., Kwaik Y.A. **2007**. Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 9, 246-264.
3. **Aktas M.**, Wessel M., Hacker S., Klüsener S., Gleichenhagen J., Narberhaus F. **2010**. Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 888–894.
4. **Albers U.**, Tiaden A., Spirig T., Al Alam D., Goyert S.M., Gangloff S.C., Hilbi H. **2007**. Expression of *Legionella pneumophila* paralogous lipid A biosynthesis genes under different growth conditions. *Microbiology.* 11, 3817-3829.
5. **Allombert J.**, Fuche F., Michard C., Doublet P. **2013**. Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a *Legionella pneumophila* replicative niche in phagocytic cells. *Microbes Infect.* 15, 981-988.
6. **Amano K.**, Williams J.C. **1983**. Peptidoglycan of *Legionella pneumophila*: apparent resistance to lysozyme hydrolysis correlates with a high degree of peptide cross-linking. *J. Bacteriol.* 1, 520-526.
7. **Andereya S.**, Schneider U., Siebert C.H., Wirtz D.C. **2004**. Reactive knee and ankle joint arthritis: abnormal manifestation of *Legionella pneumophila*. *Rheumatol. Int.* 3, 182-184.
8. **Anyfantakis D.**, Krietsepi V., Damianaki A., Symvoulakis E.K., Gogou A., Paspaparakis E., Kastanakis S. **2015**. *Legionella pneumophila* infection masquerading as acute cholecystitis. *Maedica (Bucur).* 3, 264-267.
9. **Apicella M.A.**, Griffiss J.M., Schneider H. **1994**. Isolation and characterization of lipopolysaccharides, lipooligosaccharides, and lipid A. *Meth. Enzymol.* 235, 242–252.
10. **Aronel V.**, Benning C., Somerville C. **1993**. Isolation and functional expression in *Escherichia coli* of a gene encoding phosphatidyl-ethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* 268, 16002–16008.

11. **Band R.N. 1959.** Nutritional and related biological studies on the free-living soil amoeba, *Hartmannella rhyodes*. *J. Gen. Microbiol.* 21, 80-95.
12. **Barskey A., Lackraj D., Tripathi P.S., Cooley L., Lee S., Smith J., Edens Ch.,** Division of bacterial diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases. **2020.** CDC Centers for Disease Control and Prevention. Legionnaires' disease surveillance summary report, United States, 2016–2017. 1-50.
13. **Barskey A.E., Derado G., Edens C. 2022.** Rising incidence of Legionnaires' disease and associated epidemiologic patterns, United States, 1992-2018. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 527–538.
14. **Beauté J. 2017.** The European Legionnaires' Disease Surveillance Network Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Euro Surveill.* 27, 30566.
15. **Belyi Y., Stahl M., Sovkova I., Kaden P., Luy B., Aktories K. 2009.** Region of elongation factor 1A1 involved in substrate recognition by *Legionella pneumophila* glucosyltransferase LGT1-identification of LGT1 as a retaining glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 284, 20167-20174.
16. **Bertani B., Ruiz N. 2018.** Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *Ecosal plus.* 1, 1-33.
17. **Beynon L.M., Richards J.C., Perry M.B. 1994.** The structure of the lipopolysaccharide O-antigen from *Yersinia ruckeri* serotype 01. *Carbohydr. Res.* 2, 303-317.
18. **Bligh E G., Dyer W.J. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
19. **Boamah D.K., Zhou G., Ensminger A.W., O'Connor T.J. 2017.** From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of *Legionella*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 477.
20. **Borges V., Nunes A., Sampaio D.A., Vieira L., Machado J., Simões M.J., Gonçalves P., Gomes J.P. 2016.** *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Sci. Rep.* 6, 26261.
21. **Caroff M., Novikov A. 2019.** LPS structure, function, and heterogeneity. In: Endotoxin detection and control in pharma, limulus, and mammalian systems. Springer Nature, Berlin/Heidelberg, Germany, 53–93.
22. **Carter C.J., Corley E.M., Canepa H., Schmalzle S.A. 2022.** Legionnaires' disease presenting with exanthem; Case and review of previously published cases. *IDCases.* 27, e01376.

23. **Carty S.M.**, Sreekumar K.R., Raetz C.R.H. **1999**. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction at 12°C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* 274, 9677–9685.
24. **Cassell K.**, Gacek P., Rabatsky-Ehr T., Petit S., Cartter M., Weinberger D.M. **2019**. Estimating the true burden of Legionnaires' disease. *Am. J. Epidemiol.* 188, 1686–1694.
25. **Castor M.L.**, Wagstrom E.A., Danila R.N., Smith K.E., Naimi T.S., Besser J.M., Peacock K.A., Juni B.A., Hunt J.M., Bartkus J.M., Kirkhorn S.R., Lynfield R. **2005**. An outbreak of Pontiac fever with respiratory distress among workers performing high-pressure cleaning at a sugar-beet processing plant. *J. Infect. Dis.* 191, 1530–1537.
26. **Cazalet C.**, Jarraud S., Ghavi-Helm Y., Kunst F., Glaser P., Etienne J., Buchrieser C. **2008**. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.* 3, 431-441.
27. **Chambers S.T.**, Slow S., Scott-Thomas A., Murdoch D.R. **2021**. Legionellosis caused by non-*Legionella pneumophila* species, with a focus on *Legionella long-beachae*. *Microorganisms.* 9, 291.
28. **Chang B.**, Kura F., Amemura-Maekawa J., Koizumi N., Watanabe H. **2005**. Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 7, 4272-4280.
29. **Chauhan D.**, Shames S.R. **2021**. Pathogenicity and virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. *Virulence.* 1, 1122-1144.
30. **Chiaraviglio L.**, Brown D.A., Kirby J.E. **2008**. Infection of cultured human endothelial cells by *Legionella pneumophila*. *PLoS One.* 3, e2012.
31. **Chidiac C.**, Che D., Pires-Cronenberger S., Jarraud S., Campèse C., Bissery A., Weinbreck P., Brun-Buisson C., Sollet J.P., Ecochard R., Desenclos J.C., Etienne J., Vanhems P., French Legionnaires' Disease Study Group. **2012**. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *Eur. J. Respir.* 39, 963–970.
32. **Chitasombat M.N.**, Ratchatanawin N., Visessiri Y. **2018**. Disseminated extrapulmonary *Legionella pneumophila* infection presenting with panniculitis: case report and literature review. *BMC Infect. Dis.* 18, 467.

33. **Chmiel E.**, Galuska C.E., Koper P., Kowalczyk B., Urbanik-Sypniewska T., Palusińska-Szyszk M., Fuchs B. **2022**. Unusual lipid components of *Legionella gormanii* membranes. *Metabolites*. 5, 418.
34. **Ciesielski C.A.**, Blaser M.J., Wang W.L. **1986**. Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun.* 2, 397-404.
35. **Cirillo S.L.G.**, Lum J., Cirillo J.D. **2000**. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology*. Pt 6, 1345-1359.
36. **Cirillo S.L.G.**, Yan L., Littman M., Samrakandi M.M., Cirillo J.D. **2002**. Role of the *Legionella pneumophila rtxA* gene in amoebae. *Microbiology*. Pt 6, 1667-1677.
37. **Clementz T.**, Raetz C.R. **1991**. A gene coding for 3-deoxy-D-mannoctulosonic-acid transferase in *Escherichia coli*. Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.* 266, 9687–9696.
38. **Clementz T.**, Zhou Z., Raetz C.R. **1997**. Function of the *Escherichia coli msbB* gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of lipid A. Acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB. *J. Biol. Chem.* 16, 10353–10360.
39. **Cochet F.**, Peri F. **2017**. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) signalling. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2318.
40. **Coleman J.**, Raetz C.R. **1988**. First committed step of lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*: sequence of the *lpxA* gene. *J. Bacteriol.* 170, 1268–1274.
41. **Collins R.F.**, Kargas V., Clarke B.R., Siebert C.A., Clare D.K., Bond P.J., Whitfield C., Ford R.C. **2017**. Full-length, oligomeric structure of Wzz determined by cryo-electron microscopy reveals insights into membrane-bound states. *Structure*. 5, 806.
42. **Conover G.M.**, Martínez-Morales F., Heidtman M.I., Luo Z.Q., Tang M., Chen C., Geiger O., Isberg R.R. **2008**. Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cell. Microbiol.* 10, 514–528.
43. **Copenhaver A.M.**, Casson C.N., Nguyen H.T., Fung T.C., Duda M.M., Roy C.R., Shin S. **2014**. Alveolar macrophages and neutrophils are the primary reservoirs for *Legionella pneumophila* and mediate cytosolic surveillance of type IV secretion. *Infect. Immun.* 82, 4325–4336.
44. **Correia A.M.**, Ferreira J.S., Borges V., Nunes A., Gomes B., Capucho R., Gonçalves J., Antunes D.M., Almeida S., Mendes A., Guerreiro M., Sampaio D.A.,

- Vieira L., Machado J., Simões M.J., Gonçalves P., Gomes J.P. **2016**. Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease. *N. Engl. J. Med.* 374, 497–498.
- 45. Crowell D.N.**, Anderson M.S., Raetz C.R. **1986**. Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168, 152–159.
- 46. Cunha B.A.** **1998**. Clinical features of legionnaires' disease. *Semin. Respir. Infect.* 13, 13–27.
- 47. Dalal N.**, Athwal P.S.S., Tharu B., Shah P., Shah L. **2020**. Legionnaires disease presenting as diarrhea: A case report. *Cureus.* 12, e10593.
- 48. de Rudder K.E.**, López-Lara I.M., Geiger O. **2000**. Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: Phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol. Microbiol.* 37, 763–772.
- 49. de Rudder K.E.**, Sohlenkamp C., Geiger O. **1999**. Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 20011–20016.
- 50. Declerck P.**, Behets J., De Keersmaecker B., Ollevier F. **2007**. Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *J. Appl. Microbiol.* 6, 2697-2703.
- 51. Di Lorenzo F.**, Duda K.A., Lanzetta R., Silipo A., De Castro C., Molinaro A. **2021**. A journey from structure to function of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Rev.* 20, 15767-15821.
- 52. Doerrler W.T.**, Gibbons H.S., Raetz C.R. **2004**. MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 45102–45109.
- 53. Doleans A.**, Aurell H., Reyrolle M., Lina G., Freney J., Vandenesch F., Etienne J., Jarraud S. **2004**. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* 1, 458-460.
- 54. Drożanski W.**, Galanos C., Schlecht S., Lüderitz O. **1986**. *In vitro* deacylation of lipopolysaccharide of *Salmonella minnesota* by *Acanthamoeba castellanii* enzymes. *Eur. J. Biochem.* 2, 433-437.
- 55. Dubois M.**, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. **1956**. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- 56. Edebrink P.**, Jansson P.E., Bøgwald J., Hoffman J. **1996**. Structural studies of the *Vibrio salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 2, 225-245.

57. **Escoll P.**, Rolando M., Gomez-Valero L., Buchrieser C. **2013**. From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 376, 1-34.
58. **European Centre for Disease Prevention and Control**. Legionnaires' disease. **2021**. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm: ECDC.
59. **Euzéby J.P.**, 2024. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
60. **Farhat C.**, Mentasti M., Jacobs E., Fry N.K., Lück C. **2011**. The *N*-Acylneuraminate cytidyltransferase gene, *neuA*, is heterogenous in *Legionella pneumophila* strains but can be used as a marker for epidemiological typing in the consensus sequence-based typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* 12, 4052-4058.
61. **Faulkner G.**, Garduño R.A. **2022**. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 24, 7025-7041.
62. **Feldman M.F.**, Marolda C.L., Monteiro M.A., Perry M.B., Parodi A.J., Valvano M.A. **1999**. The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O-antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat. *J. Biol. Chem.* 49, 35129–35138.
63. **Fernandez-Moreira E.**, Helbig J.H., Swanson M.S. **2006**. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect. Immun.* 74, 3285–3295.
64. **Finnerty W.R.**, Makula R.A., Feeley J.C. **1979**. Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium. *Ann. Intern. Med.* 90, 631–634.
65. **Flores-Díaz M.**, Monturiol-Gross L., Naylor C., Alape-Girón A., Flieger A. **2016**. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 3, 597-628.
66. **Galanos C.**, Lüderitz O. **1975**. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur. J. Biochem.* 54, 603-610.
67. **Garrett T.A.**, Kadrmaz J.L., Raetz C.R.H. **1997**. Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid a 4'-kinase – Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J. Biol. Chem.* 272, 21855–21864.
68. **Garrison L.E.**, Kunz J.M., Cooley L.A., Moore M.R., Lucas C., Schrag S., Sarisky J., Whitney C.G. **2016**. Vital signs: deficiencies in environmental control identified in outbreaks of Legionnaires' disease - North America, 2000–2014. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 576–584.

69. **Glaze P.A.**, Watson D.C., Young N.M., Tanner M.E. **2008**. Biosynthesis of CMP-N,N'-diacetyllegionaminic acid from UDP-N,N'-diacetylbacillosamine in *Legionella pneumophila*. *Biochemistry*. 10, 3272–3282.
70. **Gosselin F.**, Duval J.F., Simonet J., Ginevra C., Gaboriaud F., Jarraud S., Mathieu L. **2011**. Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of *Legionella pneumophila* sg 1: an issue to explain infection potential? *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 82, 283–290.
71. **Gómez J.**, Cuesta F., Zamorano C., García Lax F. **1992**. Pleural empyema in *Legionella pneumophila* nosocomial pneumonia in a patient with systemic lupus erythematosus. *Med. Clin.* 99, 358–359.
72. **Graham F.F.**, Hales S., White P.S., Baker M.G. **2020**. Review global seroprevalence of legionellosis - a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 1, 7337.
73. **Greenfield L.K.**, Whitfield C. **2012**. Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter dependent pathways. *Carbohydr. Res.* 356, 12–24.
74. **Grigoryeva L.S.**, Cianciotto N.P. **2021**. Human macrophages utilize a wide range of pathogen recognition receptors to recognize *Legionella pneumophila*, including Toll-Like Receptor 4 engaging *Legionella* lipopolysaccharide and the Toll-like Receptor 3 nucleic-acid sensor. *PLoS Pathog.* 7, e1009781.
75. **Guillemot J.**, Ginevra Ch., Allam C., Kay E., Gilbert Ch., Doublet P., Jarraud S., Chapalain A. **2022**. TNF- α response in macrophages depends on clinical *Legionella pneumophila* isolates genotypes. *Virulence*. 1, 160-173.
76. **Gulbins E.**, Dreschers S., Wilker B., Grassmé H. **2004**. Ceramide, membrane rafts and infections. *J. Mol. Med.* 6, 357-363.
77. **Guy S.D.**, Worth L.J., Thursky K.A., Francis P.A., Slavin M.A. **2011**. *Legionella pneumophila* lung abscess associated with immune suppression. *Intern. Med. J.* 41, 715–721.
78. **Hacker S.**, Sohlenkamp C., Aktas M., Geiger O., Narberhaus F. **2008**. Multiple phospholipid N-methyltransferases with distinct substrate specificities are encoded in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 190, 571–580.
79. **Hanada T.**, Kashima Y., Kosugi A., Koizumi Y., Yanagida F., Udaka S. **2001**. A gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Acetobacter aceti* and some properties of its disruptant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2741–2748.

- 80. Haseley S.R.,** Wilkinson S.G. **1997.** Structural studies of the putative O-specific polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* O24 containing 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxy-L-glycero-D-galacto-nonulosonic acid. *Eur. J. Biochem.* 2, 617-623.
- 81. Hawn T.R.,** Verbon A., Janer M., Zhao L.P., Beutler B., Aderem A. **2005.** Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 7, 2487–2489.
- 82. Haydock S.F.,** Dowson J.A., Dhillon N., Roberts G.A., Cortes J., Leadlay P.F. **1991.** Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Mol. Genet. Genom.* 230, 120–128.
- 83. Heaver S.L.,** Johnson E.L., Ley R.E. **2018.** Sphingolipids in host–microbial interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 43, 92-99.
- 84. Heidtman M.,** Chen E.J., Moy M.Y., Isberg R.R. **2009.** Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell. Microbiol.* 11, 230-248.
- 85. Heinrichs D.E.,** Yethon J.A., Whitfield C. **1998.** Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 2, 221–232.
- 86. Helbig J.H.,** Bernander S., Castellani P.M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D., Lück P.C., Marques T., Mentula S., Peeters M.F., Pelaz C., Struelens M., Uldum S.A., Wewalka G., Harrison T.G. **2002.** Pan-European study on culture-proven Legionnaires disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 710-716.
- 87. Helbig J.H.,** Fernandez-Moreira E., Jacobs E., Lück P.C., Wittt M. **2006.** LPS architecture of *Legionella pneumophila* grown in broth and host cells. In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition.* Washington, DC: ASM Press, 261–264.
- 88. Helbig J.H.,** Jacobs E., Lück C. **2012.** *Legionella pneumophila* urinary antigen subtyping using monoclonal antibodies as a tool for epidemiological investigations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 1673–1677.
- 89. Helbig J.H.,** Kurtz J.B., Pastoris M.C., Pelaz C., Lück P.C. **1997.** Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 11, 2841-2845.

90. **Helbig J.H.**, Lück P.C., Knirel Y.A., Witzleb W., Zähringer U. **1995**. Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol. Infect.* 115, 71–78.
91. **Hindahl M.S.**, Iglewski B.H. **1984**. Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *J. Bacteriol.* 159, 107–113.
92. **Hoffmann C.**, Harrison C.F., Hilbi H. **2014**. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell. Microbiol.* 1, 15-26.
93. **Hoppe J.**, Ünal C.M., Thiem S., Grimpe L., Goldmann T., Gaßler N., Richter M., Shevchuk O., Steinert M. **2017**. PilY1 promotes *Legionella pneumophila* infection of human lung tissue explants and contributes to bacterial adhesion, host cell invasion, and twitching motility. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 63.
94. **Horwitz M.A.**, Silverstein S.C. **1980**. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Investig.* 3, 441-444.
95. **Ingresso D.**, Fowler A.V., Bleibaum J., Clarke S. **1989**. Sequence of the daspartyl/l-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 264, 20131–20139.
96. **Islam S.T.**, Eckford P.D., Jones M.L., Nugent T., Bear C.E., Vogel C., Lam J.S. **2013**. Proton-dependent gating and proton uptake by Wzx support O-antigen-subunit antiport across the bacterial inner membrane. *MBio.* 5, e00678.
97. **Ivanov S.S.**, Roy C.R. **2009**. Modulation of ubiquitin dynamics and suppression of DALIS formation by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Cell. Microbiol.* 11, 261-278.
98. **Jackman J.E.**, Raetz C.R., Fierke C.A. **1999**. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry.* 38, 1902–1911.
99. **Jäger J.**, Keese S., Roessle M., Steinert M., Schromm A.B. **2015**. Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cell. Microbiol.* 5, 607-620.

