

Anna Bereźnicka

Antygeny układu grupowego krwi P1PK u ptaków: rola syntazy Gb3/CD77

Promotor:

Prof. dr hab. Marcin Czerwiński

Promotor pomocniczy:

Dr Radosław Kaczmarek

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Glikobiologii

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wrocław 2022

Anna Berezńska

**P1PK blood group antigens in birds: role of
Gb3/CD77 synthase**

Supervisor:

Prof. dr hab. Marcin Czerwiński

Assistant supervisor:

Dr Radosław Kaczmarek

This doctoral dissertation is based on experimental work performed

in Laboratory of Glycobiology,

Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy,

Polish Academy of Sciences

Wrocław 2022

Niniejsza praca nie powstałaby w prezentowanym formacie bez zaangażowania i pomocy wielu osób. Swoje podziękowania chciałabym skierować do poniżej wymienionych osób:

- **prof. dr hab. Aleksandra Klimczak** oraz **mgr Agnieszka Szyposzyńska** z Samodzielnego Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych: za wprowadzenie do tematyki barwień immunohistochemicznych, liczne sugestie oraz czas przeznaczony na pomoc w wykonaniu zdjęć przygotowanym preparatom;
- **dr hab. Joanna Rossowska** z Międzyzakładowej Pracowni Cytometrii i Mikroskopii Konfokalnej: za wprowadzenie do tematyki cytofluorometrii przepływowej oraz wszystkie rady dot. systemów lentiwirusowych;
- **dr Maria Paprocka** z Samodzielnego Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych: za wprowadzenie do tematyki immortalizacji komórek oraz hodowli komórek pierwotnych;
- **dr Katarzyna Kapczyńska** z Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej: za wprowadzenie do tematyki spektrometrii mas, wszystkie wspólnie spędzone godziny na próbach uzyskania satysfakcjonujących wyników, liczne rozterki, wsparcie, poczucie humoru i życzliwość;
- **dr n. wet. Tomasz Piasecki** z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych UPWr: za wieloletnią owocną współpracę oraz wszystkie przekazane próbki i preparaty;
- **dr hab. Edyta Majorczyk** z Katedry Fizjoterapii Politechniki Opolskiej: za pomoc i czas przeznaczony na doświadczenia z badaniem transkryptów;
- **dr hab. Piotr Kuroпка**, prof. UPWr oraz Członkowie Jego zespołu z Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UPWr: za przygotowanie preparatów do barwień immunohistochemicznych;
- **lek. wet. Anna Modlińska**: bez Twojego pytania ta praca by nie powstała, dziękuję za ogrom pasji i energii jakim obdzieliłabyś cały Wrocław i 2 lata owocnej współpracy;
- **dr Bartosz Bednarz**: za produkcję i przygotowanie preparatów podjednostki 1B toksyny Shiga i przeciwciała anti-Stx1B, koleżeńską życzliwość i serdeczność;
- **mgr inż. Jagoda Mierzejewskaj**, **dr Agnieszka Szczygieł**, **mgr inż. Katarzyna Węgierek-Ciura** z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej oraz **dr Agnieszka Łaskiewicz** z Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej: za koleżeńską pomoc oraz każdy „mikrolitr” serdeczności!
- wszyscy byli i obecni **Pracownicy i Studenci Zakładu Immunochemii**: za miłą atmosferę pracy, udzieloną koleżeńską pomoc i życzliwość;
- **prof. dr hab. Ewa Jaśkiewicz**, **dr Anna Urbaniak** i **mgr inż. Anna Jakubiak-Augustyn**: za wszystkie sugestie, rady i pomoc przy hodowlach linii ssaczy;
- **dr Katarzyna Szymczak-Kulus** oraz **mgr Krzysztof Mikołajczyk**: za przyjęcie do zespołu, serdeczność, życzliwość, poczucie humoru i krytyczne przeczytanie niniejszej pracy, za wszystkie uwagi i Wasze wsparcie na każdym etapie w ciągu ostatnich 6 lat;
- **dr hab. Maria Duk**, za wprowadzenie do tematyki glikolipidomiki, zaangażowanie, cierpliwość, ogrom życzliwości, liczne dyskusje i przekazane ciekawostki oraz czas poświęcony mojej osobie;
- **dr Radosław Kaczmarek**, promotor pomocniczy niniejszej pracy: za niekończące się pokłady cierpliwości i życzliwości, za wsparcie i wszystkie cenne uwagi i komentarze, mimo dzielących nas tysiące kilometrów;
- **prof. dr hab. Marcin Czerwiński**, mojemu promotorowi: za umożliwienie mi wykonywania pracy doktorskiej w swoim zespole, liczne dyskusje, zaangażowanie, liczne wskazówki, poczucie humoru i wiele dobrych słów w momentach, gdy chciałam się już poddać oraz ogromne pokłady cierpliwości i życzliwości;

Agata, Kinga, Tomek, Katarzyna – nie ma słów, które wyraziłyby moją wdzięczność za Waszą obecność w moim życiu;
Oraz mojej najbliższej **Rodzinie**, za wsparcie podczas całego toku studiów i pisanie pracy.

*If we knew what it was, we were doing,
it would not be called research, would it?*

(A. Einstein)

Mojej Babci

Badania prowadzono w ramach projektu badawczego
OPUS16 (UMO-2018/31/B/NZ6/01828),
finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki,
„Antygeny układu grupowego krwi P1PK u ptaków: rola syntazy Gb3/CD77
w oporności na toksyny Shiga.”

Wyniki zamieszczone w pracy zostały opublikowane w następujących artykułach:

Bereznicka A, Mikolajczyk K, Szymczak-Kulus K, Kapczynska K, Majorczyk E, Modlinska A, Piasecki T, Kaczmarek R, Czerwinski M. Two Paralogous Gb3/CD77 Synthases in Birds Show Different Preferences for Their Glycoprotein and Glycosphingolipid Substrates. Int J Mol Sci 2021, 22:9761 doi: 10.3390/ijms22189761.

Spis treści

1.	STRESZCZENIE	15
2.	ABSTRACT	16
3.	WYKAZ SKRÓTÓW	17
4.	WSTĘP	19
4.1.	<i>Glikozylotransferazy</i>	19
4.1.1.	Struktura	20
4.1.2.	Swoistość substratowa	21
4.1.3.	Mechanizm działania	22
4.1.4.	Ludzka syntaza Gb3/CD77	24
4.2.	<i>Glikosfingolipidy: struktura i biosynteza</i>	26
4.3.	<i>Biosynteza N- i O-glikanów</i>	28
4.3.1.	N-glikany	28
4.3.2.	O-glikany	31
4.3.3.	Glikany O-GlcNAc	35
4.4.	<i>Układy grupowe krwi P1PK i GLOB</i>	36
4.4.1.	Struktura i występowanie	36
4.5.	<i>Antygeny cukrowe u kręgowców jako czynniki modulujące oddziaływania z patogenami</i>	40
4.5.1.	Antygen Gal α 1 \rightarrow 3Gal	40
4.5.2.	Kwas N-glikoliloneuraminowy (Neu5Gc)	42
4.5.3.	Antygen Gal α 1 \rightarrow 4Gal	45
4.6.	<i>Toksyny Shiga</i>	47
4.6.1.	Nazewnictwo	47
4.6.2.	Struktura	47
4.6.3.	Klasyfikacja	48
4.6.4.	Mechanizm działania	49
4.6.5.	Znaczenie epidemiologiczne	53
4.6.6.	Zwierzęta jako rezerwuary enterokrwotocznych szczepów <i>E. coli</i> produkujących toksyny Shiga	55
5.	CEL PRACY	59
6.	MATERIAŁY I METODY	61
6.1.	<i>Przeciwciała</i>	61
6.2.	<i>Izolacja, manipulacja i analiza gołębiego DNA</i>	62
6.2.1.	Pobranie i przechowywanie krwi ptasiej	62
6.2.1.1.	<i>Analiza cytofluorometryczna antygenów układu grupowego krwi P1PK</i>	62
6.2.1.2.	<i>Aglutynacja</i>	63
6.2.2.	Izolacja genomowego DNA	64
6.2.3.	Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)	64
6.2.4.	Precypitacja DNA	65
6.2.5.	Oczyszczanie DNA	65
6.2.6.	Sekwencjonowanie	65