100. **Jantzen E.**, Sonesson A., Tangen T., Eng J. **1993**. Hydroxy-fatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis. *J. Clin. Microbiol.* 6, 1413-1419.
101. **Jones T.F.**, Benson R.F., Brown E.W., Rowland J.R., Crosier S.C., Schaffner W. **2003**. Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of Pontiac fever. *Clin. Inf. Dis.* 37, 1292–1297.
102. **Jorgenson M.A.**, Kannan S., Laubacher M.E., Young K.D. **2016(a)**. Dead-end intermediates in the enterobacterial common antigen pathway induce morphological defects in *Escherichia coli* by competing for undecaprenyl phosphate. *Mol. Microbiol.* 1, 1–14.
103. **Jorgenson M.A.**, Young K.D. **2016(b)**. Interrupting biosynthesis of O-antigen or the lipopolysaccharide core produces morphological defects in *Escherichia coli* by sequestering undecaprenyl phosphate. *J. Bacteriol.* 22, 3070–3079.
104. **Joseph C.A.**, Ricketts K.D., Yadav R., Patel S. **2010**. Travel-associated Legionnaires' disease in Europe in 2009. *Euro Surveill.* 15, 5–11.
105. **Kagan J.C.**, Stein M.P., Pypaert M., Roy C.R. **2004**. *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J. Exp. Med.* 9, 1201-1211.
106. **Kalynych S.**, Morona R., Cygler M. **2014**. Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiol.* 5, 1048–1065.
107. **Kay S.**, Grantham C., Dahdouh M. **2007**. Atypical presentation of Legionnaire's disease. *N. Y. med. j.* 2, 1-16.
108. **Keck M.**, Gisch N., Moll H., Vorhölter F.J., Gerth K., Kahmann U., Lissel M., Lindner B., Niehaus K., Holst O. **2011**. Unusual outer membrane lipid composition of the gram-negative, lipopolysaccharide-lacking myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biol. Chem.* 15, 12850-12859.
109. **Keenleyside W.J.**, Whitfield C. **1996**. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar *Borrez*. *J. Biol. Chem.* 45, 28581–28592.
110. **Kenyon J.J.**, Marzaioli A.M., De Castro C., Hall R.M. **2015**. 5,7-di-N-acetyl-acinetaminic acid: A novel non-2-ulosonic acid found in the capsule of an *Acinetobacter baumannii* isolate. *Glycobiology.* 6, 644-654.

111. **Knirel Y.A.**, Moll H., Zähringer U. **1996(a)**. Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 293, 223–234.
112. **Knirel Y.A.**, Helbig J.H., Zähringer U. **1996(b)**. Structure of a decasaccharide isolated by mild acid degradation and dephosphorylation of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49271. *Carbohydr. Res.* 283, 129–139.
113. **Knirel Y.A.**, Kocharova N.A., Shashkov A.S., Kochetkov N.K., Kholodkova E.V., Stanislavsky E.S. **1987**. Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific polysaccharide chains of the lipopolysaccharides from *P. aeruginosa* II (Sandvik) and V (IM-1, Verder-Evans). *Eur. J. Biochem.* 1, 189–197.
114. **Knirel Y.A.**, Moll H., Helbig J.H., Zähringer U. **1997**. Chemical characterization of a new 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexynonulosonic acid released by mild acid hydrolysis of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 304, 77–79.
115. **Knirel Y.A.**, Rietschel E.T., Marre R., Zähringer U. **1994**. The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 221, 239–245.
116. **Knirel Y.A.**, Senchenkova S.N., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Helbig J.H., Zähringer U. **2001**. Identification of a homopolymer of 5-acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetradexy-D-glycero-D-talononulosonic acid in the lipopolysaccharides of *Legionella pneumophila* non-1 serogroups. *Biochem. (Mosc.)* 9, 1035–1041.
117. **Knirel Y.A.**, Shashkov A.S., Tsvetkov Y.E., Jansson P.E., Zähringer U. **2003**. 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexynon-2-ulosonic acids in bacterial glycopolymers: chemistry and biochemistry. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 58, 371–417.
118. **Knirel Y.A.**, Veremeychenko S.N., Zdrovenko G.M., Shashkov A.S., Paramonov N.A., Zakharova I.Ya., Kochetkov N.K. **1995**. Somatic antigens of pseudomonads: structure of the O-specific polysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* biovar A strain IMV 472. *Carbohydr. Res.* 1, 147–151.
119. **Knirel Y.A.**, Vinogradov E.V., Shashkov A.S., Dmitriev B.A., Kochetkov N.K., Stanislavsky E.S., Mashilova G.M. **1982**. Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa* the structure of the O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* 0:2 (Lanyi) lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 125, 221–227.

120. **Kooistra O.**, Lüneberg E., Knirel Y.A., Frosch M., Zähringer U. **2002**. *N*-methylation in polylegionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Identification of 5-(*N,N*-dimethylacetimidoyl) amino and 5-acetimidoyl(*N*-methyl)amino-7-acetamido-3,5,7,9-tetrahydroxynon-2-ulosonic acid in the O-chain polysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 2, 560-572.
121. **Kooistra O.**, Lüneberg E., Lindner B., Knirel Y.A., Frosch M., Zähringer U. **2001**. Complex *O*-acetylation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-*O*-acetylation of legionaminic acid. *Biochemistry.* 25, 7630-7640.
122. **Kornhuber J.**, Rhein C., Müller C.P., Mühle C. **2015**. Secretory sphingomyelinase in health and disease. *Biol. Chem.* 6-7, 707-736.
123. **Kowalczyk B.**, Chmiel E., Palusińska-Szys M. **2021**. The role of lipids in *Legionella*-host interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1487.
124. **Kowalczyk B.**, Petzold M., Kaczyński Z., Szuster-Ciesielska A., Luchowski R., Gruszecki W.I., Fuchs B., Galuska C.E., Choma A., Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. **2023**. Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 facilitates interaction with host cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 14602.
125. **Kozak N.A.**, Benson R.F., Brown E., Alexander N.T., Taylor T.H., Shelton B.G., Fields B.S. **2009**. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2525–2535.
126. **Krinos C.**, High A.S., Rodgers F.G. **1999**. Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.* 2, 237–244.
127. **Laivier C.**, Bleuze M.O., Hantson P., Devos J. **2019**. Extreme rhabdomyolysis, acute renal failure, and protracted ileus in a case of *Legionella* pneumonia. *Case Rep. Crit. Care.* 2019, 3472627.
128. **Lakowicz J.R.** **2010**. Energy Transfer. In: Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, Boston, MA, 443-475.
129. **Ledesma E.**, Camaró M.L., Carbonell E., Sacristán T., Mart A., Pellicer S., Llorca J., Herrero P., Dasi M.A. **1995**. Subtyping of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 9, 846-848.

130. **Lima S.**, Guo M.S., Chaba R., Gross C.A., Sauer R.T. **2013**. Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress. *Science*. 6134, 837-841.
131. **Liu Y.**, Koudelka G. **2023(a)**. O-polysaccharides of LPS modulate *E. coli* uptake by *Acanthamoeba castellanii*. *Microorganisms*. 6, 1377.
132. **Liu Y.**, Koudelka G. **2023(b)**. The oligosaccharide region of LPS governs predation of *E. coli* by the bacterivorous protist, *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiol. Spectr.* 1, e02930-22.
133. **López-Lara I.M.**, Geiger O. **2001**. Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. *J. Biotechnol.* 91, 211–221.
134. **Lüneberg E.**, Zetzmann N., Alber D., Knirel Y.A., Kooistra O., Zähringer U., Frosch M. **2000**. Cloning and functional characterization of a 30 kb gene locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* 1, 37-49.
135. **March C.**, Cano V., Moranta D., Llobet E., Pérez-Gutiérrez C., Tomás J.M., Suárez T., Garmendía J., Bengoechea J.A. **2013**. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS One*. 2, e56847.
136. **Martinez-Morales F.**, Schobert M., Lopez-Lara I.M., Geiger O. **2003**. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology*. 149, 3461–3471.
137. **McNally D.J.**, Aubry A.J., Hui J.P., Khieu N.H., Whitfield D., Ewing C.P., Guerry P., Brisson J.R., Logan S.M., Soo E.C. **2007**. Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans. *J. Biol. Chem.* 19, 14463-14475.
138. **Mérault N.**, Rusniok C., Jarraud S., Gomez-Valero L., Cazalet C., Marin M., Brachet E., Aegerter P., Gaillard J.L., Etienne J., Herrmann J.L., Group tD-IS, Lawrence C., Buchrieser C. **2011**. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 5, 1708-1717.
139. **Mercante J.W.**, Winchell J.M. **2015**. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 95–133.
140. **Meredith T.C.**, Woodard R.W. **2003**. *Escherichia coli* YrbH is a D-arabinose 5-phosphate isomerase. *J. Biol. Chem.* 35, 32771–32777.

141. **Mi W.**, Li Y., Yoon S.H., Ernst R.K., Walz T., Liao M. **2017**. Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature*. 7671, 233-237.
142. **Minder A.C.**, de Rudder K.E., Narberhaus F., Fischer H.M., Hennecke H., Geiger O. **2001**. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Mol. Microbiol.* 39, 1186–1198.
143. **Mintz C.S.**, Arnold P.I., Johnson W., Schultz D.R. **1995**. Antibody-independent binding of complement component C1q by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63, 4939–4943.
144. **Mintz C.S.**, Schultz D.R., Arnold P.I., Johnson W. **1992**. *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect. Immun.* 60, 2769–2776.
145. **Mobarak E.**, Håversen L., Manna M., Rutberg M., Levin M., Perkins R., Rog T., Vattulainen I., Boren J. **2018**. Glucosylceramide modifies the LPS-induced inflammatory response in macrophages and the orientation of the LPS/TLR4 complex in silico. *Sci. Rep.* 8, 13600.
146. **Moll H.**, Knirel A.Y., Helbig H.J., Zähringer U. **1997**. Identification of an α -d-Manp-(1→8)-Kdo disaccharide in the inner core region and the structure of the complete core region of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 304, 91–95.
147. **Moll H.**, Sonesson A., Jantzen E., Marre R., Zähringer U. **1992**. Identification of 27-oxo-octacosanoic acid and heptacosane-1,27-dioic acid in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 76, 1–6.
148. **Mosimann S.C.**, Gilbert M., Dombrowski D., To R., Wakarchuk W.W., Strynadka N.C. **2001**. Structure of a sialic acid-activating synthetase, CMP-acylneuraminate synthetase in the presence and absence of CDP. *J. Biol. Chem.* 276, 8190–8196.
149. **Nath P.**, Morona R. **2015(a)**. Mutational analysis of the major periplasmic loops of *Shigella flexneri* Wzy: identification of the residues affecting O-antigen modal chain length control, and Wzz-dependent polymerization activity. *Microbiology.* 4, 774–785.
150. **Nath P.**, Morona R. **2015(b)**. Detection of Wzy/Wzz interaction in *Shigella flexneri*. *Microbiology.* 9, 1797–1805.

151. **Nazarenko E.L.**, Shashkov A.S., Knirel' Iu.A., Ivanova E.P., Ovodov Iu.S. **1990**. Uncommon acidic monosaccharides-components of O-specific polysaccharides of *Vibrio* bacteria. *Bioorg. Khim.* 10, 1426-1429.
152. **Nelson D.L.**, Cox M.M. **2017**. Lehninger – principles of biochemistry, 7th edn. WH Freeman and Company, New York.
153. **Neumeister B.**, Faigle M., Sommer M., Zähringer U., Stelter F., Menzel R., Schütt C., Northoff H. **1998**. Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infect. Immun.* 66, 4151–4157.
154. **Newton H.J.**, Sansom F.M., Dao J., Cazalet C., Bruggemann H., Albert-Weissenberger C., Buchrieser C., Cianciotto N.P., Hartland E.L. **2008**. Significant role for ladC in initiation of *Legionella pneumophila* infection. *Infect. Immun.* 7, 3075-3085.
155. **Odham G.**, Stenhagen E. **1972**. Biochemical applications of mass spectrometry. Ed. Waller R.G., Wiley-Interscience, New York, 223.
156. **Ogawa S.**, Tachimoto H., Kaga T. **2010**. Elevation of ceramide in *Acetobacter malorum* S24 by low pH stress and high temperature stress. *J. Biosci. Bioeng.* 1, 32-36.
157. **Ostergaard L.**, Huniche B., Andersen P.L. **1996**. Relative bradycardia in infectious diseases. *J. Infect.* 3, 185-191.
158. **Palusińska-Szys M.**, Kalityński R., Russa R., Dawidowicz A.L., Drożański W.J. **2008**. Cellular envelope phospholipids from *Legionella lytica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 283, 239–246.
159. **Palusińska-Szys M.**, Janczarek M., Kalityński R., Dawidowicz A.L., Russa R. **2011**. *Legionella bozemanae* synthesizes phosphatidylcholine from exogenous choline. *Microbiol. Res.* 166, 87–98.
160. **Palusińska-Szys M.**, Szuster-Ciesielska A., Janczarek M., Wdowiak-Wróbel S., Schiller J., Reszczyńska E., Gruszecki W.I., Fuchs B. **2019(a)**. Genetic diversity of *Legionella pcs* and *pmtA* genes and the effect of utilization of choline by *Legionella* spp. on induction of proinflammatory cytokines. *Pathog. Dis.* 77, ftz065.
161. **Palusińska-Szys M.**, Luchowski R., Gruszecki W.I., Choma A., Szuster-Ciesielska A., Lück C., Petzold M., Sroka-Bartnicka A., Kowalczyk B. **2019(b)**. The role of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide in host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 10, 2890.

162. **Palusińska-Szys M.**, Szuster-Ciesielska A., Kania M., Janczarek M., Chmiel E., Danikiewicz W. **2014**. *Legionella dumoffii* utilizes exogenous choline for phosphatidylcholine synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 8256–8279.
163. **Pancer K.**, Stypulkowska-Misiurewicz H. **2003**. Pontiac fever-non-pneumonic legionellosis. *Przegl. Epidemiol.* 57, 607–612.
164. **Patel H.**, Shelley P., Hatoum H. **2021**. Hypertriglyceridemia and massive rhabdomyolysis in a patient with disseminated *Legionella*. *Respir. Med. Case Rep.* 32, 101321.
165. **Payne N.R.**, Horwitz M.A. **1987**. Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* 166, 1377–1389.
166. **Personnic N.**, Striednig B., Lezan E., Manske C., Welin A., Schmidt A., Hilbi H. **2019**. Quorum sensing modulates the formation of virulent *Legionella* persisters within infected cells. *Nat. Commun.* 1, 5216.
167. **Petzold M.**, Thürmer A., Menzel S., Mouton J. W., Heuner K., Lück C., **2013**. A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *BMC Microbiol.* 198, 1-13.
168. **Plevin R.E.**, Knoll M., McKay M., Arbabi S., Cuschieri J. **2016**. The role of lipopolysaccharide structure in monocyte activation and cytokine secretion. *Shock.* 1, 22–27.
169. **Pope C.D.**, Dhad L., Cianciotto N.P. **1994**. Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* with mini-Tn10. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 107–112.
170. **Pradel E.**, Parker C.T., Schnaitman C.A. **1992**. Structures of the *Rfab*, *Rfai*, *Rfaj*, and *Rfas* genes of *Escherichia coli* K-12 and their roles in assembly of the lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 14, 4736–4745.
171. **Prashar A.**, Bhatia S., Tabatabaeiyazdi Z., Duncan C., Garduño R.A., Tang P., Low D.E., Guyard C., Terebiznik M.R. **2012**. Mechanism of invasion of lung epithelial cells by filamentous *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 10, 1632-1655.
172. **Prashar A.**, Ortiz M.E., Lucarelli S., Barker E., Tabatabaeiyazdi Z., Shamoun F., Raju D., Antonescu C., Guyard C., Terebiznik M.R. **2018**. Small Rho GTPases and the effector VipA mediate the invasion of epithelial cells by filamentous *Legionella pneumophila*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 133.
173. **Qian J.**, Garrett T.A., Raetz C.R. **2014**. In vitro assembly of the outer core of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry.* 8, 1250–1262.

174. **Radaev S.**, Dastidar P., Patel M., Woodard R.W., Gatti D.L. **2000**. Structure and mechanism of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 13, 9476-9484.
175. **Radika K.**, Raetz C.R. **1988**. Purification and properties of lipid A disaccharide synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 29, 14859–14867.
176. **Raetz C.R.** **1990**. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 129–170.
177. **Raetz C.R.**, Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E. **2007**. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 295–329.
178. **Raetz C.R.**, Whitfield C. **2002**. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 7, 635–700.
179. **Reichardt K.**, Jacobs E., Röske I., Helbig J. H. **2010**. *Legionella pneumophila* carrying the virulence-associated lipopolysaccharide epitope possesses two functionally different LPS components. *Microbiology.* 10, 2953–2961.
180. **Rolando M.**, Buchrieser C.A. **2019**. Comprehensive review on the manipulation of the sphingolipid pathway by pathogenic bacteria. *Front. Cell Dev. Biol.* 7,168.
181. **Rolando M.**, Escoll P., Nora T., Botti J., Boitez V., Bedia C., Daniels C., Abraham G., Stogios P.J., Skarina T., Christophe C., Dervins-Ravault D., Cazalet C., Hilbi H., Rupasinghe T.W., Tull D., McConville M.J., Ong S.Y., Hartland E.L., Codogno P., Levade T., Naderer T., Savchenko A., Buchrieser C. **2016**. *Legionella pneumophila* S1P-lyase targets host sphingolipid metabolism and restrains autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 1901–1906.
182. **Samuelsson J.**, Hallström L.P., Marrone G., Dias J.G. **2023**. Legionnaires' disease in the EU/EEA*: increasing trend from 2017 to 2019. *Euro. Surveill.* 11, 2200114.
183. **Schauer R.** **1982**. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40, 131-234.
184. **Schoenhofen I.C.**, McNally D.J., Vinogradov E., Whitfield D., Young N.M., Dick S., Wakarchuk W.W., Brisson J.R., Logan S.M. **2006**. Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* 2, 723-732.
185. **Schulz Ch.**, Lai X., Bertrams W., Jung A.L., Sittka-Stark A., Herkt Ch.E., Janga H., Zscheppang K., Stielow Ch., Schulte L., Hippenstiel S., Vera J., Schmeck B.

2017. THP-1-derived macrophages render lung epithelial cells hypo-responsive to *Legionella pneumophila* – a systems biology study. *Sci. Rep.* 7, 11988.
186. **Shen X.**, Banga S., Liu Y., Xu L., Gao P., Shamovsky I., Nudler E., Luo Z.Q. 2009. Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell. Microbiol.* 11, 911-926.
187. **Sherwood R.K.**, Roy C.R. 2016. Autophagy evasion and endoplasmic reticulum subversion: The Yin and Yang of *Legionella* intracellular infection. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 413–433.
188. **Shevchuk O.**, Jäger J., Steinert M. 2011. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Microbiol.* 2, 74.
189. **Sohlenkamp Ch.**, Geiger O. 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 1, 133–159.
190. **Sohlenkamp Ch.**, López-Lara M.I., Geiger O. 2003. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog. Lipid Res.* 42, 115–162.
191. **Sonesson A.**, Jantzen E., Bryn K., Larsson L., Eng J. 1989. Chemical composition of a lipopolysaccharide from *Legionella pneumophila*. *Arch. Microbiol.* 1, 72-78.
192. **Sperandeo P.**, Martorana A.M., Polissi A. 2017. The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: a nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 44, 17981-17990.
193. **Spighi L.**, Coiro S., Morroni S., Benedetti M., Savino K., Ambrosio G., Cavallini C. 2021. Acute myocarditis associated with *Legionella* infection: Usefulness of layer-specific two-dimensional longitudinal speckle-tracking Analysis. *J. Cardiovasc. Echogr.* 2, 98-101.
194. **Stankeviciute G.**, Tang P., Ashley B., Chamberlain J.D., Hansen M.E.B., Coleman A., D'Emilia R., Fu L., Mohan E.C., Nguyen H., Guan Z., Campopiano D.J., Klein E.A. 2022. Convergent evolution of bacterial ceramide synthesis. *Nat. Chem. Biol.* 3, 305-312.
195. **Stone B.J.**, Abu Kwaik Y. 1998. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 4, 1768-1775.

196. **Strahl H.**, Errington J. **2017**. Bacterial membranes: structure, domains, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 519-538.
197. **Suzuki T.**, Ito M., Kodama M., Mitsuma W., Izumi D., Hirono S., Hasegawa G., Aizawa Y. **2011**. Transient left ventricular dysfunction associated with severe *Legionella* infection. *J. Cardiol. Cases.* 2, e78-e81.
198. **Sweet C.R.**, Ribeiro A.A., Raetz C.R. **2004**. Oxidation and transamination of the 3"-position of UDP- *N*-acetylglucosamine by enzymes from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Role in the formation of lipid A molecules with four amide-linked acyl chains. *J. Biol. Chem.* 279, 25400–25410.
199. **Tang X.**, Chang S., Luo Q., Zhang Z., Qiao W., Xu C., Zhang C., Niu Y., Yang W., Wang T., Zhang Z., Zhu X., Wei X., Dong C., Zhang X., Dong H. **2019**. Cryo-EM structures of lipopolysaccharide transporter LptB2FGC in lipopolysaccharide or AMP-PNP-bound states reveal its transport mechanism. *Nat. Commun.* 1, 4175.
200. **Thélot F.**, Orlando B.J., Li Y., Liao M. **2020**. High-resolution views of lipopolysaccharide translocation driven by ABC transporters MsbA and LptB2FGC. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 63, 26-33.
201. **Thibault P.**, Logan S.M., Kelly J.F., Brisson J.R., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P. **2001**. Identification and characterization of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter* flagellin. *JBC.* 276, 34862-34870.
202. **Thürmer A.**, Helbig J.H., Jacobs E., Lück P.C. **2009**. PCR-based 'serotyping' of *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.* 5, 588-595.
203. **Tsai C.M.**, Frasch C.E. **1982**. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1, 115-119.
204. **Tsvetkov Y.E.**, Shashkov A.S., Knirel Y.A., Zähringer U. **2001**. Synthesis and identification in bacterial lipopolysaccharides of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto- and -D-glycero-D-talo-non-2-ulosonic acids. *Carbohydr. Res.* 3, 233-237.
205. **Vance D.E.**, Schneider W.J. **1981**. Conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Meth. Enzymol.* 71, 581–588.
206. **Vandersmissen L.**, De Buck E., Saels V., Coil D.A., Anné J. **2010**. A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 168-176.

207. **Verdon J.**, Labanowski J., Sahar T., Ferreira T., Lacombe C., Buchrieser C., Berjeaud J.M., Hechard Y. **2011**. Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808, 1146–1153.
208. **Verhasselt H.L.**, Buer J., Dedy J., Ziegler R., Steinmann J., Herbstreit F., Brenner T., Rath P.M. **2021**. COVID-19 Co-infection with *Legionella pneumophila* in 2 Tertiary-Care Hospitals, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 1535-1537.
209. **Vinogradov E.V.**, Michael F.S., Cox A.D. **2017**. The structure of the LPS O-chain of *Fusobacterium nucleatum* strain 25586 containing two novel monosaccharides, 2-acetamido-2,6-dideoxy-1-altrose and a 5-acetimidoylamino-3,5,9-trideoxy-gluco-non-2-ulosonic acid. *Carbohydr. Res.* 441, 10-15.
210. **Vinogradov E.V.**, Shashkov A.S., Knirel Y.A., Kochetkov N.K., Dabrowski J., Grosskurth H., Stanislavsky E.S., Kholodkova E.V. **1992**. The structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Salmonella arizonae* O61. *Carbohydr. Res.* 231, 1-11.
211. **Wagner C.**, Krönert C., Lück P.C., Jacobs E., Cianciotto N.P., Helbig J.H. **2007**. Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* reveals genes associated with lipopolysaccharide synthesis and recognition by typing monoclonal antibodies. *J. Appl. Microbiol.* 5, 1975-1982.
212. **Webster J.D.**, Vucic D. **2020**. The balance of TNF mediated pathways regulates inflammatory cell death signaling in healthy and diseased tissues. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 365.
213. **Wee B.A.**, Alves J., Lindsay D.S.J., Klatt A-B., Sargison F.A., Cameron R.L., Pickering A., Gorzynski J., Corander J., Marttinen P., Opitz B., Smith A.J., Fitzgerald R. **2021**. Population analysis of *Legionella pneumophila* reveals a basis for resistance to complement mediated killing. *Nat. Commun.* 12, 7165.
214. **Westphal O.**, Jann K. **1965**. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.* 5, 83–91.
215. **Whiley H.**, Bentham R. **2011**. *Legionella longbeachae* and legionellosis. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 579–583.
216. **Whitfield C.** **2006**. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 39–68.

217. **Whitfield C.**, Kaniuk N., Frirdich E. **2003**. Molecular insights into the assembly and diversity of the outer core oligosaccharide in lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and *Salmonella*. *J. Endotoxin Res.* 4, 244–249.
218. **WHO**, Disease Outbreaks News, Legionellosis – Poland, 2023.
219. **Wilderman P.J.**, Vasil A.I., Martin W.E., Murphy R.C., Vasil M.L. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J. Bacteriol.* 184, 4792–4799.
220. **Williams J.G.**, McMaster C.R. **1998**. Scanning alanine mutagenesis of the CDP-alcohol phosphotransferase motif of *Saccharomyces cerevisiae* choline phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* 273, 13482–13487.
221. **Wilson A.**, Ruiz N. **2021**. Transport of lipopolysaccharides and phospholipids to the outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* 60, 51-57.
222. **Xiong L.**, Yamasaki S., Chen H., Shi L., Mo Z. **2017**. Intracellular growth and morphological characteristics of *Legionella pneumophila* during Invasion and proliferation in different cells. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1035–1042.
223. **Yang Z.**, Chen Y., Zhang Q., Chen X., Deng Z. **2021**. Major outer membrane protein from *Legionella pneumophila* inhibits phagocytosis but enhances chemotaxis of RAW 264.7 macrophages by regulating the FOXO1/Coronin-1 axis. *J. Immunol. Res.* 2021, 9409777.
224. **Yethon J.A.**, Heinrichs D.E., Monteiro M.A., Perry M.B., Whitfield C. **1998**. Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J. Biol. Chem.* 41, 26310–26306.
225. **Yethon J.A.**, Vinogradov E., Perry M.B., Whitfield C. **2000**. Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by waaG destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J. Bacteriol.* 19, 5620-5623.
226. **Yethon J.A.**, Whitfield C. **2001**. Purification and characterization of WaaP from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. *J. Biol. Chem.* 8, 5498–5504.
227. **Zähringer U.**, Knirel Y.A., Lindner B., Helbig J.H., Sonesson A., Marre R., Rietschel E.T. **1995**. The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392, 113-139.

- 228. Zarogoulidis P.**, Alexandropoulou I., Romanidou G., Konstasntinidis T.G., Terzi E., Saridou S., Stefanis A., Zarogoulidis K., Constantinidis T.C. **2011**. Community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila*, the utility of PCR, and a review of the antibiotics used. *Int. J. Gen. Med.* 4, 15–19.
- 229. Zhang F.**, Gao X.D., Wu W.W., Gao Y., Zhang Y.W., Wang S.P. **2013**. Polymorphisms in toll-like receptors 2, 4 and 5 are associated with *Legionella pneumophila* infection. *Infection.* 5, 941–948.
- 230. Zhang Y.M.**, Rock C.O. **2008**. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 222-233.
- 231. Zik J.**, Yoon S.H., Guan Z., Skidmore G.S., Gudoor R.R., Davies K.M., Deutschbauer A.M., Goodlett D.R., Klein E.A., Ryan K.R. **2022**. *Caulobacter* lipid A is conditionally dispensable in the absence of fur and in the presence of anionic sphingolipids. *Cell Rep.* 9, 31.
- 232. Ziltener P.**, Reinheckel T., Oxenius A. **2016**. Neutrophil and alveolar macrophage-mediated innate immune control of *Legionella pneumophila* lung infection via TNF and ROS. *PLoS Pathog.* 4, e1005591.
- 233. Zou C.H.**, Knirel Y.A., Helbig J.H., Zähringer U., Mintz C.S. **1999**. Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O-acetylation of the O-polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 181, 4137–4141.

VIII ANEKS



Warszawa, dnia 19. 10. 2016 r.

MINISTER ŚRODOWISKA

DLP-VI.431.204.2016

DECYZJA Nr 211/2016

Na podstawie art. 15e pkt 2 w zw. z art. 15k w zw. z art. 15m ust. 2 ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. z 2015 r. poz. 806) oraz art. 104 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. z 2016 r. poz. 23, z późn. zm.):

1. po rozpatrzeniu wniosku Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin, reprezentowanego przez pana dr hab. Arkadiusza Berezę, o wydanie zgody na zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych (nr w Rejestrze Zamkniętego Użycia Mikroorganizmów Genetycznie Zmodyfikowanych: 01.2–32/2016),
2. po dokonaniu kontrolnego sprawdzenia danych podanych we wniosku, o którym mowa w pkt. 1 w celu stwierdzenia, czy wnioskodawca spełnia warunki w zakresie bezpieczeństwa wymagane do prowadzenia danego rodzaju działalności, na podstawie art. 15i ust. 1 ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych,
3. po przeprowadzeniu postępowania z udziałem społeczeństwa, w trybie i na zasadach określonych ustawą z dnia 3 października 2008 r. o udostępnianiu informacji o środowisku i jego ochronie, udziale społeczeństwa w ochronie środowiska oraz o ocenach oddziaływania na środowisko (Dz. U. z 2013 poz. 1235, z późn. zm.),
4. uwzględniając ocenę zagrożenia, stanowiącą załącznik do wniosku, o którym mowa w pkt 1, w związku z planowanymi działaniami zamkniętego użycia mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych, zaliczonych do II kategorii zagrożenia,

5. po otrzymaniu uchwały Komisji do spraw Mikroorganizmów i Organizmów Genetycznie Zmodyfikowanych z dnia 14 października 2016 r., dotyczącej opinii w sprawie wniosku, o którym mowa w pkt 1

wyrażam zgodę

Uniwersytetowi Marii Curie-Skłodowskiej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin, na zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych w zakresie wykorzystania mutantów *Legionella pneumophila* defektywnych w syntezie łańcucha 0-swoistego lipopolisacharydu ściany komórkowej do badań interakcji bakterii z komórkami gospodarza (pierwotniakami i makrofagami człowieka), w zakładzie inżynierii genetycznej prowadzonym na podstawie zezwolenia nr 28 z dnia 16 marca 2016 r.

Zgoda jest ważna bezterminowo.

Z uwagi na uwzględnienie w całości żądania strony na podstawie art. 107 § 4 kodeksu postępowania administracyjnego odstąpiono od uzasadnienia powyższej decyzji.

Pouczenie:

Strona niezadowolona z decyzji, zgodnie z art. 127 § 3 w zw. z art. 129 § 2 Kodeksu postępowania administracyjnego, może zwrócić się do Ministra Środowiska z wnioskiem o ponowne rozpatrzenie sprawy w terminie 14 dni od daty jej doręczenia.

Z upoważnienia Ministra Środowiska
Zastępca Dyrektora
Departamentu Ochrony Przyrody

Agnieszka Dalbiak

Zwolniono z opłaty skarbowej na podstawie art. 5 ust. 3 ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. z 2015 r. poz. 806)

Otrzymuje:

1. Dr hab. Arkadiusz Bereza, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin
2. a/a

Ryc. 1A Skan zgody Ministerstwa Środowiska na zamknięte użycie mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie.



Warszawa, dnia 16.03.2016 r.

MINISTER ŚRODOWISKA

DLP-VI.431.83.2015

DECYZJA Nr 28/2016

Na podstawie art. 15a ust. 2 i 3 w związku z art. 15k w związku z art. 15m ust. 2 (art. 30 ust. 2) ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. z 2015 r. poz. 806) oraz art. 104 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. z 2016 r. poz. 23):

1. po rozpatrzeniu Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin, reprezentowanego przez prof. dr. hab. Stanisława Michałowskiego, o wydanie zezwolenia na prowadzenie zakładu inżynierii genetycznej (nr w Rejestrze Zakładów Inżynierii Genetycznej: 04-62/2015),
2. po dokonaniu kontrolnego sprawdzenia danych podanych we wniosku, o którym mowa w pkt. 1, w celu stwierdzenia, czy wnioskodawca spełnia warunki w zakresie bezpieczeństwa wymagane do prowadzenia danego rodzaju działalności, na podstawie art. 15i ust. 1 (art. 23 ust. 2) ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych,
3. po przeprowadzeniu postępowania z udziałem społeczeństwa, w trybie i na zasadach określonych ustawą z dnia 3 października 2008 r. o udostępnianiu informacji o środowisku i jego ochronie, udziale społeczeństwa w ochronie środowiska oraz o ocenach oddziaływania na środowisko (Dz. U. z 2013 poz. 1235, z późn. zm.),
4. po otrzymaniu w dniu 11 lutego 2016 roku opinii państwowego wojewódzkiego inspektora sanitarnego w Lublinie – w zakresie warunków higieny pracy,
5. po otrzymaniu w dniu 5 lutego 2016 roku opinii okręgowego inspektora pracy w Lublinie – w zakresie spełniania wymagań bezpieczeństwa i higieny pracy przez obiekty, pomieszczenia, stanowiska i procesy pracy, o których mowa we wniosku określonym w pkt 1,

Sekretariat Rektora UMCS

Wpłynęło dn. 24. 03. 2016

Nr 353/16 1

6. po otrzymaniu uchwały Komisji do spraw Mikroorganizmów i Organizmów Genetycznie Zmodyfikowanych z dnia 12 lutego 2016 roku, dotyczącej opinii w sprawie wniosku, o którym mowa we wniosku określonym w pkt. 1

zezwalam

Uniwersytetowi Marii Curie-Skłodowskiej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin na prowadzenie na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, zakładu inżynierii genetycznej, w którym ma być prowadzone zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczanych do II kategorii zagrożenia.

Zezwolenie jest ważne bezterminowo.

Z uwagi na uwzględnienie w całości żądania strony na podstawie art. 107 § 4 kodeksu postępowania administracyjnego odstąpiono od uzasadnienia powyższej decyzji.

Pouczenie:

Strona niezadowolona z decyzji, zgodnie z art. 127 § 3 w zw. z art. 129 § 2 Kodeksu postępowania administracyjnego, może zwrócić się do Ministra Środowiska z wnioskiem o ponowne rozpatrzenie sprawy w terminie 14 dni od dnia jej doręczenia.

Z upoważnienia
Ministra Środowiska
Zastępca Dyrektora Departamentu
Leśnictwa i Ochrony Przyrody
Anna Zornaczuk-Luba

Zwolniono z opłaty skarbowej na podstawie art. 5 ust. 3 ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. z 2015 r. poz. 806).

Otrzymuje:

1. Prof. Stanisław Michałowski, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin
2. a/a

Do wiadomości:

1. Główny Inspektorat Sanitarny, ul. Targowa 65, 03-729 Warszawa
2. Państwowa Inspekcja Pracy, ul. Krucza 38/42, 00-926 Warszawa
3. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska

Ryc. 2A Skan zgody Ministerstwa Środowiska na zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczanych do II kategorii zagrożenia.

Tabela 1A *Dominujące lipidy szczepów komplementacyjnych: T24-K6-1, pJBBORF8, analizowane za pomocą UPLC-MS/MS w trybie jonów dodatnich i ujemnych.*

T24-K6-1	pJBBORF8
PC(15:0_16:0)	PC(15:0_16:0)
PC(16:0_16:1)	PC(16:0_16:0)
PC(17:1_16:0)	PC(16:0_16:1)
PC(16:0_16:0)	PC(16:0_17:0)
PC(15:0_16:0)	PC(18:0_16:1)
PC(16:0_17:0)	PC(20:0_16:1)
dMePE(15:0_15:0)	dMePE(16:1_21:0)
dMePE(17:1_18:0)	dMePE(31:0)
dMePE(20:0_16:1)	dMePE(15:0_14:0)
PE(16:0_16:1)	PE(15:0_15:0)
PE(16:0_17:0)	PE(15:0_16:0)
PE(17:1_17:0)	PE(16:0_14:0)
PE(15:0_16:0)	PE(18:0_15:0)
PE(16:0_16:1)	PE(16:0_16:1)
PE(18:0_15:0)	PE(15:0_16:1)
TG(16:0_16:0_16:0)	TG(18:0_16:0_18:0)
TG(16:0_16:0_16:1)	TG(18:1_18:1_18:1)
TG(16:0_18:1_18:1)	TG(16:0_16:0_16:1)
TG(18:1_18:1_18:1)	TG(16:0_16:0_16:0)
PG(15:0_16:0)	PG(15:0_16:0)
PG(16:0_16:1)	PG(15:0_17:0)
PG(16:0_16:0)	PG(16:0_16:1)
PG(17:1_16:0)	PG(17:1_16:0)
DG(32:3e)	DG(31:2e)
DG(33:3e)	DG(38:1e)
CL(72:0)	CL(74:1)
CL(72:1)	CL(70:0)
Cer(t34:0)	Cer(t34:0)
Cer(t35:0)	Cer(t35:0)



Article

Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Facilitates Interaction with Host Cells

Bożena Kowalczyk ¹, Markus Petzold ², Zbigniew Kaczyński ³, Agnieszka Szuster-Ciesielska ⁴, Rafał Luchowski ⁵, Wiesław I. Gruszecki ⁵, Beate Fuchs ⁶, Christina E. Galuska ⁶, Adam Choma ¹, Jacek Tarasiuk ¹ and Marta Palusińska-Szys ^{1,*}

- ¹ Department of Genetics and Microbiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 20-033 Lublin, Poland; b.kowalczyk746@wp.pl (B.K.); adam.choma@mail.umcs.pl (A.C.); jacek.tarasiuk@mail.umcs.pl (J.T.)
- ² Institute of Medical Microbiology and Virology, University Hospital Carl Gustav Carus, University of Technology Dresden, 01069 Dresden, Germany; markus.petzold@ukdd.de
- ³ Laboratory of Structural Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 80-309 Gdansk, Poland; zbigniew.kaczynski@ug.edu.pl
- ⁴ Department of Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 20-033 Lublin, Poland; agnieszka.szuster-ciesielska@mail.umcs.pl
- ⁵ Department of Biophysics, Institute of Physics, Faculty of Mathematics, Physics and Computer Science, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland; rafal.luchowski@mail.umcs.pl (R.L.); wieslaw.gruszecki@mail.umcs.pl (W.I.G.)
- ⁶ Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Core Facility Metabolomics, 18196 Dummerstorf, Germany; fuchs.beate@fbn-dummerstorf.de (B.F.); galuska.christina@fbn-dummerstorf.de (C.E.G.)
- * Correspondence: marta.paluszinska-szys@mail.umcs.pl



Citation: Kowalczyk, B.; Petzold, M.; Kaczyński, Z.; Szuster-Ciesielska, A.; Luchowski, R.; Gruszecki, W.I.; Fuchs, B.; Galuska, C.E.; Choma, A.; Tarasiuk, J.; et al. Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Facilitates Interaction with Host Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14602. <https://doi.org/10.3390/ijms241914602>

Academic Editor: Andreas Burkovski

Received: 22 August 2023

Revised: 22 September 2023

Accepted: 23 September 2023

Published: 27 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Legionella pneumophila* is the primary causative agent of Legionnaires' disease. The mutant-type strain interrupted in the ORF7 gene region responsible for the lipopolysaccharide biosynthesis of the *L. pneumophila* strain Heysham-1, lacking the O-acetyl groups attached to the rhamnose of the core part, showed a higher surface polarity compared with the wild-type strain. The measurement of excitation energy transfer between fluorophores located on the surface of bacteria and eukaryotic cells showed that, at an early stage of interaction with host cells, the mutant exhibited weaker interactions with *Acanthamoeba castellanii* cells and THP-1-derived macrophages. The mutant displayed reduced adherence to macrophages but enhanced adherence to *A. castellanii*, suggesting that the O-acetyl group of the LPS core region plays a crucial role in facilitating interaction with macrophages. The lack of core rhamnose O-acetyl groups made it easier for the bacteria to multiply in amoebae and macrophages. The mutant induced TNF- α production more strongly compared with the wild-type strain. The mutant synthesized twice as many ceramides Cer(t34:0) and Cer(t38:0) than the wild-type strain. The study showed that the internal sugars of the LPS core region of *L. pneumophila* sg 1 can interact with eukaryotic cell surface receptors and mediate in contacting and attaching bacteria to host cells as well as modulating the immune response to infection.