6.2.7. Elektroforeza DNA	65
6.2.8. Trawienie enzymami restrykcyjnymi	66
6.2.9. Izolacja RNA	66
6.2.10. Odwrotna transkrypcja mRNA.....	66
6.2.11. Analiza poziomu transkryptu <i>A4GALT</i>	66
6.3. Przygotowanie wektorów kodujących gołębią syntazę <i>Gb3/CD77</i> oraz jej paralog.....	67
6.3.1. Klonowanie do wektora pCAG	67
6.3.2. Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii <i>E. coli</i>	67
6.3.3. Transformacja elektrokompetentnych komórek <i>E. coli</i>	68
6.3.4. Izolacja plazmidowego DNA	68
6.3.5. Przygotowanie wektorów kodujących rozpuszczalną formę gołębiej syntazy <i>Gb3/CD77</i> i jej paralogu	68
6.4. Linie komórkowe zastosowane w badaniach	69
6.4.1. Hodowla ludzkiej linii komórkowej 2102Ep.....	69
6.4.2. Transfekcja komórek ludzkiej linii komórkowej 2102Ep wektorami kodującymi gołębią syntazę <i>Gb3/CD77</i> i jej paralog	70
6.4.3. Hodowla linii komórkowej Expi293F.....	70
6.4.4. Transfekcja linii komórkowej Expi293F.....	70
6.4.5. Wyprowadzenie pierwotnych endotelialnych ptasich linii komórkowych	71
6.4.6. Tworzenie pseudonaczyń na podłożu Matrigel®	71
6.4.7. Unieśmiertelnienie gołębiej i kurzej linii endotelialnej.....	71
6.4.8. Testy cytotoksyczności	72
6.5. Proteomika	73
6.5.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	73
6.5.2. Barwienie CBB	73
6.5.3. Western blotting.....	73
6.5.4. Dot blotting	74
6.5.5. Liza komórek 2102Ep.....	74
6.5.6. Oczyszczanie rozpuszczalnej formy gołębiej syntazy <i>Gb3/CD77</i> i jej paralogu.....	75
6.5.7. Trawienie rozpuszczalnej formy gołębiej syntazy <i>Gb3/CD77</i> i jej paralogu przez PNGazę F i O-glikanazę.....	75
6.5.8. Badanie aktywności enzymatycznej gołębiej syntazy <i>Gb3/CD77</i> i jej paralogu za pomocą syntetycznych glikokoniugatów w teście ELISA	75
6.6. Izolacja, oczyszczanie i analiza glikosfingolipidów	76
6.6.1. Izolacja neutralnych glikosfingolipidów	76
6.6.2. Analiza neutralnych glikosfingolipidów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cienkowsarstwowej (HPTLC)	77
6.6.3. Barwienie orcynolem płytek HPTLC.....	77
6.6.4. Analiza HPTLC glikosfingolipidów	78
6.6.5. Metaboliczne znakowanie glikosfingolipidów ¹⁴ C-galaktozą	78
6.6.6. Analiza MALDI-TOF glikosfingolipidów neutralnych	78
6.7. Immunohistochemia	78

6.8. Statystyka.....	79
6.9. Bioetyka.....	79
6.10. Narzędzia bioinformatyczne.....	79
7. WYNIKI.....	81
7.1. Antygeny układu grupowego P1PK na komórkach ptaków.....	81
7.1.1. Glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na erytrocytach.....	81
7.1.1.1. Charakterystyka glikosfingolipidów i glikoprotein z erytrocytów ptaków.....	83
7.1.2. Przeciwciała rozpoznające antygeny oligosacharydowe u ptaków.....	88
7.1.3. Glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na komórkach śródbłonna gołębia.....	91
7.1.3.1. Charakterystyka glikosfingolipidów i glikoprotein komórek śródbłonna gołębiej aorty.....	94
7.1.3.2. Wrażliwość komórek śródbłonna gołębiej aorty na toksyny Shiga.....	97
7.1.4. Glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na innych tkankach gołębia.....	98
7.2. Charakterystyka swoistości syntazy Gb3/CD77 gołębia.....	103
7.2.1. Dwa geny kodujące syntazy Gb3/CD77 u gołębia.....	103
7.2.2. Otrzymanie gołębih syntaz Gb3/CD77 w komórkach 2102Ep.....	104
7.2.2.1. Charakterystyka glikosfingolipidów i glikoprotein z komórek 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi enzymy M i P.....	105
7.2.2.2. Analiza poziomu transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 w transfekowanych komórkach linii 2102Ep.....	110
7.2.2.3. Wrażliwość komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazy Gb3/CD77 M i P na toksyny Shiga.....	111
7.2.3. Poziomy transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w różnych tkankach i komórkach gołębi.....	112
7.2.3.1. Analiza poziomów transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej gołębi.....	112
7.2.3.2. Poziomy transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w różnych tkankach gołębi.....	113
7.2.4. Otrzymanie rozpuszczalnych form syntaz Gb3/CD77 w komórkach Expi293F.....	114
7.2.4.1. Analiza N-glikanów w rozpuszczalnych domenach syntaz Gb3/CD77.....	116
7.2.4.2. Analiza swoistości syntaz Gb3/CD77 M i P.....	117
8. DYSKUSJA.....	119
8.1. Antygeny układu grupowego krwi P1PK u ptaków.....	119
8.2. Charakterystyka aktywności i swoistości syntaz Gb3/CD77 u gołębi.....	123
8.3. Antygeny układu grupowego krwi P1PK i toksyny Shiga.....	127
9. PODSUMOWANIE.....	137
10. LITERATURA.....	139
11. SUPLEMENT.....	159
12. SPIS ILUSTRACJI.....	173
13. SPIS TABEL.....	175

1. STRESZCZENIE

Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli*, szczególnie produkujące toksyny Shiga (STEC), które powodują krwawe biegunki i zespół hemolityczno-mocznicowy, stanowią duże zagrożenie dla zdrowia publicznego. Głównym czynnikiem wirulencji szczepów STEC są produkowane przez nie toksyny Shiga, których receptorami na komórkach śródbłonka są należące do ludzkiego układu grupowego krwi P1PK glikosfingolipidy, takie jak Gb3 (P^k) oraz P1. Wspólną cechą tych receptorów jest terminalna struktura Gal α 1 \rightarrow 4Gal, która powstaje w wyniku działania syntazy Gb3/CD77 (α 1,4-galaktozylotransferazy). Ostatnio wykazano, że enzym ten może syntezować N-glikany zawierające struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc (nazywane glikotopami P1). Rezerwuarem dla enterokrwotocznych szczepów *E. coli* są przeżuwacze (głównie bydło), ale nosicielami niewykazującymi objawów chorobowych mogą być również ptaki. Mechanizm, dzięki któremu pozostają one niewrażliwe na działania toksyn, nigdy wcześniej nie był przedmiotem badań.

W niniejszej pracy wykazano, że ludzkie antygeny P1 i P^k występują wyłącznie na erytrocytach gatunków ptaków należących do parwklasy ptaków współczesnych, a nie ma ich u przedstawicieli bezgrzebieniowców. W surowicach ptaków nie zidentyfikowano przeciwciał rozpoznających antygeny układu grupowego krwi P1PK, u niektórych gatunków wykazano natomiast obecność przeciwciał reagujących z ludzkim antygenem grupowym A. U gołębia (*Columba livia*) zidentyfikowano dwa paralogi syntazy Gb3/CD77, nazwane enzymami M i P. Wykazano, że syntaza Gb3/CD77 P jest swoista jedynie wobec akceptorów glikoproteinowych tworząc glikotopy P1, podczas gdy syntaza Gb3/CD77 M przenosi reszty galaktozy również na akceptory glikosfingolipidowe. Transfekcja ludzkiej linii komórkowej 2102Ep wektorami kodującymi gołębią syntazę Gb3/CD77 P i jej paralog spowodowały podwyższenie wrażliwości na holotoksynę Stx1. Może to sugerować, że produkty obu enzymów, zarówno glikosfingolipidy jak i glikoproteiny stanowią funkcjonalne receptory dla toksyn Shiga. Z drugiej strony, komórki gołębiego śródbłonka, które mają na powierzchni antygeny P^k i P1, są niewrażliwe na holotoksynę. Może to sugerować, że glikotopy P1 wchodzące w skład N-glikanów, mogą być dla toksyn receptorami pułapkowymi: wiążą je, ale nie powodują ich internalizacji.