Keywords: legionnaires' disease; lipopolysaccharide; lipids; TNF- α ; IL-6

1. Introduction

Legionella spp. are facultative aerobic bacteria that primarily thrive in freshwater environments and artificial water systems. They are commonly found as an essential part of intricate biofilm structures attached to surfaces in aquatic settings. Various species of protozoa, including those from the genera *Acanthamoeba*, *Naegleria*, and *Tetrahymena*, play a crucial role in the ecology and pathogenesis of *Legionella*, facilitating the intensive multiplication of the bacteria [1]. The proliferation of *Legionella* within protozoan cells is possibly due to the use of numerous cell biology tools by the bacteria [2,3]. Host cell manipulation tools that evolved in interaction with protozoa have allowed *Legionella* to infect

lung macrophages, becoming a human pathogen. The bacteria cause a severe pneumonia known as Legionnaires' disease, which can be fatal if not diagnosed and treated promptly.

Currently, there are 72 known species within the genus *Legionella*, although not all of them contribute equally to the laboratory-confirmed cases of Legionnaires' disease worldwide [4]. Among these species, *L. pneumophila* is the predominant cause, responsible for approximately 80–90% of cases in Europe and the United States [5]. Moreover, even within the *L. pneumophila* species, the distribution of disease-causing strains is uneven, with serogroup (sg) 1 strains accounting for around 90% of cases [6], although *L. pneumophila* sg 2–15 is more common in building water systems than *L. pneumophila* sg 1 [7,8].

The serogroup of *L. pneumophila* is determined by the composition of its lipopolysaccharide (LPS), which serves as a structural component and significantly influences the pathogen's properties and capabilities. LPS is a glycolipid consisting of a surface-exposed O-specific chain, a core oligosaccharide divided into an outer and an inner part, and a lipid A, which anchors the entire LPS molecules to the outer membrane of the bacterial cell envelope. The lipid A sugar backbone of *L. pneumophila* LPS is composed of a phosphorylated disaccharide consisting of 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (GlcN3N). The GlcN3N subunits are linked by amide bonds with hydroxy fatty acids, which are acylated by linear, branched (*iso* or *anteiso*), and long-chain fatty acids [9,10]. Fatty acids [28:0 (27-oxo) and 27-dioic], possessing the double length as highly potent enterobacterial acyl groups, may be responsible for the low endotoxicity of *L. pneumophila* lipid A. The outer part of the oligosaccharide core consists of rhamnose (Rha), mannose (Man), acetylquinovosamine (QuiNAc), and acetylglucosamine (GlcNAc) in the molar ratio of 2.1:1.1:1.1:4 [11,12]. The presence of *N*- and *O*-acetyl groups of amino sugars (QuiNAc and GlcNAc) and deoxy sugars (Rha and QuiNAc) impart a distinct hydrophobic character to the outer core. The inner core contains two 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic (Kdo) acid molecules bound by a 2→4 ketosidic linkage. The distal Kdo is decorated by D-mannose connected to the C8 position. The hydrophilic inner core of *L. pneumophila* LPS exhibits similarities and differences compared with enterobacterial core oligosaccharides in containing Kdo but lacking heptose and phosphate groups. The O-specific chain of the *L. pneumophila* Philadelphia strain is a homopolymer containing 10 to 75 repeat units of 5-acetamidino-7-acetamido-8-*O*-acetyl-3,5,7,9-tetra-deoxy-L-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (legionaminic acid) [13]. High heterogeneity within the O-specific chain of LPS provided the basis for the classification of *L. pneumophila* into 15 serogroups. The application of monoclonal antibodies (mAbs) from the Dresden panel, which recognize specific LPS epitopes, facilitated the division of sg 1 strains into nine distinct subgroups. These subgroups were designated as mAb 3/1-positive, Pontiac strains (Philadelphia, Knoxville, Benidorm, France/Allentown) and mAb 3/1-negative, non-Pontiac strains (Bellingham, Oxford, OLDA, Heysham, Camperdown) [14]. The epitope recognized by the mAb3/1 antibody is the 8-*O*-acetyl group of polylegionaminic acid, transferred by the *O*-acetyltransferase encoded by the *lag-1* gene. However, the *O*-acetylation pattern of the *L. pneumophila* sg 1 core oligosaccharide and short-chain O-polysaccharide is *lag-1*-independent [15].

The genetic background of LPS molecules in *L. pneumophila* sg 1 strains consists of a highly conserved 15 kb region and an sg1-specific, variable 18 kb region, which is partially disrupted by phage-related genes. The region spanning from ORF6 to ORF11 of the sg 1-specific region is likely involved in late LPS modification [16].

The presence of *O*-acetyl LPS groups in *L. pneumophila* sg 1 contributes to an increase in the hydrophobicity of the bacterial surface. This characteristic plays a crucial biological role both in the dissemination of bacteria by facilitating the formation of contaminated aerosols and in interacting with host cells at various stages, including adhesion to protozoa and macrophage cells, as well as promoting intracellular survival by inhibiting complement-mediated lysis and neutrophil phagocytosis [17]. Epidemiological studies have confirmed a direct correlation between the epitope recognized by mAb3/1 and the increased virulence of *L. pneumophila* sg 1. The community- and nosocomial-acquired, as well as travel-associated isolates from patients with Legionnaires' disease, were predominantly recognized by this

antibody [14]. However, the proportion of mAb 3/1-negative sg 1 isolates was significantly higher in nosocomial cases compared with community- or travel-associated cases [14]. Moreover, the ORF7 gene biosynthesis LPS was harbored by significantly more of the clinical isolates of *L. pneumophila* sg1 compared with the environmental isolates in Japan and China [18].

To investigate how modifications of the LPS core region influence interactions with host cells and the modulation of the immune response, the Heysham-1 strain of *L. pneumophila* sg1, belonging to the non-Pontiac group, and the mutant interrupted in the ORF7 gene region were employed.

2. Results

2.1. Phenotypical Screening

The reactivity of the wild-type *L. pneumophila* Heysham-1 strain, the mutant-type T6-K13 strain, and the complementant T24-K6-1 strain with the mAb antibodies showed an altered phenotype demonstrated as the loss of reactivity with mAb 91/1 and 91/2 (both IgG3, κ) in ELISA and indirect immunofluorescence. These mAbs are part of the extended Dresden panel (BALB/c mice immunized with the *L. pneumophila* strain Corby) [19,20]. The complementant T24-K6-1 strain restored this phenotype (Figure 1). There is no difference between the wild-type, mutant-type, and complementant strains regarding the growth behavior and the colony morphology, color, and texture.

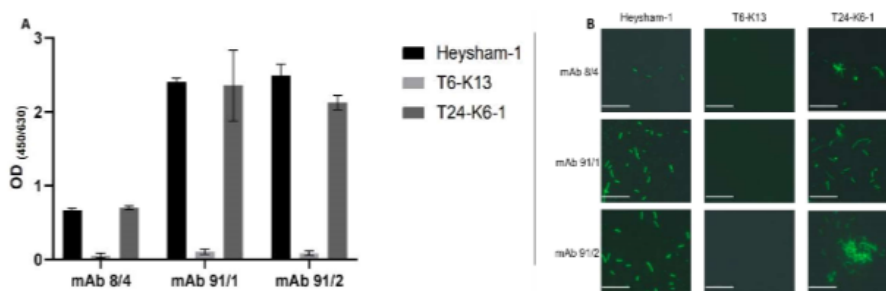


Figure 1. Reactivity of Heysham-1 (wild-type), T6-K13 (mutant-type), and T24-K6-1 (complementant) strains with monoclonal antibodies using (A) indirect ELISA (four experimental repeats indicated with standard deviation) and (B) indirect immunofluorescent assay. Scale bar = 10 μ m.

2.2. NMR Spectroscopy

Three different OPSs of *Legionella* (Heysham-1, T6-K13, and T24-K6-1) were analysed using NMR spectroscopy. The profiles of ^1H NMR spectra were very similar (Figure 2).

The spectra showed proton signals in ranges characteristic of polysaccharides and their non-sugar substituents: anomeric protons (δ 4.5–5.2), sugar ring protons (δ 3.4–4.5), and methyl protons of deoxy sugars (δ 1.1–1.3) as well as methyl protons of acetyl groups (δ 1.9–2.4). Preliminary analysis of ^1H NMR spectra in the anomeric range revealed a high heterogeneity of the polysaccharides, which was evidenced by a large number of signals with different intensities and widths. This observation was also confirmed by a very large number of signals of various intensities in the range of so-called acetyl groups (δ 1.9–2.4). In addition, a large difference was found in the intensity of the sugar ring signals compared with those of the anomeric range. To solve this problem, it was necessary to record and analyse 2D NMR spectra. The further description was focused on sample T6-K13 due to the aforementioned similarity of the analysed samples. The HSQC spectrum confirmed the observation from the analysis of the ^1H spectra. The characteristic areas of cross-peaks

originating from ^1H - ^{13}C correlation (methyl groups, methylene groups, ring, anomeric) were identified on the spectrum (Figure 3).

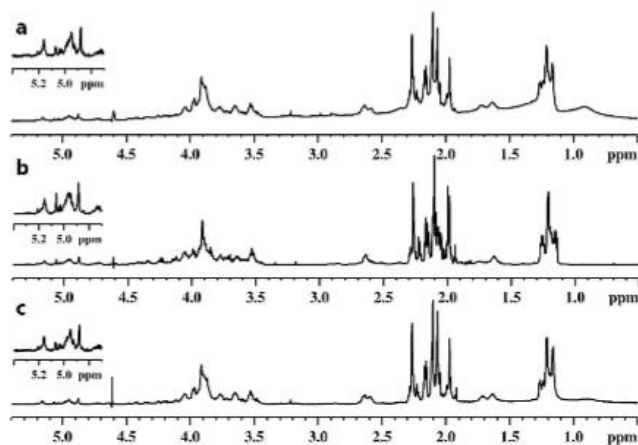


Figure 2. ^1H NMR spectra (39°C , 700 MHz) of *Legionella* the O-polysaccharides: (a) Heysham-1, (b) T6-K13, (c) T24-K6-1. The enlargement of the anomeric region is placed in the upper left corner of each spectrum.

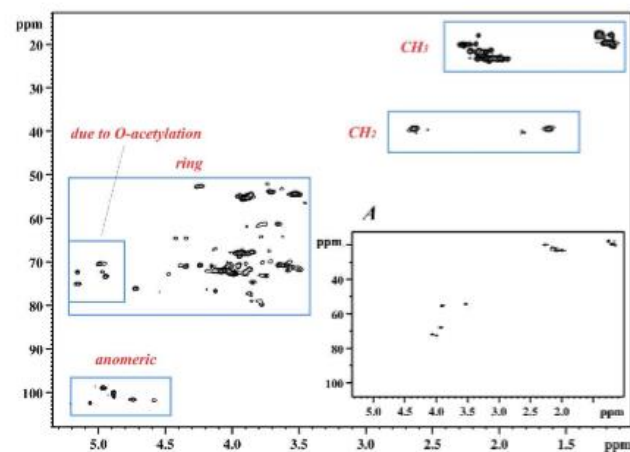


Figure 3. The HSQC NMR spectrum (39°C , 700 MHz) of the OPS of the *L. pneumophila* T6-K13 strain. The blue frames group cross-peaks from similar ^1H - ^{13}C arrangements. Graph A: The spectrum in the lower right corner shows only cross-peaks from high-intensity proton signals on the ^1H NMR spectrum (threshold shifted upward).

The analyses of only the most intensive signals on the HSQC spectrum (Figure 3A) revealed five cross-peaks in the sugar ring region at δ 4.057/72.06, δ 3.994/72.72, δ 3.920/67.91, δ 3.913/55.43, and δ 3.529/54.46, two cross-peaks of one methylene group at δ 2.635/1.630/39.51,

and one cross-peaks of the methyl group at δ 1.202/19.72, as well as a few cross-peaks from methyl groups of acetyl groups. The TOCSY spectrum showed that all cross-peaks (except those of acetyl groups) belonged to one spin system. The COSY spectrum allowed the order of protons in the spin system to be determined starting from the methyl group. In addition, the HMBC spectrum was used to assign two quaternary carbon atoms C-2 and C-1, respectively, δ 101.87, and δ 174.36. The chemical shift values of all carbon atoms and protons of the OPS (Table 1) were determined based on COSY and TOCSY homonuclear spectra, as well as HSQC and HMBC heteronuclear NMR spectra.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR 700 MHz data of the OPS isolated from the mutant T6-K13.

Residue	Chemical Shifts (ppm) ^1H and ^{13}C								
	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Legp}\text{-}(2 \rightarrow$	-	-	2.635/1.630	4.057	3.529	3.994	3.913	3.920	1.202
	174.36	101.87	39.51	72.06	54.46	72.72	55.43	67.91	19.72
N-Acetyl	-	2.103							
	175.24	23.29							
N-Acetimidoyl	-	2.264							
	167.73	20.11							

The identification of the sugar residue was achieved through the comparison of NMR data with the literature [13,21–23]. The values collected in Table 1 were basically identical to those presented for the O-specific chain of *L. pneumophila* sg 1 [13]. The relatively high value of C-4 (δ 72.06) indicated the position of substitution. The OPS of the mutant of *L. pneumophila* was a homopolymer consisting of 2 \rightarrow 4 linked 5-acetamidino-7-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-L-glycero-D-galacto-nonulosonic acid residues.

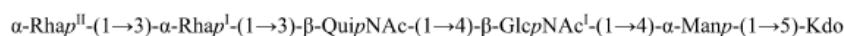
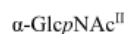
A detailed analysis of the NMR spectra recorded for the Heysham-1 strain and the T24-K6-1 strain gave essentially the same chemical shift values as for the OPS of the T6-K13 strain.

According to the assigned chemical structure of OPS, the relatively small intense signals in the anomeric range of the ^1H spectrum (Figure 2) must have originated from the core part. A significant number of cross-peaks moved to the higher chemical shift values in the proton domain of the HSQC spectrum (Figure 3) was indicative of a high degree of O-acetylation. This observation explained the very complex profile of the ^1H spectrum in the anomeric range. Also, this finding is consistent with literature data on the structure of the core part of *L. pneumophila* sg 1, which was characterised by a very high degree of acetylation [11].

In the next step, an attempt was made to simplify the NMR spectra through the de-O-acetylation of the OPS. The HSQC spectrum recorded for the de-O-acetylated sample T6-K13 confirmed the effectiveness of the reaction (Figure 4).

No cross-peaks were observed in the previously marked characteristic region. The recorded ^1H NMR spectra for all de-O-acetylated samples showed very high similarity (Figure 5).

The comparison of the recorded spectra with the literature allowed a preliminary identification of the signals and a possible structure of the core part to be proposed [11].



In the spectra recorded for the analysed samples, for each of two Rha residues, two anomeric signals were identified. To explain this observation, it would be necessary to construct an R-LPS-producing mutant.

A detailed comparison showed that the Heysham-1 and T24-K6-1 spectra are virtually identical (Figure 5). However, they differ slightly from T6-K13 in the range of the anomeric proton signals. A large number of the anomeric signals of the mannose residue was due to the presence of the various forms of Kdo residue to which the mannose residue is attached.

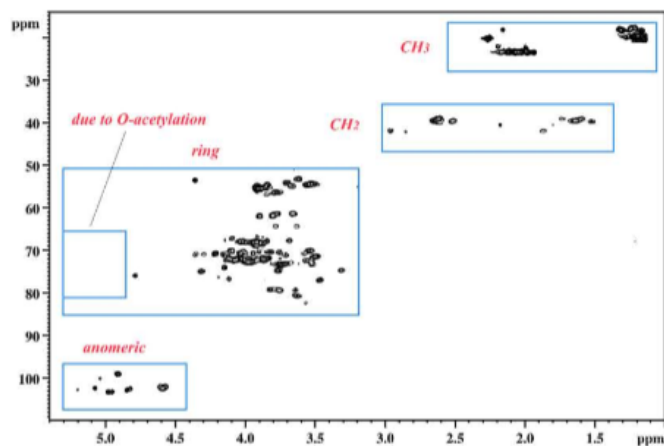


Figure 4. The HSQC NMR spectrum (39 °C, 700 MHz) of the de-O-acetylated OPS of the T6-K13 strain. The blue frames group cross-peaks from similar ^1H - ^{13}C arrangements.

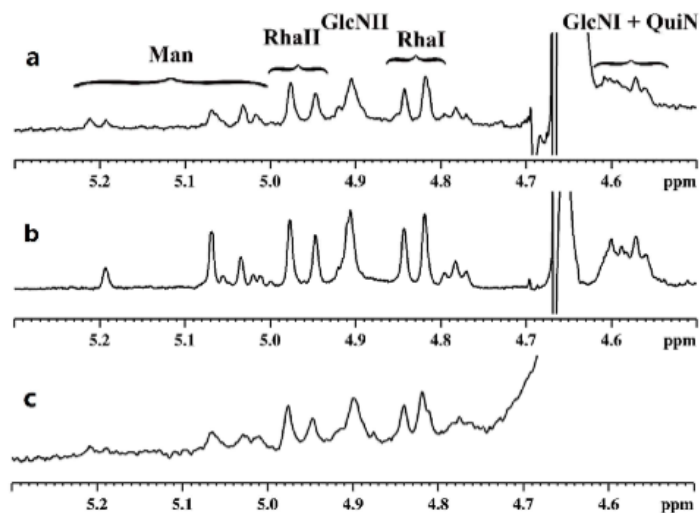


Figure 5. The anomeric regions of ^1H NMR spectra (39 °C, 700 MHz) of *L. pneumophila* de-O-acetylated O-polysaccharides: (a) Heysham-1, (b) T6-K13, (c) T24-K6-1.

2.3. A Mutation in the LPS Synthesis Gene Affects the Lipid Profile of *L. pneumophila*

Lipidomic analysis based on liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) has allowed for the comprehensive identification of approx. two hundred lipid molecular species in the *L. pneumophila* strains. The lipid identified in the *L. pneumophila* Heysham-1 strain and the mutant-type T6K-13 strain included triglycerides (TG), diglycerides (DG), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), dimethylphosphatidylethanolamines (dMePE), phosphatidylglycerols (PG), cardiolipins (CL), and ceramides (Cer). Lipidomic analyses showed no significant differences in the content of individual lipid classes among the tested strains. However, lipidomic profiling revealed differences in the content of molecular species between the *L. pneumophila* strains. The main lipid fractions of the Heysham-1 strain and the mutant-type strain were phospholipids, dominated by phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE). A structural analysis of phospholipids (PLs) showed that all the tested strains synthesized 23 different PCs with fatty acids with 14 to 22 acyl chain lengths, saturated and monounsaturated, and fatty acid with a cyclopropyl ring (cyclopropyl 17:0). The main phosphatidylcholines were PC(15:0_16:0), PC(16:0_16:0), and PC(16:0_16:1). The wild-type strain synthesized more PC(15:0_16:0) and PC(16:0_16:0) than the mutant-type strain. The T6K-13 strain was characterized by a higher content of PC(16:0_16:1) and PC(16:1_19:0) compared with the Heysham-1 strain (Figure 6).

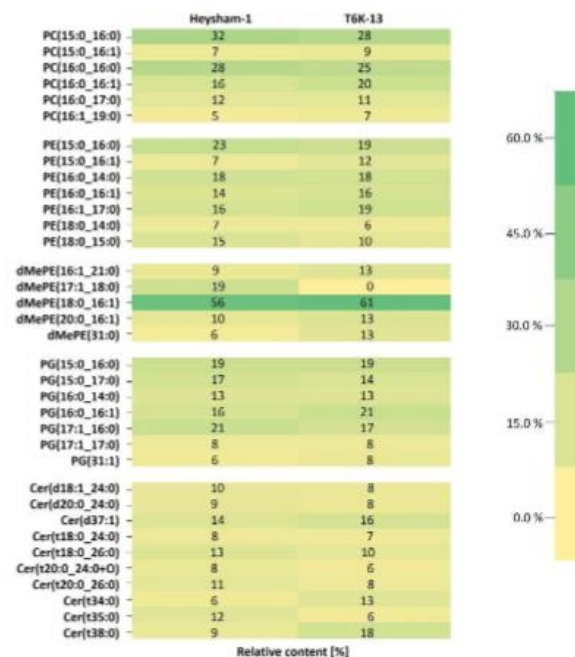


Figure 6. Lipidome heatmap. Relative abundance of the main lipid species of the *L. pneumophila* Heysham-1 strain and the mutant T6-K13 strain. Phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), dimethylphosphatidylethanolamines (dMePE), phosphatidylglycerols (PG), and ceramides (Cer) were analysed by LC-MS/MS in the positive ion mode.