2. ABSTRACT

Enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli*, especially ones producing Shiga toxins (STEC) that may cause bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome, pose a major threat to the public health. The main virulence factor of STEC strains are Shiga toxins (Stx), and their main receptors are Gb3 (P^k) and P1 glycosphingolipids, which belong to the human P1PK histo-blood group system. The common feature of these receptors is the terminal structure Gal α 1 \rightarrow 4Gal, synthesized by the Gb3/CD77 synthase (α 1,4-galactosyltransferase). It has recently been shown that the same enzyme can synthesize N-glycans with Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc structures (called P1 glycotopes). The major reservoirs for enterohaemorrhagic strains of *E. coli* are ruminants (mainly cattle), but recently birds also began to be considered as spillover hosts. The molecular mechanism of birds' resistance to Stx has never been studied before and remains unclear.

In this study, it was shown that human P1 and P^k antigens are present on the erythrocytes of avian species belonging to the parvclass of modern birds, but not on the erythrocytes of ratites. In the evaluated sera, no antibodies recognizing P1PK blood group antigens were identified, while antibodies reactive with the human blood group antigen A were found. Two paralogs of Gb3/CD77 synthase were identified in pigeons (*Columba livia*) and named M and P enzymes. Both enzymes can add terminal Gal creating Gal α 1 \rightarrow 4Gal structures, but the Gb3/CD77 synthase P is specific only for glycoprotein acceptors, while Gb3/CD77 synthase M can transfer galactose residues also to glycosphingolipids. The cells of human 2102Ep cell line transfected with the vectors encoding the pigeon Gb3/CD77 synthase P and its M paralog exhibited increased sensitivity to the Stx1 holotoxin. This may suggest that glycosphingolipids and glycoproteins are functional receptors for Shiga toxins. In contrast, the pigeon endothelial cells, which have P^k and P1 antigens on their surface, were found to be insensitive to the Stx1 holotoxin. This may imply that the N-linked glycans containing P1 glycotopes may serve as decoy receptors for toxins: they bind toxin molecules, but do not internalize them.

3. WYKAZ SKRÓTÓW

Aa	<i>amino acid</i>	aminokwas
ABC	<i>antibody binding capacity</i>	Liczba cząsteczek wiążących przeciwciała
5-CFDA, AM	<i>5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester</i>	ester acetoksymetylowy dwuoctanu 5-karboksyfluoresceiny
ACTB	β - <i>actin</i>	β -aktyna
Asp	<i>aspartic acid</i>	kwas asparaginowy
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt</i>	sól disodowa fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolilu,
BSA	<i>bovine serum albumine</i>	albumina surowicy bydłowej
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes database</i>	baza danych enzymów aktywnych względem węglowodanów
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	barwnik trifenylometanowy
CMP-Neu5Ac	<i>cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid</i>	monofosforan cytydiny kwasu N-acetylneuraminowego
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	modyfikowane medium hodowlane Eagle'a
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>	trifosforan deoksyrybonukleotydu
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	kwas wersenowy
EGR1	<i>early growth response 1 transcription factor</i>	czynnik transkrypcyjny wczesnej odpowiedzi na wzrost
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	test immunoenzymatyczny
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>	retikulum endoplazmatyczne
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	płatowa surowica bydła
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>	izotiocyanian fluoresceiny
Gal	<i>galactose</i>	galaktoza
GalCer	<i>galactosylceramide</i>	galaktozyloceramid
GalNAc	<i>N-acetylgalactosamine</i>	N-acetylogalaktozamina
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
Gb4Cer	<i>globoside</i>	globozyd
Glc	<i>glucose</i>	glukoza
GlcCer	<i>glucosylceramide</i>	glukozyloceramid
GlcNAc	<i>N-acetylglucosamine</i>	N-acetyloglukozamina
GSL	<i>glycosphingolipid</i>	glikosfingolipid
GSL I B4	<i>Griffonia simplicifolia lectin I isolectin B4</i>	izolektyna B4 lektyny I z <i>Griffonia simplicifolia</i> (czarna fasola afrykańska)
HPTLC	<i>high-performance thin layer chromatography</i>	wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa

HUS	<i>hemolytic uremic syndrome</i>	zespół hemolityczno-mocznicowy
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>	Międzynarodowe Towarzystwo Transfuzji Krwi
LacCer	<i>lactosylceramide</i>	laktozyloceramid
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight</i>	laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą z detektorem czasu
MESF	<i>Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome</i>	cząsteczki równoważne jednostkom rozpuszczalnego fluorochromu
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>	średnia intensywność fluorescencji
MG-132	<i>proteasome inhibitor XI, carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (Z-LLL-CHO)</i>	inhibitor proteasomu XI
MTS/MTT	<i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium), hydroxide, inner salt</i>	tlenek (3-(4,5-dimetylotiazolo-2ylo) -5-(3-karboksymetoksyfenylo) -2-(4-sulfofenylo) -2H-trifenylotetrazoliowy (sól wewnętrzna)
NBT	<i>nitrotetrazolium blue chloride</i>	chlerek błękitu nitrotetrazolowego
nLc4Cer	<i>paragloboside</i>	paraglobozyd
PAA	<i>polyacrylamide</i>	poliakrylamid
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	kwas rybonukleinowy
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>	czynnik transkrypcyjny skorelowany z Runt 1
Stx	<i>Shiga toxins</i>	toksyny Shiga
UDP-Gal	<i>uridine 5'-diphosphogalactose disodium salt</i>	sól disodowa urydyno-5'-difosforanu galaktozy
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	peroksydaza chrzanowa

4. WSTĘP

Glikozylacja to reakcja kowalencyjnego dołączania reszt cukrowych do makrocząsteczek z wytworzeniem wiązania glikozydowego; w jej wyniku powstają glikoproteiny, glikolipidy i inne glikokoniugaty. Cukry lub łańcuchy cukrowe przyłączone do makrocząsteczek ogólnie nazywamy glikanami; te, które znajdują się na zewnętrznej powierzchni komórek, mogą pośredniczyć w oddziaływaniach komórka-komórka czy komórka-cząsteczka. Glikany takie mogą również pośredniczyć w oddziaływaniach między organizmami (np. między gospodarzem a patogenem lub symbiontem). Ponadto glikany związane z białkami występującymi w jądrze i cytoplazmie mogą pełnić funkcję przełączników regulacyjnych. Najważniejsze funkcje glikanów można ująć w trzech kategoriach:

- 1) kształtowanie struktury i wpływ na aktywność biologiczną cząsteczek;
- 2) wiązanie cząsteczek, które rozpoznają struktury cukrowe (np. selektyn, galektyn);
- 3) oddziaływanie z komórkami innych organizmów, takimi jak symbionty, komensale czy patogeny.

4.1. Glikozylotransferazy

Glikozylotransferazy (GT) są enzymami, które przyłączają cząsteczki cukrów do akceptorów takich jak białka, peptydy, lipidy, kwasy nukleinowe czy polisacharydy, z wytworzeniem wiązań O-, NH-, S- i C-glikozydowych (Mestrom *i in.*, 2019). Donorami w reakcjach katalizowanych przez GT są najczęściej nukleotydocukry (np. UDP-Gal, UDP-Glc, CMP-Neu5Ac), jednak niektóre enzymy mogą wykorzystywać cukry przyłączone do fosforylowanych lipidów (Varki *i in.*, 2017). Nukleotydocukry nazywa się donorami, a enzymy je wykorzystujące glikozylotransferazami Leloira na cześć odkrywcy UDP-Glc Luisa Federico Leloira (Nagroda Nobla w 1970 r.) (Cardini *i in.*, 1950; Saier, 1999).

Uważa się, że do wytworzenia pełnej różnorodności glikanów u ssaków (ponad 7 000 struktur) potrzebne jest około 700 białek, przy czym ponad 200 z nich to glikozylotransferazy (Suzuki 2019). Znanych jest ponad 900 000 sekwencji genów kodujących glikozylotransferazy; ze względu na stopień podobieństwa, sekwencje te zostały zgrupowane w 112 rodzinach (baza danych CAZY, *Carbohydrate-Active enZymes*

database, <http://www.cazy.org>) (Coutinho *i in.*, 2003; Lombard *i in.*, 2014). Wiele enzymów pozostaje jednak niesklasyfikowanych.

4.1.1. Struktura

Glikozylotransferazy są w większości przezbłonowymi białkami typu II, z krótkim N-końcowym regionem cytoplazmatycznym, pojedynczą domeną przezbłonową, nieuporządkowanym regionem rdzenia oraz C-końcową domeną katalityczną ulokowaną w świetle siateczki śródplazmatycznej lub aparatu Golgiego (Paulson i Colleys, 1989). Za lokalizację enzymów znajdujących się w aparacie Golgiego odpowiada tzw. domena CTS, która obejmuje regiony: cytoplazmatyczny, rdzenia i przezbłonowy (Welch i Munro, 2019).