Molecular species PE(15:0_16:0), PE(16:1_17:0), and PE(18:0_15:0) dominated in the PE class. The Heysham-1 strain contained more PE(15:0_16:0) and PE(18:0_15:0) compared with the mutant-type strain.

The analysed strains also synthesized methylated derivatives of PE. The major species in the dMePE class was dMePE(18:0_16:1), which accounted for approx. 60% of all synthesized methylated PE derivatives by these strains. The wild-type strain produced a considerable amount of dMePE(17:1_18:0) (19%), while the T6K-13 mutant had none of this dMePE species.

A comparative analysis of the PG profile showed that the Heysham-1 strain was characterized by a higher content of PG(17:1_16:0) (21%) and PG (15:0_17:0) (17%) compared with the mutant, synthesizing 17% and 14% of these PL species, respectively. TGs were the class with the greatest structural diversity including 112 different TGs, of which TG(18:0_16:0_18:0) and TG(16:0_16:0_16:1) were dominant. The relative content of different species of the lipid class in *L. pneumophila* strains was very similar. However, the mutant-type strain was characterized by a higher production of TG(16:0_16:0_16:0) and TG(18:0_16:0_18:0), compared with the wild-type strain. In contrast, the Heysham-1 strain synthesized approx. 3% more TG(18:1_18:1_18:1) than the T6-K13 strain (Figure S1). The analysed strains synthesized 23 different DGs. In the DG class, these strains were dominated by DG(38:1e) and DG (31:2e) and showed no significant quantitative differences (Figure S2). TGs and DGs had fatty acids with two double bonds in contrast to the other lipid classes. TGs with two double bonds were present in low content, whereas DGs with two double bonds (the DG ether) were abundant. The Heysham-1 and T6K-13 strains produced 10 different ceramides and one oxidized ceramide (t20:0_24:0+O). The mutant-type strain contained twice as much Cer(t34:0) and Cer(t38:0) compared with the wild-type strain. The Heysham-1 strain synthesized more Cer(t20:0_26:0), Cer(t18:0_26:0), and Cer(t35:0) than the mutant-type strain (Figure 6).

2.4. FLIM-FRET Measurements

The resonance excitation energy transfer approach (often referred to as Förster resonance energy transfer FRET) was applied to analyse the interaction of *L. pneumophila* with THP-1-derived macrophages and *A. castellanii* cells. For this purpose, the interacting cells were labeled with fluorescence labels, acting as excitation energy donor and acceptor: *L. pneumophila* with Syto9 (donor) and *A. castellanii* and THP-1-derived macrophages with Nile Blue (acceptor). The fluorescence emission spectrum of the donor and absorption spectrum of the acceptor are presented in Figure S3. An overlap of those spectra (marked in Figure S3) enables the determination of the Förster distance of this donor–acceptor pair ($R_0 = 37 \text{ \AA}$, the distance at which the energy transfer efficiency is 50%). Based on R_0 and measurements of the intensity of fluorescence of the acceptor excited at the wavelengths characteristic of light absorption by the donor, one can evaluate both excitation energy transfer efficiency (E_{FRET}) and inter-fluorophore distance (R) (Figure S3).

Figure 7 presents fluorescence lifetime-based images (FLIM) of *L. pneumophila* strains, *A. castellanii*, and THP-1-derived macrophages. Since the bacteria were labeled with Syto9 and the *A. castellanii* and THP-1 derived macrophages with Nile Blue, for imaging purposes, excitation and emission wavelengths have been selected to enable the effective fluorescence imaging of bacterial and eukaryotic cells. In order to analyse the interaction of *L. pneumophila* strains with *A. castellanii* or THP-1-derived macrophages, the excitation wavelength was set to selectively excite Syto9 (470 nm) but fluorescence was observed at wavelengths representing exclusively light emission using Nile Blue (690/70 nm). An example of such an experiment is shown in Figure 8, presenting the image created based on the efficiency of excitation energy transfer, the distribution of E_{FRET} , and the distribution of inter-fluorophore distances.

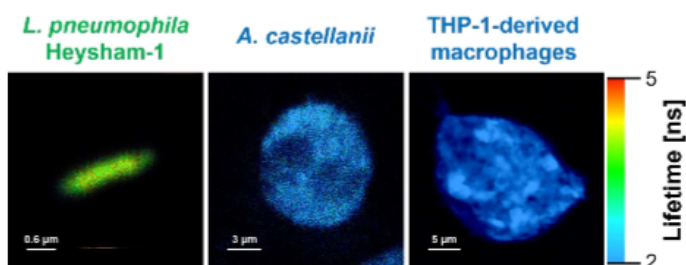


Figure 7. FLIM images of *L. pneumophila* Heysham-1 strain labeled with Syto9 and *A. castellanii* and macrophages labeled with Nile Blue. Two sets of excitations have been applied: 470 nm for *L. pneumophila* Heysham-1 (observation via band pass filter 550/88) and 635 nm for *A. castellanii* and THP-1-derived macrophages (observation via band pass filter 690/70).

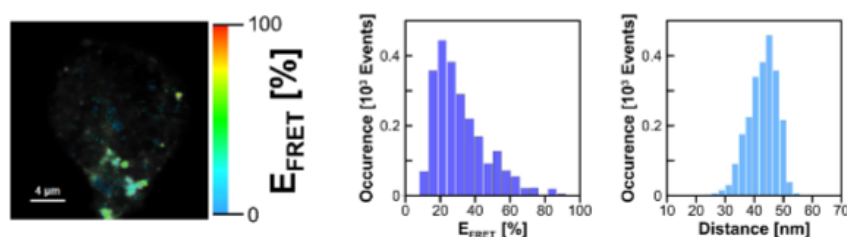


Figure 8. Images illustrating Förster type excitation energy transfer (FRET) between Syto9 immobilized on the surface of *L. pneumophila* cells (Heysham-1) and NB situated within THP-1-derived macrophage. The left panel shows an image based on the efficiency of excitation energy transfer. The middle panel shows a histogram of the distribution of FRET efficiency and the right panel a histogram of the distribution of the calculated donor–acceptor distance. Excitation set at 470 nm.

The FRET image shows an effective interaction of *L. pneumophila* strains with the THP-1 macrophage, with most of the E_{FRET} values being higher than 20%.

Figure 9 presents the comparison of FRET-based images of the *L. pneumophila* Heysham-1 strain interacting with *A. castellanii* and THP-1-derived macrophage. In addition to the wild-type strain, the T6K-13 mutant-type strain with a defect in LPS synthesis and the T24-K6-1 strain with a restored LPS synthesis pathway were examined. In general, the image analysis shows that the bacteria cells interact effectively and are localized preferably in the surface region of both the THP-1-derived macrophage and *A. castellanii* cell. Interestingly, the FRET efficiency was relatively low in the case of the T6K-13 cells interacting with *A. castellanii*, thus indicating that the presence of LPS promotes the *L. pneumophila* interaction with *A. castellanii*. Importantly, the complementant T24-K6-1 strain also presents FRET events characterized by higher E_{FRET} values (>20%). Such an effect strongly supports the conclusion regarding the promoting effect of LPS. In order to further study possible differences in the surface of *L. pneumophila* associated with the presence of LPS, which can influence interaction with other cells and biomembranes, *L. pneumophila* cells were stained with Prodan fluorescence dye, recognized to be highly sensitive to the direct environment, to assess its physicochemical properties, in particular its polarity (Figure 10).

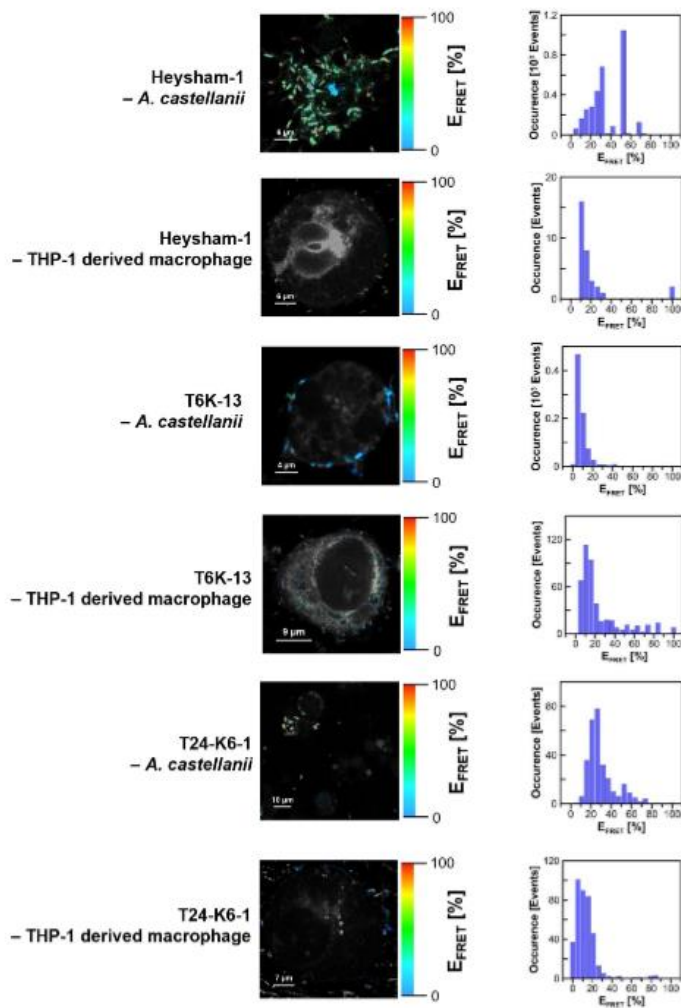


Figure 9. Images illustrating Förster type excitation energy transfer (FRET) between Syto9 immobilized at the surface of *L. pneumophila* cells (Heysham-1, T6-K13, T24-K6-1) and NB situated on *A. castellanii* cells and macrophages. The left panel shows images based on the color-coded efficiency of excitation energy transfer between fluorescence probes situated on *L. pneumophila* and *A. castellanii* or THP-1-derived macrophages (selective excitation of the donor and fluorescence emission of the acceptor). The right panel shows the FRET efficiency histogram representing an analysis of the map shown on the left panel. Excitation set at 470 nm.

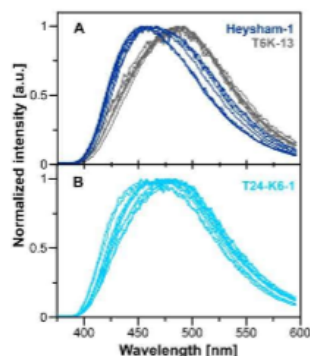


Figure 10. Fluorescence emission spectra of the Prodan molecular probe immobilized at the surface of *L. pneumophila* cells recorded at different locations in the microscopic images of Heysham-1 (dark blue traces), T6K-13 (gray traces) (A) and T24-K6-1 (light blue traces) (B) strains.

The application of fluorescence spectroscopy with sub-microscopic spatial resolution enabled the detection of fluorescence emission spectra of the Prodan molecules immobilized in the surface region of single bacterial cells. The fluorescence emission spectra recorded from the *L. pneumophila* Heysham-1 strain, the T6K-13 mutant-type strain, and the complementant T24-K6-1 strain cell surface are presented in Figure 10. As can be seen, a variety of spectra with the maximum shifted along the wavelength axis were recorded. This is a manifestation that the fluorescence label molecules bind to different locations at the cell surface, characterized by more polar (plotted in gray) or more hydrophobic (plotted in dark blue) environments. Interestingly, such spectral shifts are relatively limited in the case of the T6K-13 mutant-type strain cells. In particular, the hypsochromically shifted spectra, representing the location of Prodan molecules in a more hydrophobic environment, were limited in the case of cells with modified LPS. It is very likely that such an effect is indicative of a general modification of the cell membrane and is not a direct representation of the binding of the fluorophore to LPS. As can be seen, in the case of the complementant cells, the shift distribution of the Prodan emission spectra is restored to some extent (light blue, lower panel).

2.5. LPS Contributes to Host Cell Adherence and Invasion

The adhesion assay revealed that *L. pneumophila* strains bound to host cells differently. The adherence of the T6K-13 mutant-type to THP-1-derived macrophages was decreased by 64% compared with the *L. pneumophila* wild-type phenotype. Complementation restored the ability of the mutant to adhere like that of the wild-type strain. However, in interaction with *A. castellanii* cells, the T6-K13 mutant-type strain showed a 28% improvement in adhesion compared with the wild type (Figure 11A).

To determine whether the mutation in LPS affects the invasion of eukaryotic cells by *L. pneumophila* strains, the ratio of intracellular bacteria to total cell-associated bacteria was determined using differential immunofluorescence staining. The results showed that the invasion of the T6-K13 mutant-type strain was reduced in both host cell types, with an invasion rate of 80% observed in THP-1-derived macrophages and 90% in *A. castellanii* (Figure 11B).

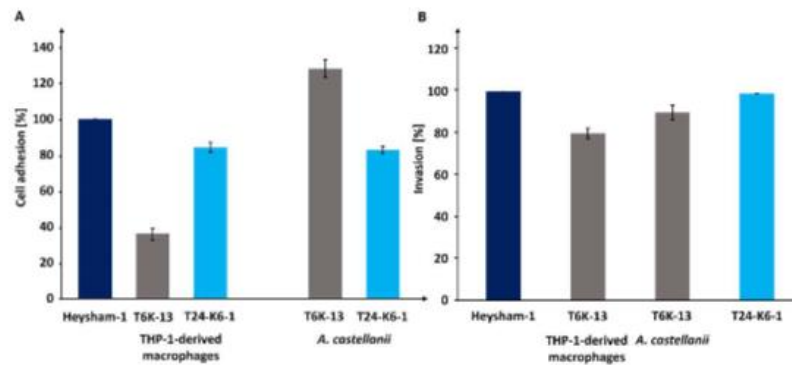


Figure 11. The ability of *L. pneumophila* strains (Heysham-1; T6K-13; T24-K6-1) to adhere to (A) and invade (B) THP-1 derived macrophages and *A. castellanii*.

2.6. The T6-K13 Mutant-Type Exhibits a Higher Replication Efficiency within Host Cells than the Wild-Type Strain

To assess the impact of *L. pneumophila* LPS on intracellular replication, THP-1-derived macrophages and *A. castellanii* cells were infected with the wild-type *L. pneumophila* strain Heysham-1, the mutant-type T6K-13 strain, and the complementant T24-K6-1 strain. In both host cell types, the ability of the mutant-type T6K-13 strain to replicate intracellularly was significantly higher than that of the *L. pneumophila* Heysham-1 strain. In THP-1-derived macrophages, the bacterial load of the mutant strain was approximately 25% higher than that of the wild-type strain (Figure 12A). The mutant-type T6K-13 replicated much more effectively in *A. castellanii* cells compared with the Heysham-1 strain, with the greatest difference observed 72 h post-infection when the mutant-type strain load was almost twice as high as that of the wild-type strain (Figure 12B).

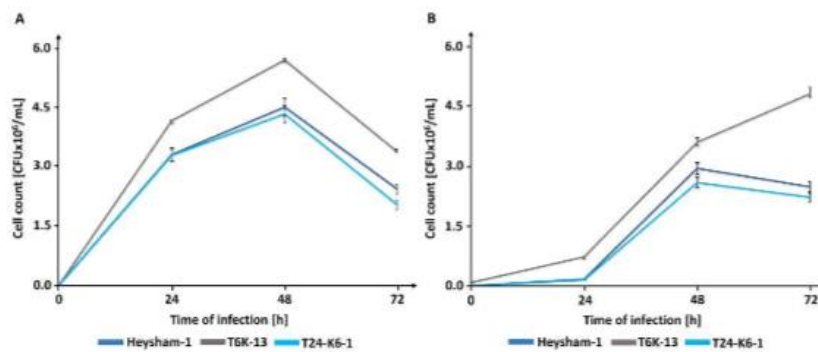


Figure 12. Effect of *L. pneumophila* LPS on the bacterial replication. THP-1-derived macrophages (A) or *A. castellanii* cells (B) were infected with the wild-type *L. pneumophila* strain Heysham-1, the mutant-type T6K-13 strain, or the complementant T24-K6-1 strain.

2.7. The Mutation in the Polysaccharide Region of *L. pneumophila* LPS Results in a More Potent Induction of Proinflammatory Cytokines

The level of pro-inflammatory cytokine induction (IL-6, TNF- α) was measured in the cell culture supernatant of THP-1-derived macrophages stimulated with LPS preparations at concentrations of 500 and 1000 ng/mL for 4 h (TNF- α) and 24 h (IL-6). *L. pneumophila* LPS preparations induced a measurable level of pro-inflammatory cytokines, which were dose-dependent. The level of induced TNF- α under *L. pneumophila* LPS stimulation was significantly higher compared with the induced level of IL-6. The mutant-type strain proved to be a better inducer of both pro-inflammatory cytokines. The LPS of the mutant-type strain T6K-13 at a concentration of 500 ng/mL induced the production of TNF- α about 2 times and at a concentration of 1000 ng/mL about 1.3 times better compared with the *L. pneumophila* Heysham-1 strain. The level of IL-6 released under the influence of the LPS preparation from the mutant-type strain was slightly lower at a concentration of 500 ng/mL and 1000 ng/mL compared with the level of this cytokine released under the influence of LPS isolated from the *L. pneumophila* Heysham-1 strain (Figure 13A,B).

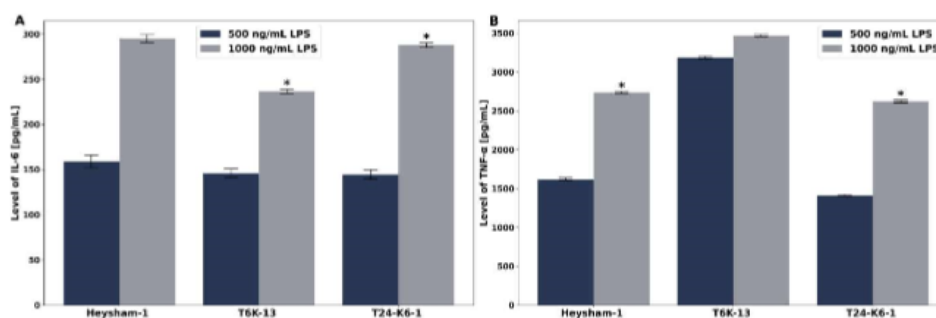


Figure 13. The level of pro-inflammatory cytokines (IL-6) (A) and (TNF- α) (B) in stimulated THP-1-derived macrophages with LPS preparations of the *L. pneumophila* strain Heysham-1, the T6K-13 mutant strain, and the complementant T24-K6-1 strain. Control IL-6, 4.7 pg/mL; TNF- α , 7.14 pg/mL *—statistically significant difference compared to the control sample (Mann-Whitney U test).

3. Discussion

The approach, attachment, and invasion of host cells (macrophages and protozoan cells) are critical steps in the cellular infection cycle of *L. pneumophila* and if the bacterium fails to execute each of these steps correctly, the number of viable intracellular *L. pneumophila* will be diminished. Numerous factors contribute to these processes, including adhesins, proteins of the type IV secretion system, flagellum, pili, enzymes, and LPS, which facilitate the successful colonization and replication of *L. pneumophila* within host cells, ultimately resulting in the pathogenesis of Legionnaires' disease [3,24–26]. A high-molecular-weight, amphiphilic LPS located in the outer membrane of the cell envelope, forming an extracellular hetero-bilayer with lipids, represents one of the contributing factors.

Our previous studies have shown that the length of legionaminic acid polymer (OPS) and its degree of substitution with *O*-acetyl groups determine the ability to adhere to and interact with *A. castellanii* cells [27]. In the next step, we aimed to investigate whether the core region of the *L. pneumophila* polysaccharide determines the interaction with host cells. For this purpose, a mutant interrupted in the ORF7 gene region of the *L. pneumophila* Heysham-1 strain was constructed. A comparative analysis of NMR spectra of the polysaccharide part from the wild-type strain and the mutant revealed differences in the rhamnose residues of the LPS core region. Although NMR analyses of these samples showed no difference in their degree of acetylation, the mutant-type strain exhibited significantly

lower hydrophobicity of its surface compared with the wild-type strain, as confirmed by measuring the degree of polarity using a polarity-sensitive fluorescent dye. This suggests that the mutant is likely lacking an *O*-acetyl group attached to the rhamnose of the core region. The lack of differences in the NMR signals corresponding to the *O*-acetyl group of the core of the wild-type and mutant-type strains may be because the degradation of LPS in the acetate buffer induces the partial migration and partial removal of the *O*-acetyl group from the terminal rhamnosyl group [10].

The presence of *O*-acetyl groups can indirectly influence the control of long-range non-specific electrostatic repulsion experienced by bacteria when approaching negatively charged host cells. The soft surface layer of 8-*O*-acetyl group-bearing mAb3/1 positive *L. pneumophila* strains was significantly less charged and more permeable than those of mAb 3/1 negative strains [28]. Changes in surface charge density can affect the stronger or weaker interaction with eukaryotic cells. The absence of *O*-acetyl groups on rhamnose of *L. pneumophila* LPS may contribute to an increase in the negative surface charge density of bacteria and thus hinder contact with *A. castellanii* cells and macrophages. The proposed mechanism is consistent with the results of excitation energy transfer studies between fluorescent dyes located on the surface of *L. pneumophila* and eukaryotic cells. The Heysham-1 strain exhibited the highest energy transfer efficiency and therefore the strongest interaction, while the T6K-13 mutant showed a weaker interaction. Measurements of the effectiveness of interaction between these bacterial strains and macrophages again indicated stronger interaction with the Heysham-1 strain and weaker interaction with the mutant. However, the interactions of these strains with macrophages were weaker than with amoebae. The next stage of short-range interaction between bacterial and host cells requires ligand–receptor interactions. The attachment of *L. pneumophila* to *A. castellanii* cells may occur through the α 1-3D-mannobiose domain of the mannose-binding receptor located on amoebae. An analysis of signals in the NMR spectra of OPS wild-type and mutant strains indicated a slight difference in the range of mannose signals, suggesting that in the case of the mutant-type strain, mannose may be more accessible and therefore the mutant binds better to *A. castellanii* cells. Adhesion tests showed that the mutant-type strain exhibited a 28% increase in adhesion to *A. castellanii* compared with the wild-type strain. These findings demonstrate that eukaryotic cell surface receptors can interact with the intrinsic sugars of the LPS polysaccharide region and mediate the attachment of *L. pneumophila* to these cells. However, the mutant showed weaker binding to macrophages compared with the wild-type strain, indicating that the OPS degree of *O*-acetylation plays a greater role in adhesion to macrophages than to *A. castellanii* cells. Regardless of the infected cell type, the mutant replicated significantly better compared with the wild-type strain, indicating that the LPS structure primarily determines the early stage of host–cell interaction.

The lipid profile of *L. pneumophila* strain Heysham-1 was highly diverse and included phospholipids as the dominant lipid fraction and neutral lipids and ceramides, including oxidized ceramide. *L. pneumophila* synthesizes ceramides, whose fatty acids are mainly even-carbon, saturated, or monounsaturated, similar to those found in eukaryotic cells. Ceramides are rare in bacterial cells, although their presence has been detected in *L. gormanii*. However, *L. pneumophila* does not synthesize hexosylceramides found in *L. gormanii* cells [29]. Mutation in the LPS biosynthesis of *L. pneumophila* also changed the lipid profile of the Heysham-1 strain. These changes affected various lipid groups, but the most significant difference was observed in ceramides. The mutant-type T6-K24-1 synthesized twice as much Cer(t34:0) and Cer(t38:0) compared with the wild-type strain. In Gram-negative bacteria lacking LPS, such as *Sphingomonas* [30] or *Sorangium* [31], sphingolipids functionally replace this outer membrane component. Bacteria possessing both LPS and sphingolipids in response to abiotic stress (acidity or elevated temperature) synthesize more sphingolipids or ceramides, for example, in the cells of *Acetobacter malorum* [32].

Pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), produced by macrophages, play a crucial role in determining the progression of *L. pneumophila* infection. LPS found in Gram-negative bacteria is one of the most

potent immune system stimulators. However, the LPS of *L. pneumophila* is a much weaker cytokine inducer compared with the highly pyrogenic LPS of *Salmonella* Minnesota [33]. The bioactive component of LPS is lipid A, which exhibits toxicity that is directly influenced by the length and number of fatty acid groups attached to its glycosidic backbone. The presence of long-chain fatty acids in the lipid A of *L. pneumophila* leads to its low endotoxic activity, as it fails to interact with the CD14 receptor and its soluble form. Studies on the *L. pneumophila* strain Heysham-1 strain also confirmed the weak ability of LPS to induce cytokines. However, the mutant defective in the synthesis of the polysaccharide part more strongly induced TNF- α , and slightly less IL-6, compared with the wild-type strain. This suggests that the length of fatty acids in lipid A and the structure of the polysaccharide region of LPS determines its ability to induce cytokines.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Reagents

The solvents chloroform, methanol, phenol, and acetic acid were purchased from Avantor Performance Materials Poland (Gliwice, Poland). Ultrapure water, NH₄formiate, isopropanol, chloroform, acetonitrile, and formic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) in LC/MS grade purity.

4.2. Bacterial Strains and Growth Conditions

L. pneumophila wild-type strain Heysham-1 (ATCC 43107), the mutant-type strain (T6-K13), and the complementant strain (T6-K24-1) were cultured at 37 °C for 3 days on ACES-buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar containing 0.4 mg/mL L-cysteine hydrochloride, 0.25 mg/mL ferric pyrophosphate, and 0.5 mg/mL α -ketoglutarate (Oxoid, Hampshire, UK) [34]. The bacterial mass collected from plates was suspended in 0.5 M NaCl and centrifuged at 8000 rpm for 20 min. The bacterial pellet was washed once with 0.5 M NaCl and once with MQ water. Then, 5 g of lyophilized bacterial mass was used to isolate lipopolysaccharide and 130 mg of lyophilized bacterial mass was used to isolate lipids. The yield of LPS was 1.5% for the Heysham-1 strain and T6-K24-1, and 1.2% for the mutant-type strain. Lipids accounted for 6.8% of the Heysham-1 biomass, 6.6% of the T6-K13 strain, and 7.3% of the complementant strain T6-K24-1.

L. pneumophila strains were cultured in N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered yeast extract broth (BYE) at 37 °C for 24 h. Liquid cultures were used for adhesion, invasion, and infection tests.

4.3. Construction of the *L. pneumophila* Mutant and Complementation

The knock-out mutants of the 'open reading frame 7' (ORF 7), annotated as hypothetical protein on the LPS-biosynthesis locus (GenBank: HE980446) of the Heysham-1 strain, were constructed as described before [35–37]. In brief, the ORF 7 was inactivated by an insertion cassette containing a kanamycin resistance gene (kanR) using a restriction-free cloning approach and natural transformation of *L. pneumophila*.

The kanR cassette was obtained from the pCDP05 plasmid [38] and purified by amplifying the cassette of the plasmid [Supplementary Material Figure S4].

The insertion cassette consists of the kanR cassette flanked by homologous regions of the ORF 7. This cassette was integrated into the genome of the recipient Heysham-1 strain by natural transformation. The Heysham-1 strain was cultivated on BCYE agar for 72 h. Around 10⁸ cells were used to inoculate BYE broth for an o/n culture. From the o/n culture, 200 μ L was used to inoculate 2 mL BYE broth in a plastic round bottom tube (10 mL) which was incubated at 37 °C for 7 h. At an optical density (OD₆₀₀) of 1.0, ~5 ng of purified DNA (MSB spin; Invitex, Berlin, Germany) was added. The DNA was suspended and the tubes were incubated at 30 °C without agitation for 2 days. Then, 500 μ L were plated on BCYE plates with kanamycin (25 μ g/mL) and incubated at 37 °C for 2 days. Colonies were picked and screened using PCR and Sanger sequencing (primer: Camp ORF 5 mid/Corby 7-9do2rc; [Supplementary Materials Tables S1 and S2]).

The sequence-confirmed mutant T6-K13 was screened for an altered LPS structure using monoclonal antibodies of the German National Reference Laboratory for Legionellosis. An indirect ELISA- and immunofluorescence-based screening using the complete mAb-library was performed as described elsewhere [20,37]. Therefore, the strains were cultured for 8 and 24 h to achieve the early exponential growth phase and the post-exponential growth phase.

For the complementation of T6-K13, a plasmid carrying the ORF-7 of Heysham-1 was constructed. Into the pPCR-Script Cam⁺ cloning vector (Agilent, Santa Clara, CA, USA), the purified PCR product (primers LPS ORF 6a uprc/Corby 7–9 uprc) was inserted at the *SrfI* blunt site according to the manufacturer's instruction leading to the plasmid pMPH7_A. This plasmid was transformed into TOP10 chemical competent *E. coli* cells (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Colonies were screened on LB-medium containing ampicillin (100 mg/mL) and chloramphenicol (30 mg/mL). Colonies were screened using the m13 forw/rev primers (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Colonies carrying the plasmid pMPH7_A were grown at 37 °C in LB medium and chloramphenicol (30 mg/mL) until the plasmid was finally extracted using the plasmid DNA purification kit QIAprep Spin (Qiagen, Hilden, Germany). The purified pMPH7_A were transformed into electrocompetent T6-K13 cells as described by Shames [39]. The electroporated cells were cultured in liquid media o/n followed by cultivation on BCYE+chloramphenicol (30 mg/mL) o/n for the selection of complemented cells. Colonies were screened using the m13 primer set. Confirmed complementant T24-K6-1 cells were screened for reactivity with mAbs in order to verify a potential regained LPS structure.

4.4. Cultivation of Eukaryotic Cells

4.4.1. Culture of *Acanthamoeba castellanii*

Trophozoites of *A. castellanii* (strain ATCC 30234 free of intracellular endosymbionts) were cultured in PYG liquid medium (containing 15 g proteose peptone 3,5 g yeast extract, 10 g glucose, 120 mg NaCl, 3 mg MgCl₂ × 6H₂O, 3 mg CaCl₂, 3 mg FeSO₄, 142 mg Na₂HPO₄, 136 mg KH₂PO₄, and water to 1000 mL), at pH 6.6, as described [40]. The culture was kept at 28 °C on a rotary shaker with an acentric rotation of 3 cm (110 rev/min) for 5 days. Trophozoites at 2 × 10⁵ cells/mL density were plated onto 24-well plastic plates (Nunc, Roskilde, Denmark).

4.4.2. Growth and Differentiation of THP-1 Cells

Experiments were performed with the human acute monocytic leukemia cell line THP-1 (ATCC, No TIB-202). THP-1 cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. The cells were seeded in tissue culture plates (Falcon, Bedford, MA, USA) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The culture media, antibiotics, and FBS were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

THP-1 cells were seeded onto 24-well plastic plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at a density of 5 × 10⁵ cells/well in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, and treated with a final concentration of 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for three days to induce maturation toward adherent macrophage-like cells [41]. Subsequently, unattached cells were removed, and after three-time washing, adherent THP-1 cells were cultured in the medium without PMA for three consecutive days with daily fresh medium change (without antibiotics). Shortly before the experiments (adhesion, infection, and invasion tests), the cells from extra wells were counted to calculate the number of bacteria used for infection of one THP-1 cell (MOI, multiplicity of infection). The infective dose was determined using the MTT cell viability assay, as described previously [42]. For the FLIM (fluorescence life-time imaging microscopy) analysis, THP-1 cells were cultured on rounded glass slides placed in wells of 6-well plastic plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and differentiated according to the above protocol.

4.5. In Vitro Cytokine Induction

LPS samples at 500 and 1000 ng/mL were added to the differentiated THP-1 cells. After incubation for 4 h (TNF- α), 24 h (IL-6) at 37 °C, 5% CO₂, cell culture supernatants were collected and frozen immediately at -80 °C for further cytokines determination. TNF- α and IL-6 levels were measured using the ELISA method using commercial kits from Biorbyt (Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. The minimum detectable concentration of TNF- α was 15.6 pg/mL, IL-6—4.69 pg/mL. All experiments were conducted in three independent replicates.

4.6. Statistical Analysis

Values were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments, each with three independent replicates. Results were statistically evaluated using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test and Student t-test (STATISTICA software version 13.3, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). *p* values of ≤ 0.05 were considered to be significant.

4.7. Lipid Isolation and Ultra-High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (UHPLC-MS) Profiling of Lipids

Lipids were extracted from the dry bacterial mass of *L. pneumophila* strains using a Bligh and Dyer method in which the extraction solvent consisted of chloroform/methanol in a ratio of 1:2 (v/v) [43]. The bacterial mass was suspended in 2 mL MQ water and thoroughly mixed. Next, 7.5 mL of a solvent extraction mixture was added and mixing was maintained for 1 h. Further, 2.5 mL chloroform and 2.5 mL water were added to the suspension, and mixing was continued for 30 min. The sample was centrifuged for 10 min at 3700 $\times g$ and 4 °C. The organic layer (lower) was collected and transferred to a glass bottle. A fresh solvent (2.5 mL of chloroform) was added to the remaining phase. The procedure was repeated four times. The combined organic layers were concentrated in a vacuum evaporator until complete dryness and re-suspended in 4 mL chloroform and 4 mL of a mixture containing 1 mL water and 3.75 mL of chloroform:methanol (1:2 v/v). The lipid-containing organic phase obtained by centrifugation (as above) was dried in a stream of nitrogen and stored at -20 °C until further processing.

The lipid samples were dissolved in 6 mg/mL CHCl₃. After vortexing and ultrasonification, centrifugation was performed for 10 min, 14,000 rpm at 4 °C. Then, 100 μ L of the supernatant was transferred to an Lc Vial and dried down in a speed vac concentrator. The dried samples were dissolved in 1 mL 20% B with 10% CHCl₃. Then, 3 μ L of each sample was injected into a Vanquish UPLC system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatographic separation was performed using a C18 Accucore Polar Premium HPLC column (2.1 \times 100 mm, 2.6 μ m, Thermo Scientific) with appropriate precolumn at 55 °C. The mobile phase was A: 60% ACN, 10 mM ammonium formate, 0.1% formic acid, and B: 90% isopropanol, 10 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in ultrapure water. The flow rate was constant at 0.4 mL/min with a gradient starting at 20% B, increased to 100% in 8 min, held isocratic for 7 min, returned to starting conditions, and equilibrated for 2.5 min. The lipids were detected on a Q exactive plus with HESI ionization (Thermo Scientific) operated in the positive ion mode. MS data were acquired over a scan range of 250–1200 *m/z* with full MS resolution of 70,000 and data dependent MS² resolution of 17,500.

Identification and quantification of individual lipid species were performed using LipidSearch 4.2.29 Software from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) on product level (MS/MS fragmentation).

4.8. Isolation, Degradation, and Electrodialysis of the Lipopolysaccharide

4.8.1. Extraction of LPS

The bacterial mass was suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) with 5 mM MgCl₂ and treated sequentially with lysozyme, deoxyribonuclease, ribonuclease, and proteinase K, as previously described [44], and then subjected to LPS isolation using 45% aqueous phenol for 30 min at 68 °C [45]. The crude extract was dialyzed without separation

of the layers in distilled tap water for 3 days until free from phenol and 1 day in distilled water. The high molecular weight LPS was purified using ultracentrifugation ($105,000 \times g$, 4°C , 4 h), and freeze-dried. Next, LPS was washed with 20 mL of an acetone:chloroform (1:1, *v/v*) mixture and dried on air.

4.8.2. Mild Acid Hydrolysis of LPS

LPS samples (Heysham-1 strain 57 mg, T6K-13 38.5 mg, T24-K-6-1 53 mg) were hydrolyzed with 0.1 M acetate buffer, pH 4.4 under a concentration of 10 mg/mL at 100°C for 4 h. Centrifugation ($12,500 \times g$, 30 min, 4°C) was carried out to remove the precipitated lipid A. The supernatant containing the O-polysaccharide was taken into a flask and concentrated in a vacuum evaporator to a volume of approx. 1 mL.

4.8.3. Gel-Permeation Chromatography

The aqueous phase containing O-polysaccharide was fractionated by gel permeation chromatography on a Sephadex G-50 column (6×60 cm, Pharmacia, Stockholm, Sweden) using water as eluent to afford a polysaccharide fraction (PS). The elution was monitored using the phenol-sulfuric acid assay of fractions. The yield of the high molecular weight OPS preparation was 26% for the Heysham-1 strain and T6-K13, and 28% for T24-K-6-1 of the LPS mass subjected to hydrolysis.

4.8.4. Electrodialysis

To remove cations, lipopolysaccharides (c. 10 mg) were electrodialyzed for 24 h (500 mA, 200 V, 40 W) using Bio-Rad (Hercules, CA, USA) electrophoresis apparatus and lyophilized [46].

4.9. NMR Spectroscopy

The LPS samples of *L. pneumophila* were dissolved in 1 mL of 99.0% D_2O , frozen, and lyophilized. The process was repeated twice, and finally, the samples were dissolved in 650 μL of 99.95% D_2O . The 1D (^1H) and 2D (homonuclear COSY, TOCSY, and ROESY and heteronuclear HSQC and HMBC) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 700 MHz spectrometer at 39°C . The mixing time of the ROESY and TOCSY experiments were 0.2, and 0.1 s, respectively. An internal standard of acetone was used to calibrate the chemical shifts (δ_{H} 2.225; δ_{C} 31.45).

All spectra for de-O-acetylated samples (12% ammonia, 60°C , 3 h) were recorded at 39°C .

4.10. Infection Assays with THP-1 Macrophages and *A. castellanii*

Differentiated THP-1 derived macrophages (2×10^5 cells/mL) and *A. castellanii* (2×10^5 cells/mL) were infected with *L. pneumophila* strains (Heysham-1 strain, T6-K13, T24-K-6-1) from the early stationary phase with a MOI 20 for THP-1 macrophages and *A. castellanii* cells for 2 h at 35°C . Next, cells were washed twice with PBS to remove non-adherent bacteria, and gentamicin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h was added to kill bacteria that were not phagocytized by eukaryotic cells. No viable bacteria were detected using direct plating of cell culture supernatants on BCYE agar. The experiment included a one-time exchange of the RPMI 1640 culture fluid supplemented with 10% calf serum, without the addition of antibiotics and liquid PYG medium on each day of the experiment in cultures infected with THP-1-derived macrophages and *A. castellanii* cells, respectively. At the indicated time points (0 h, 24 h, 48 h, 72 h), cells were lysed with 0.01% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany), and then plated on BCYE medium. The infection efficiency was monitored by determining the number of colony-forming units (CFU) of the different *L. pneumophila* strains after plating on BCYE agar and incubation at 37°C for 3 days. Three biological replicates of infected macrophages or *A. castellanii* were performed at each time point.

4.11. Adhesin Test

THP-1 differentiated macrophages or *A. castellanii* at a density of 2×10^5 cells/mL seeded in 24 well plates were pre-incubated with 10 μM cytochalasin B (Merck, Darmstadt,

Germany) for 2 h at 35 °C to block phagocytosis. After this time, *L. pneumophila* strains at a MOI 20 were added to the macrophages or amoeba cells. The infections were synchronized through centrifugation at 300 × *g* for 5 min. After 30 min of co-incubation with THP-1 derived macrophages and *A. castellanii* cells, the monolayers were washed twice with PBS to remove non-adherent bacteria and lysed with 0.01% Triton X-100. Serial dilutions of the inoculum and of *L. pneumophila* strains recovered from lysed cells were plated on BCYE agar. The number of adherent bacteria was enumerated after incubation of BCYE plates for three days at 37 °C. The results were expressed as the ratio of adherent bacteria compared with the inoculum. The adhesion test was performed in three independent experiments.

4.12. Invasion Assay

Before being added to the eukaryotic cells, *L. pneumophila* strains were washed three times by centrifugation (6000 × *g* for 5 min) and stained with 0.3 mM rhodamine B for 25 min (Merck, Darmstadt, Germany). The eukaryotic cells at a density of 2×10^5 cells/mL were infected for 1 h with rhodamine-stained *L. pneumophila* strains. After washing the unbound bacteria twice in PBS, the cells were fixed with 4% PFA overnight at 4 °C. PFA was then removed by washing with PBS containing 50 mM glycine, and the samples were blocked by 10% NHS in SorC-buffer. The extracellular bacteria were labeled with a polyclonal rabbit α-*L. pneumophila* antibody (ab20943) followed by an Alexa Fluor® 488-coupled goat α-rabbit antibody (ab150077) (Abcam, Cambridge, UK).

The process of invasion of THP-1-derived macrophages and *A. castellanii* cells by *L. pneumophila* strains was observed in a confocal laser scanning microscope (Leica DM4000 B, Wetzlar, Germany). For each strain, at least 50 cells with associated bacteria were analysed in three independent experiments, and the ratio of internalized bacteria was calculated.

4.13. Steady-State Spectroscopy

Stationary measurements of the absorption and emission spectra of the donor (Syto9) and acceptor (Nile Blue) energy were performed on a Cary 60 UV-VIS spectrometer and a Cary Eclipse spectrofluorometer, respectively (both from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Based on the recorded spectra of dyes dissolved in physiological fluid, the Förster distance was calculated according to the formula:

$$R_0 = 8.79 \times 10^3 \left[Q_D \kappa^2 n^{-4} J(\lambda) \right]^{-\frac{1}{6}}$$

where Q_D is the fluorescence quantum yield of donor ($Q_D = 0.58$), κ^2 is an orientation factor (here 0.476), n is the refractive index of the medium ($n = 1.33$), and $J(\lambda)$ is the overlap integral:

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$

where $F_D(\lambda)$ denotes donor fluorescence intensity, $\epsilon_A(\lambda)$ is the extinction coefficient of acceptor, and λ is a wavelength. Taking into account the molar decadic extinction coefficient for Nile Blue $18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, the Förster distance (R_0) of Syto9-Nile Blue donor-acceptor pair is 37 Å.

4.13.1. Microscopy Imaging

For the FLIM analysis, *L. pneumophila* cells (Heysham-1, T6K-13, T24-K-6-1) (100 μL of suspension each, $\text{OD}_{600} = 0.2$) in MQ water were incubated with 5 μM Syto9 green fluorescence stain in 50 mM Tris pH 7.0 buffer at 20 °C for up to 20 min (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After centrifugation at 5000 × *g* for 5 min at 22 °C, the bacteria were washed 3 times and resuspended in 100 μL of non-pyrogenic water. Then, 10 μL of Syto9-labeled bacterial suspension was added to Nile Blue (3 μM)-stained *A. castellanii* or macrophages on rounded glass slides and analysed using FLIM microscopy.

The research was carried out on the MicroTime 200 microscopic system from PicoQuant GmbH (Berlin, Germany) enabling the simultaneous measurement of the fluorescence intensity and lifetime. The system was based on the Olympus IX71 microscope (Tokyo, Japan). After excitation with laser light with a wavelength at 470 nm or 635 nm, the fluorescence emission signal was collected using silicone immersed oil objective (Olympus, Tokyo, Japan) with a magnification of 60× and a numerical aperture of 1.3. The selection of these excitation wavelengths was determined by the selection of fluorescent markers serving as energy donor (Syto9) and acceptor (Nile Blue). The scattered light was removed first with a dichroic mirror ZT470/488/640/RPC (AHF analysentechnik, Tübingen, Germany), then, after separation with another dichroic mirror 620 dcxr (AHF analysentechnik, Tübingen, Germany), was directed to two detectors in the form of avalanche photodiodes SPCM-AQRH-TR (Excelitas, Waltham, MA, USA). Prior to each of the detectors, the fluorescent signals were once again filtered for the donor and acceptor channels, respectively, by a 550/88 bandpass filter (Semrock, Rochester, NY, USA) and 690/70 bandpass filter (AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany). The microscope was operated in the confocal mode with a pinhole diameter of 50 μm. The microscope scanned selected areas of studied objects with a constant resolution of 200 × 200 pixels. The dwell time which provided an excellent signal-to-noise ratio for each pixel was set to 0.4 ms. In the measurements, pulsed light was used with a frequency of 20 MHz and intensity of ~50 nW for both lasers. The analysis of the obtained results was performed with the use of dedicated software SymPhoTime v. 2.6 by PicoQuant GmbH (Germany).

The efficiency of the FRET process (E_{FRET}) has been calculated for every pixel of the collected microscopic images and properly calculated from the formula:

$$E_{FRET} = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D} \times 100\%$$

where I_D , I_A —donor and acceptor intensity (background level corrected), respectively, γ —compensation for detector detection efficiency between donor and acceptor channel.

The actual distance (R) between the interacting dyes has been calculated from the formula:

$$R = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}}$$

4.13.2. Microscopy Spectra

L. pneumophila cells (Heysham-1, T6K-13, T24-K-6-1) (100 μL of suspension each, OD₆₀₀ = 0.2) in MQ water were incubated with 0.1 μM prodan at 22 °C for up to 5 min. The microscopic spectra of prodan labeling bacteria were acquired using a spectrograph SR-163 equipped with a Newton 970 EMCCD camera from Andor Technology (Concord, MA, USA) connected to a MicroTime 200 system. For this purpose, excitation at 375 nm and long-pass filter FF01-380LP (Semrock, Rochester, NY, USA) were used. The microscope, similarly to the FRET measurements, worked in the confocal mode. Spectra were collected for several bacteria immobilized on a coverslip using polylysine.

5. Conclusions

The mutant interrupted in the ORF7 region of the *L. pneumophila* strain Heysham-1 LPS biosynthetic gene is likely lacking the *O*-acetyl groups attached to the rhamnose of the OPS core. The absence of these *O*-acetyl groups alters the epitope recognized by the monoclonal antibodies of the Dresden Panel. The *O*-acetyl groups of the core region determine the interaction with *A. castellanii* cells and macrophages at an early stage of establishing contact with host cells. They also contribute to stronger adhesion to macrophage cells. On the other hand, the lack of core *O*-acetyl groups contributed to the exposure of the mannose receptor and the better binding of these bacteria to *A. castellanii* cells. This means that the initial cross-talk between *L. pneumophila* and *A. castellanii* differs from that between *L. pneumophila* and macrophages. The mutant multiplied much better in both amoeba and macrophage

cells, indicating that the O-acetyl groups of the core region determine the early stages of interaction with host cells before entering the target cell. Mutation in the LPS biosynthesis of *L. pneumophila* also resulted in a change in the lipid profile. These changes affected various lipid groups, but the most significant difference was observed in ceramides. The mutant more strongly induced TNF- α , compared with the wild-type strain. This suggests that the structure of the polysaccharide region of LPS as well as PS decorations with non-sugar substituents determines its ability to induce cytokines. The modulation of the O-antigen structure may be one of the mechanisms employed by *Legionella* bacteria to evade the control of the host's immune system.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241914602/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.P.-S.; methodology, M.P.-S., M.P., Z.K., A.S.-C., A.C., R.L. and B.F.; investigation, B.K., M.P., Z.K., A.S.-C., C.E.G., R.L., J.T., B.F. and A.C.; writing—review and editing, M.P.-S., B.K., M.P., Z.K., A.S.-C., R.L., W.I.G., J.T., B.F. and A.C.; supervision, M.P.-S.; funding acquisition, M.P.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the research grant from the National Science Center of Poland (NCN, No. 2017/27/B/NZ6/01544).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Nisar, M.A.; Ross, K.E.; Brown, M.H.; Bentham, R.; Whiley, H. *Legionella pneumophila* and protozoan hosts: Implications for the control of hospital and potable water systems. *Pathogens* **2020**, *4*, 286. [\[CrossRef\]](#)
- Mondino, S.; Schmidt, S.; Rolando, M.; Escoll, P.; Gomez-Valero, L.; Buchrieser, C. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2020**, *15*, 439–466. [\[CrossRef\]](#)
- Chauhan, D.; Shames, S.R. Pathogenicity and virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. *Virulence* **2021**, *1*, 1122–1144. [\[CrossRef\]](#)
- Parte, A.C.; Sardà Carbasse, J.; Meier-Kolthoff, J.P.; Reimer, L.C.; Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 5607–5612. [\[CrossRef\]](#)
- European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In *ECDC. Annual Epidemiological Report for 2019*; ECDC: Stockholm, Sweden, 2021; pp. 1–10.
- Chahin, A.; Opal, S.M. Severe pneumonia caused by *Legionella pneumophila*: Differential diagnosis and therapeutic considerations. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2017**, *1*, 111–121. [\[CrossRef\]](#)
- Arrigo, I.; Galia, E.; Fasciana, T.; Diquattro, O.; Tricoli, M.R.; Serra, N.; Palermo, M.; Giammanco, A. Four-Year Environmental Surveillance Program of *Legionella* spp. in One of Palermo's Largest Hospitals. *Microorganisms* **2022**, *10*, 764. [\[CrossRef\]](#)
- Fasciana, T.; Mascarella, C.; Distefano, S.A.; Calà, C.; Capra, G.; Rampulla, A.; Di Carlo, P.; Palermo, M.; Giammanco, A. Cluster of Legionnaires' Disease in an Italian Prison. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2062. [\[CrossRef\]](#)
- Moll, H.; Sonesson, A.; Jantzen, E.; Marre, R.; Zähringer, U. Identification of 27-oxo-octacosanoic acid and heptacosane-1,27-dioic acid in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *97*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
- Zähringer, U.; Knirel, Y.A.; Lindner, B.; Helbig, J.H.; Sonesson, A.; Marre, R.; Rietschel, E.T. The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): Chemical structure and biological significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1995**, *392*, 113–139.
- Knirel, Y.A.; Moll, H.; Zähringer, U. Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **1996**, *293*, 223–234. [\[CrossRef\]](#)
- Moll, H.; Knirel, Y.A.; Helbig, J.H.; Zähringer, U. Identification of an alpha-D-Manp-(1→8)-Kdo disaccharide in the inner core region and the structure of the complete core region of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **1997**, *1*, 91–95. [\[CrossRef\]](#)
- Knirel, Y.A.; Rietschel, E.T.; Marre, R.; Zähringer, U. The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 239–245. [\[CrossRef\]](#)

14. Helbig, J.H.; Bernander, S.; Castellani Pastoris, M.; Etienne, J.; Gaia, V.; Lauwers, S.; Lindsay, D.; Lück, P.C.; Marques, T.; Mentula, S.; et al. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**, *10*, 710–716.
15. Kooistra, O.; Lüneberg, E.; Lindner, B.; Knirel, Y.A.; Frosch, M.; Zähringer, U. Complex O-acetylation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-O-acetylation of legionaminic acid. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7630–7640. [[CrossRef](#)]
16. Petzold, M.; Thürmer, A.; Menzel, S.; Mouton, J.W.; Heuner, K.; Lück, C. A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 198. [[CrossRef](#)]
17. Wee, B.A.; Alves, J.; Lindsay, D.S.J.; Klatt, A.-B.; Sargison, F.A.; Cameron, R.L.; Pickering, A.; Gorzynski, J.; Corander, J.; Marttinen, P.; et al. Population analysis of *Legionella pneumophila* reveals a basis for resistance to complement-mediated killing. *Nat. Commun.* **2021**, *1*, 7165. [[CrossRef](#)]
18. Jiang, L.; Amemura-Maekawa, J.; Ren, H.; Li, Y.; Sakata, M.; Zhou, H.; Murai, M.; Chang, B.; Ohnishi, M.; Qin, T. Distribution of *lag-1* alleles, ORF7, and ORF8 genes of lipopolysaccharide and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan and China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 274. [[CrossRef](#)]
19. Jepras, R.L.; Fitzgeorge, R.B.; Baskerville, A. A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J. Hyg.* **1985**, *95*, 29–38. [[CrossRef](#)]
20. Helbig, J.H.; Kurtz, J.B.; Pastoris, M.C.; Pelaz, C.; Lück, P.C. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: Possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *11*, 2841–2845. [[CrossRef](#)]
21. Knirel, Y.A.; Helbig, J.H.; Zähringer, U. Structure of a decasaccharide isolated by mild acid degradation and dephosphorylation of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49271. *Carbohydr. Res.* **1996**, *283*, 129–139. [[CrossRef](#)]
22. Knirel, Y.A.; Moll, H.; Helbig, J.H.; Zähringer, U. Chemical characterization of a new 5,7-diamino-3,5,7,9-tetraoxynonulosonic acid released by mild acid hydrolysis of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 77–79. [[CrossRef](#)]
23. Edebrink, P.; Jansson, P.-E.; Bøgwald, J.; Hoffman, J. Structural studies of the *Vibrio salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **1996**, *287*, 225–245. [[CrossRef](#)]
24. Stone, B.J.; Kwaik, Y.A. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: Identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* **1998**, *4*, 1768–1775. [[CrossRef](#)]
25. Aragon, V.; Kurtz, S.; Flieger, A.; Neumeister, B.; Cianciotto, N.P. Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 1855–1863. [[CrossRef](#)]
26. Aragon, V.; Rossier, O.; Cianciotto, N.P. *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **2002**, *148*, 2223–2231. [[CrossRef](#)]
27. Palusinska-Szys, M.; Luchowski, R.; Gruszecki, W.L.; Choma, A.; Szuster-Ciesielska, A.; Lück, C.; Petzold, M.; Sroka-Bartnicka, A.; Kowalczyk, B. The role of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide in host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2890. [[CrossRef](#)]
28. Gosselin, F.; Duval, J.F.L.; Simonet, J.; Ginevra, C.; Gaboriaud, F.; Jarraud, S.; Mathieu, L. Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of *Legionella pneumophila* sg1: An issue to explain infection potential? *Colloids Surf. B* **2011**, *82*, 283–290. [[CrossRef](#)]
29. Chmiel, E.; Galuska, C.E.; Koper, P.; Kowalczyk, B.; Urbanik-Sypniewska, T.; Palusinska-Szys, M.; Fuchs, B. Unusual lipid components of *Legionella gormanii* membranes. *Metabolites* **2022**, *12*, 418. [[CrossRef](#)]
30. Kawasaki, S.; Moriguchi, R.; Sekiya, K.; Nakai, T.; Ono, E.; Kume, K.; Kawahara, K. The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **1994**, *2*, 284–290. [[CrossRef](#)]
31. Keck, M.; Gisch, N.; Moll, H.; Vorhölder, F.J.; Gerth, K.; Kahmann, U.; Lissel, M.; Lindner, B.; Niehaus, K.; Holst, O. Unusual outer membrane lipid composition of the gram-negative, lipopolysaccharide-lacking myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biol. Chem.* **2011**, *15*, 12850–12859. [[CrossRef](#)]
32. Ogawa, S.; Tachimoto, H.; Kaga, T. Elevation of ceramide in *Acetobacter malorum* S24 by low pH stress and high temperature stress. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *109*, 32–36. [[CrossRef](#)]
33. Neumeister, B.; Faigle, M.; Sommer, M.; Zähringer, U.; Stelter, F.; Menzel, R.; Schütt, C.; Northoff, H. Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infect. Immun.* **1998**, *9*, 4151–4157. [[CrossRef](#)]
34. Feeley, J.C.; Gibson, R.J.; Gorman, G.W.; Langford, N.C.; Rasheed, J.K.; Mackel, D.C.; Baineet, W.B. Charcoal-yeast extract agar: Primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **1979**, *10*, 437–441. [[CrossRef](#)]
35. Unger, T.; Jacobovitch, Y.; Dantes, A.; Bernheim, R.; Peleg, Y. Applications of Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 34–44. [[CrossRef](#)]
36. Schunder, E.; Gillmaier, N.; Kutzner, E.; Eisenreich, W.; Herrmann, V.; Lautner, M.; Heuner, K. Amino acid uptake and metabolism of *Legionella pneumophila* hosted by *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *30*, 21040–21054. [[CrossRef](#)]
37. Buchrieser, C.; Hilbi, H. *Legionella: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 1st ed.; Humana Press: Clifton, NJ, USA, 2013; pp. 183–195.

38. Pope, C.D.; Dhand, L.; Cianciotto, N.P. Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* with mini-Tn10. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *124*, 107–111. [[CrossRef](#)]
39. Shames, S.R. Screening targeted *Legionella pneumophila* mutant libraries in vivo using INSeq methods. *Mol. Biol.* **2019**, *1921*, 123–144.
40. Band, R.N. Nutritional and related biological studies on the free-living soil amoeba, *Hartmannella rhyodes*. *J. Gen. Microbiol.* **1959**, *21*, 80–95. [[CrossRef](#)]
41. Daigneault, M.; Preston, J.A.; Marriott, H.M.; Whyte, M.K.B.; Dockrell, D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8668. [[CrossRef](#)]
42. Palusińska-Szyszk, M.; Szuster-Ciesielska, A.; Janczarek, M.; Wdowiak-Wróbel, S.; Schiller, J.; Reszczyńska, E.; Gruszecki, W.L.; Fuchs, B. Genetic diversity of *Legionella* *pcs* and *pmtA* genes and the effect of utilization of choline by *Legionella* spp. on induction of proinflammatory cytokines. *Pathog. Dis.* **2019**, *7*, ftz065. [[CrossRef](#)]
43. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [[CrossRef](#)]
44. Palusińska-Szyszk, M.; Zdybicka-Barabas, A.; Luchowski, R.; Reszczyńska, E.; Śmialek, J.; Mak, P.; Gruszecki, W.L.; Cytryńska, M. Choline supplementation sensitizes *Legionella dumoffii* to *Galleria mellonella* apolipoprotein III. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5818. [[CrossRef](#)]
45. Westphal, O.; Jann, K. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 83–91.
46. Galanos, C.; Lüderitz, O. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *54*, 60310. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Naukowe *Curriculum vitae*

DANE PERSONALNE:

Imię i nazwisko: **Bożena Kowalczyk**

Adres zamieszkania: ul. Niecała 12/49, 20-080 Lublin

Data i miejsce urodzenia: 30.10.1995

e-mail: bozena.kowalczyk@mail.umcs.pl

Telefon: 793 728 363

EDUKACJA:

2011 - 2014

I Liceum Ogólnokształcące im. Tadeusza Kościuszki we Włodawie, klasa o profilu biologiczno-chemicznym.

2014 – 2017

Uniwersytet Marii Curie - Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii: kierunek biotechnologia (3 - letnie studia licencjackie, stacjonarne). Praca licencjacka pt. „Historia i konsekwencje stosowania pestycydu DDT” wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej pod kierunkiem dr hab. Jolanty Jaroszuk-Ścisiel, prof. UMCS, obroniona z oceną bardzo dobrą.

2017 – 2019

Uniwersytet Marii Curie - Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych: kierunek biotechnologia, specjalność biotechnologia medyczna (2 - letnie studia magisterskie, stacjonarne). Praca magisterska pt. „Oddziaływanie szczepów dzikich i mutantów defektywnych w syntezie lipopolisacharydu *Legionella pneumophila* z komórkami gospodarza” wykonana w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii pod kierunkiem dr hab. Marty Palusińskiej-Szys, prof. UMCS, obroniona z oceną bardzo dobrą.

2019 – obecnie

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Marii Curie - Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych: dyscyplina nauki przyrodnicze (4 - letnie studia doktoranckie, stacjonarne). Praca doktorska realizowana w ramach projektu naukowego NCN nr 2017/27/B/NZ6/1544 pt. „Bakteryjne determinanty zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* sg 1” wykonywana w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii pod kierunkiem dr hab. Marty Palusińskiej-Szys, prof. UMCS.

PRAKTYKI ZAWODOWE:**1-31.07.2022**

Praca w ramach badawczego projektu wdrożeniowego realizowanego przez Dział Badań i Rozwoju BioMaxima SA, prowadzący badania w kierunku opracowania nowatorskiej technologicznie metody otrzymywania testów gradientowych do oznaczania wrażliwości na antybiotyki (MIC).

1-31.10.2023

Staż w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie pod opieką dr n. med. Michała Zarobkiewicza. Prowadzenie badań dotyczących aktywacji, proliferacji i indukcji cytokin wytwarzanych przez limfocyty T $\gamma\delta$ pod wpływem stymulacji lizatami *Legionella* spp.

1.11.2023 – 31.01.2024

Praca w Centrum Ecotech-Complex na stanowisku referenta w grupie pracowników naukowo-technicznych.

Szkolenia on-line:

1. Elektrochemiczne metody oznaczania pierwiastków na analizatorze laboratoryjnym Eca Flow firmy Istran. MS Spectrum, 18.02.2021.
2. HR-CS-AAS wysokorozdzielczy spektrometr absorpcji atomowej z ciągłym źródłem - zalety jednej lampy. MS Spektrum, 19.08.2021.
3. Innowacja w spektrofotometrii UV-Vis. Pomiar cieczy bez użycia kuwet. MS Spektrum, 05.08.2021.

4. Analiza zaolejania rzepaku techniką NMR. MS Spektrum, 03.08.2021.
5. Różne zastosowania spektroskopii molekularnej w badaniach naukowych. MS Spektrum, 02.12.2020.
6. Nabiurkowy NMR - prawdziwe narzędzie czy zabawka? MS Spektrum, 03.02.2022.
7. Analiza TOC (OWO) metodą wysokotemperaturową oraz z UV z wykorzystaniem analizatorów z serii multi NC. MS Spektrum, 10.02.2022.
8. Przygotowanie próbek do badań pozostałości pestycydów. MS Spektrum, 17.02.2022.

PUBLIKACJE

1. **Kowalczyk B.**, Petzold M., Kaczyński Z., Szuster-Ciesielska A., Luchowski R., Gruszecki W. I., Fuchs B., Galuska Ch. E., Adam Ch., Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. 2023. Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 facilitates interaction with host cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 14602. doi: 10.3390/ijms241914602.
2. Pastuszak K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Luchowski R., Gruszecki W. I., Jurak M., Palusińska-Szys M. 2023. Insight into the mechanism of interactions between the LL-37 peptide and model membranes of *Legionella gormanii* bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12039. doi: 10.3390/ijms241512039.
3. Pastuszak K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Jurak M., Palusińska-Szys M. 2023. Influence of the antimicrobial LL-37 peptide on *Legionella dumoffii* phospholipids adsorbed at the air–liquid interface. *Sustainability.* 8, 6670. doi: 10.3390/su15086670.
4. Pastuszak K., Chmiel E., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Jurak M., Palusińska-Szys M. 2023. Physicochemical characteristics of model membranes composed of *Legionella gormanii* lipids. *Membranes.* 3, 356. doi: 10.3390/membranes13030356.
5. Chmiel E., Galuska C.E., Koper P., **Kowalczyk B.**, Urbanik-Sypniewska T., Palusińska-Szys M., Fuchs B. 2022. Unusual lipid components of *Legionella gormanii* membranes. *Metabolites.* 5, 418. doi: 10.3390/metabo12050418.
6. **Kowalczyk B.**, Chmiel E., Palusińska-Szys M. 2021. The role of lipids in *Legionella*-host interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 1487. doi: 10.3390/ijms22031487.
7. Woźczańska A., Christie W.W., Fuchs B., Galuska C.E., **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. 2021. Fatty acid composition and lipid profiles as chemotaxonomic markers of phytopathogenic fungi *Puccinia malvacearum* and *P. glechomatis*. *Fungal Biol.* 11, 869-878. doi: 10.1016/j.funbio.2021.05.008.

8. **Kowalczyk B.**, Małek A., Palusińska-Szys M. 2021. Budowa IV systemu sekrecji *Legionella pneumophila* i jego znaczenie w patogenezie. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1, 548-562. doi: 10.2478/ahem-2021-0023.
9. Małek A., **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. 2021. Budowa i znaczenie II systemu sekrecji białek w ekologii i patogenezie *Legionella*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1, 584-598. doi: 10.2478/ahem-2021-0034.
10. Palusińska-Szys M., Luchowski R., Gruszecki W.I., Choma A., Szuster-Ciesielska A., Lück C., Petzold M., Sroka-Bartnicka A., **Kowalczyk B.** 2019. The role of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide in host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 10, 2890. doi: 10.3389/fmicb.2019.02890.

ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH

1. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. 2023. Atypical pneumonia pathogens. Chapter 83. *Manual of childhood infections: The Blue Book* (5 edn). Oxford University Press (UK), Mike Sharland Ed. (rozdział w monografii w druku).
2. **Kowalczyk B.**, Pawlik K., Tarasiuk J. 2022. Nowotwory piersi – zachorowalność, patogeneza oraz główne czynniki ryzyka choroby. Patogeneza i terapie chorób nowotworowych, *Wydawnictwo Naukowe TYGIEL*, Lublin. 15-39. ISBN 978-83-67104-25-8.
3. **Kowalczyk B.**, Sokołowski W., Włodarczyk K., Palusińska-Szys M. 2021. Lipidy jako cenne markery chemotaksonomiczne fitopatogennych grzybów z rodzaju *Puccinia*. Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa, Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt, *Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie*, Lublin. 71-77. doi: 10.24326/mon.2021.10.
4. Sokołowski W., **Kowalczyk B.**, Włodarczyk K., Wdowiak-Wróbel S., Marek-Kozaczuk M. 2021. Możliwości wykorzystania bakterii z rodzaju *Methylobacterium* w zrównoważonej uprawie roślin. Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa, Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt, *Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie*, Lublin. 116-122. doi: 10.24326/mon.2021.10.
5. Włodarczyk K., Sokołowski W., **Kowalczyk B.** 2021. Rizobiowe czynniki Nod i ich interakcje z roślinnymi mechanizmami obronnymi. Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa, Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt, *Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie*, Lublin. 122-128. doi: 10.24326/mon.2021.10.

6. **Kowalczyk B.**, Józefczak A., Małek A., Palusińska-Szys M. 2020. Legionelloza związana z podróżami – narastający problem epidemiologiczny. Wyzwania współczesnej medycyny i nauk pokrewnych – analiza, diagnostyka i leczenie, *Wydawnictwo Naukowe TYGIEL*, Lublin. 67-84. ISBN 978-83-66489-02-8.
7. Małek A., Józefczak A., **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. 2020. Tularemia – realne zagrożenie. Wyzwania współczesnej medycyny i nauk pokrewnych – analiza, diagnostyka i leczenie, *Wydawnictwo Naukowe TYGIEL*, Lublin. 15-27. ISBN 978-83-66489-02-8.
8. **Kowalczyk B.**, Małek A., Józefczak A., Palusińska-Szys M. 2019. Diagnostyka pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym. Wybrane zagadnienia z zakresu mikrobiologii, *Wydawnictwo Naukowe TYGIEL*, Lublin. 105-128. ISBN 978-83-65932-84-6.
9. Małek A., Józefczak A., **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. 2019. Rola mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka w zdrowiu i w chorobie. Problematyka z zakresu medycyny i nauk pokrewnych – przegląd i badania. Tom 2, *Wydawnictwo Naukowe TYGIEL*, Lublin. 187-207. ISBN 978-83-65932-97-6.

UDZIAŁ W KONFERENCJACH

A) KRAJOWYCH

1. Tarasiuk J., **Kowalczyk B.**, Pastuszak K., Palusińska-Szys M. Analiza lipidowych mediatorów zapalnych w tkance płucnej myszy zainfekowanej *Legionella pneumophila*, Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk Ścisłych i Przyrodniczych BIO-IDEA 4.0, 03.02.2024, Lublin. (poster).
2. Pastuszak K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Jurak M., Palusińska-Szys M. Wpływ składu fosfolipidowego na oddziaływania w modelowych błonach bakterii *Legionella gormanii*, X Konferencja Naukowa „Innowacje w Praktyce”, 15-16.06.2023, Lublin. (wystąpienie ustne).
3. Pastuszak K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Jurak M., Palusińska-Szys M. Badanie wpływu przeciwbakteryjnego LL-37 na zachowanie fosfolipidów wyizolowanych z bakterii *Legionella dumoffii*, X Konferencja Naukowa „Innowacje w Praktyce”, 15-16.06.2023, Lublin. (poster).

4. Tarasiuk J., **Kowalczyk B.**, Pastuszek K., Włodarczyk K., Jurak M., Palusińska-Szys M. Charakterystyka lipidomu *Legionella longbeachae*, VII Ogólnopolska Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa „MICROBS”, 02.06.2023, Lublin. (wystąpienie ustne).
5. Włodarczyk K., **Kowalczyk B.** Zróżnicowanie genetyczne sekwencji genów *nodZ* i *nodC* endofitów *Chamaecytisus albus*, Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o życiu BIOOPEN, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 07.04.2022, Łódź. (wystąpienie ustne).
6. Jurak M., Pastuszek K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. Charakterystyka modelowych błon fosfolipidów wyizolowanych z bakterii *Legionella gormanii*, 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 12.09.2022, Lublin. (wystąpienie ustne).
7. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. Wpływ mutacji w genie odpowiedzialnym za acetylację lipopolisacharydu na profil lipidów obojętnych oraz fosfolipidów *Legionella pneumophila*, II Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Biologicznych BIO-IDEA 2021, 15.05.2021, Lublin. (wystąpienie ustne).
8. **Kowalczyk B.**, Pawlik K., Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. Hopanoidy – jako marker diagnostyczny komórek *Legionella fallonii*, 54. Konferencja Mikrobiologiczna, Mikroorganizmy różnych środowisk, 21.09.2021, Lublin. (wystąpienie ustne).
9. **Kowalczyk B.**, Sokołowski W., Włodarczyk K., Palusińska-Szys M. Znaczenie składników lipidowych teliospor *Puccinia glechomatis* i *P. malvacearum* w inwazji roślinnego gospodarza, Ogólnopolska Konferencja Doktorantów „Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt”, 15.04.2021, Lublin. (wystąpienie ustne wyróżnione).
10. Włodarczyk K., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Wdowiak-Wróbel S., Sokołowski W., **Kowalczyk B.** Charakterystyka metaboliczna endosymbiontów szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*), Ogólnopolska Konferencja Doktorantów „Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt”, 15.04.2021, Lublin. (wystąpienie ustne nagrodzone).
11. Sokołowski W., **Kowalczyk B.**, Włodarczyk K., Wdowiak-Wróbel S., Marek-Kozaczuk M. Endofity bakteryjne koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) – ocena wybranych właściwości promujących wzrost i rozwój roślin, Ogólnopolska Konferencja Doktorantów „Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt”, 15.04.2021, Lublin. (wystąpienie ustne).

12. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. Legionelloza – narastający problem epidemiologiczny, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Wyzwania i problemy nauk biomedycznych, 21.01.2021, Lublin. (wystąpienie ustne).
13. **Kowalczyk B.**, Szuster-Ciesielska A., Palusińska-Szys M. Wpływ lipopolisacharydu *Legionella pneumophila* na proces adhezji oraz infekcji makrofagów, VII Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne Eskulap, 28-29.11.2020, Lublin. (wystąpienie ustne).
14. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M., Oddziaływanie *Legionella pneumophila* serogrupa 1 z komórkami gospodarza, Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców: Nowe trendy w badaniach naukowych – wystąpienie młodego naukowca, CreativeTime, 20-21.06.2020, Kraków. (wystąpienie ustne).
15. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. Znaczenie struktur powierzchniowych *Legionella pneumophila* w oddziaływaniu z komórkami gospodarza, I Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Biologicznych BIO-IDEA 2020, 06.07.2020, Lublin. (wystąpienie ustne).
16. Wołczańska A., Wdowiak-Wróbel S., Małek A., Józefczak A., **Kowalczyk B.**, Mamacz M., Palusińska-Szys M. Analiza porównawcza kwasów tłuszczowych w zarodnikach dwudomowego gatunku *Gymnosporangium sabinae*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy różnych środowisk”, 27-28.06.2019, Lublin. (poster).
17. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szys M. Rola syntazy fosfatydylocholiny *Legionella* w oddziaływaniu z komórką gospodarza, IV Konferencja Naukowa ENZYMOŚ „Enzymy w nauce i przemyśle”, 17.11.2018, Lublin. (wystąpienie ustne).

B) MIĘDZYNARODOWYCH

1. Jurak M., Pastuszak K., Wiącek A.E., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. Comparison of model bacterial membranes of selected *Legionella* species, Twenty-First Young Researchers' Conference - Materials Science and Engineering, 29.11.-01.12.2023, Belgrad. (wystąpienie ustne wyróżnione).
2. Jurak M., Wiącek A.E., Pastuszak K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. Bacterial membrane-disrupting mechanism due to antimicrobial LL-37 peptide action, II International Conference on Polymer Science and Engineering, 30-31.10.2023, San Francisco. (wystąpienie ustne).

3. **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Fuchs B., Galuska Ch. E., Pastuszak K., Jurak M., Palusińska-Szys M. *Legionella pneumophila* ceramides as an example of bacterial molecular mimicry, Intercollegiate Biotechnology Symposium Symbioza, 12–14.05.2023, Warszawa. (wystąpienie ustne).
4. Jurak M., Pastuszak K., **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Palusińska-Szys M. Effect of the LL-37 peptide on the behaviour of *Legionella gormanii* phospholipid membranes, International Symposium on Surfactants in Solution, 11-16.09.2022, Lublin. (wystąpienie ustne).
5. **Kowalczyk B.**, Pastuszak K., Jurak M., Palusińska-Szys M. Antimicrobial activity of the LL-37 peptide as a result of interaction with *Legionella gormanii* phospholipids, The Summer School for PhD Students, Modern Research Techniques for Physicochemical Characterization of the Potential Application Systems, 18-20.05.2022, Lublin. (wystąpienie ustne).
6. **Kowalczyk B.**, Pastuszak K., Tarasiuk J., Jurak M., Palusińska-Szys M. Physicochemical characteristics of the *Legionella gormanii* lipids, The Summer School for PhD Students, Modern Research Techniques for Physicochemical Characterization of the Potential Application Systems, 18-20.05.2022, Lublin. (poster).
7. Sokołowski W., Wdowiak-Wróbel S., Marek-Kozaczuk M., Kalita M., **Kowalczyk B.** Potential role of endophytic *Methylobacterium* strains in heavy metal phytoremediation, I International Phd Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin: Environment-Plant-Animal-Product (ICDSUPL), Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 26.04.2022, Lublin. (wystąpienie ustne).
8. Włodarczyk K., **Kowalczyk B.** The sequence diversity of symbiotic genes of *Chamaecytisus albus* endophytes, National Scientific Conference „e-Factory of Science" VII edition, 09.04.2022, Łódź. (wystąpienie ustne).
9. **Kowalczyk B.**, Sokołowski W., Szuster-Ciesielska A., Palusińska-Szys M. Interaction of *Legionella pneumophila* strains with human macrophages, XVI International Scientific Conference for Students and PhD Students, Youth and progress of biology, Lwowski Uniwersytet Narodowy im. Iwana Franki, Wydział Biologii, 27-29.04.2020, Lwów. (wystąpienie ustne).
10. Sokołowski W., Włodarczyk K., **Kowalczyk B.** Biodiversity appraisal of *Methylobacterium* strains isolated from root nodules of *Fabaceae* plants with the REP-PCR method, XVI International Scientific Conference for Students and PhD Students,

Youth and progress of biology, Lwowski Uniwersytet Narodowy im. Iwana Franki, Wydział Biologii, 27-29.04.2020, Lwów. (wystąpienie ustne).

UDZIAŁ W GRANTACH NAUKOWYCH:

1. „Bakteryjne determinanty zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* serotyp 1” NCN 2017/27/B/NZ6/1544, wykonawca (2017-2024).
2. „Badanie przeciwbakteryjnego działania ludzkiego peptydu LL-37 na modelu *Legionella gormanii*”. Kierownik projektu badawczego, finansowanego przez Instytut Nauk Biologicznych UMCS (projekty dla młodych naukowców, edycja 2021/2022). Część projektu realizowana w Laboratorium Badań Warstw Powierzchniowych w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych Instytutu Nauk Chemicznych UMCS (2021).
3. „Charakterystyka białek zewnętrznej i wewnętrznej membrany ściany komórkowej *Legionella micdadei*”. Kierownik projektu badawczego, finansowanego przez Instytut Nauk Biologicznych UMCS (projekty dla młodych naukowców, edycja 2022/2023) (2022).

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA:

1. Stypendium Rektora dla najlepszych studentów na drugim i trzecim roku studiów licencjackich (stypendium przyznane odpowiednio w grudniu 2016 i w grudniu 2017).
2. Stypendium z Własnego Funduszu Stypendialnego decyzją Jego Magnificencji Rektora UMCS na pierwszym i drugim roku w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych (edycja 2020/2021 oraz 2021/2022).

PRACE NA RZECZ UCZELNI:

1. **Kowalczyk B.**, Kozierowicz W., Krzywonos P., Palusińska-Szys M. Udział w X edycji Nocy Biologów w dniu 08.01.2021, prowadzenie zajęć pt. Czy szczepionki są (nie)korzystne?
2. **Kowalczyk B.**, Małek A., Józefczak A., Palusińska-Szys M. Udział w IX edycji Nocy Biologów w dniu 10.01.2020, prowadzenie zajęć pt. Mikrobiom jelitowy - nasz wróg czy sprzymierzeniec?

3. **Kowalczyk B.**, Małek A., Józefczak A., Palusińska-Szysz M. Udział w VIII edycji Nocy Biologów w dniu 11.01.2019, prowadzenie zajęć pt. Prawidłowa mikroflora jelitowa gwarancją zdrowia człowieka.
4. **Kowalczyk B.** Udział w przygotowaniu i przeprowadzeniu akcji promocyjnej „Drzwi otwarte” organizowanej w dniu 22.03.2019 przez Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS.
5. **Kowalczyk B.**, Tarasiuk J., Palusińska-Szysz M. Udział w XVII edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki w dniu 24.09.2021, prowadzenie zajęć pt. Wolnożyjące ameby jak „konie trojańskie” bakterii.
6. **Kowalczyk B.**, Małek A., Józefczak A., Palusińska-Szysz M. Udział w XVI edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki w dniu 19.09.2019, prowadzenie zajęć pt. Pierwotniaki - „konie trojańskie” mikroorganizmów.
7. **Kowalczyk B.**, Palusińska-Szysz M. Udział w XV edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki w dniu 17.09.2018, prowadzenie zajęć pt. Patogenne i symbiotyczne oddziaływanie bakterii z pierwotniakami.

DODATKOWA DZIAŁALNOŚĆ:

1. Prowadzenie i organizacja konferencji - I Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Biologicznych BIO-IDEA 2020.
2. „Fizykochemiczna charakterystyka oddziaływania peptydu LL-37 z fosfolipidami *Legionella gormanii*”, Naukowe 15 minut, wystąpienie ustne on-line, Instytut Nauk Biologicznych UMCS, 18.05.2022.