Glikozylotransferazy można podzielić na pięć grup ze względu na strukturę (GT-A, GT-B, GT-C, GT-D, GT-E). Najwięcej glikozylotransferaz zalicza się do grup GT-A oraz GT-B. Enzymy należące do grupy GT-A składają się z dwóch przylegających domen $\beta/\alpha/\beta$ podobnych do struktury Rossmanna, a ich aktywność jest uzależniona od obecności jonów metali dwuwartościowych. Jon metalu, (najczęściej Mg^{2+} lub Mn^{2+}) który koordynowany jest przez motyw DXD (Asp-X-Asp) oddziałuje z donorami Leloir'a (Breton *i in.*, 2006; Lairson *i in.*, 2008). Do grupy GT-B należą enzymy zawierające dwie odrębne domeny $\beta/\alpha/\beta$ podobne do struktur Rossmanna, które znajdują się naprzeciw siebie (Albesa-Jové *i in.*, 2014). Enzymy te uważa się za niezależne od jonów metali. Do grupy GT-C należą glikozylotransferazy, które nie są enzymami Leloir'a; są to białka przezbłonowe zlokalizowane w ER lub błonie komórkowej, a w ich skład wchodzi 8-13 α -helis. Wykorzystują one substraty donorowe związane z poliizoprenolem i podlegają odwracalnemu mechanizmowi katalitycznemu (Albuquerque-Wendt *i in.*, 2019). Glikozylotransferazy należące do grupy GT-D przenoszą cząsteczkę glukozy na heksasacharyd O-glikanów bakteryjnych adhezyn. Pomimo obecności domeny podobnej do struktury Rossmanna, ich struktura i sekwencja nie wykazują podobieństw do glikozylotransferaz grup GT-A i GT-B, a zamiast motywu DXD zawierają one konserwatywny motyw DXE (Asp-X-Glu), niezbędny w ich aktywności mimo braku bezpośredniego udziału w wiązaniu kationu dwuwartościowego (Zhang *i in.*, 2014). Wyodrębnienie kolejnej grupy (GT-E) było wynikiem określenia struktury glikozylotransferazy z termofilnej bakterii (TagA z *Thermoanaerobacter italicus*), która

charakteryzowała się odrębną topologią w stosunku do przedstawicieli wcześniej opisanych grup. Pomimo obecności domeny przypominającej domenę podobną do struktury Rossmanna, enzymy te nie mają motywu DXD ani DXE i są niezależne od dwuwartościowych kationów metali (Kattke *i in.*, 2019).

4.1.2. Swoistość substratowa

Glikozylotransferazy wykazują wysoką swoistość donorowo-akceptorową, która jest zależna od struktury enzymów. Substytucja jednej reszty aminokwasowej może prowadzić nie tylko do utraty lub zmniejszenia aktywności enzymu, lecz także do modyfikacji jego swoistości względem donorów i/lub akceptorów (Ouzzine *i in.*, 2002; Ramakrishnan i Qasba, 2007; Nair *i in.*, 2015). Przykładem zmiany swoistości glikozylotransferaz w wyniku pojedynczej mutacji są transferazy A i B ludzkiego układu grupowego ABO. Oba enzymy kodowane są przez ten sam *locus* ABO, ale różnią się czterema resztami aminokwasowymi, przy czym obecność określonych reszt w pozycjach 266 i 268 jest niezbędna dla zachowania swoistości. Transferaza A przyłącza resztę *N*-acetylogalaktozaminy do terminalnej galaktozy (która musi być połączona z fukozą wiązaniem $\alpha 1 \rightarrow 2$) z utworzeniem wiązania $\alpha 1 \rightarrow 3$, a transferaza B przyłącza resztę galaktozy z utworzeniem takiego samego wiązania. W wyniku przyłączenia GalNAc lub Gal powstają odpowiednio antygeny grupowe krwi A i B. W transferazie A na wymienionych pozycjach znajdują się reszty leucyny i glicyny, a w transferazie B reszty metioniny i alaniny. Wykazano, że wprowadzenie do transferazy A w miejsce 266 metioniny (lub D, I, N, Q) prowadzi do powstania enzymu o rozszerzonej swoistości, który może używać jako donorów zarówno UDP-GalNAc, jak i UDP-Gal. Wymiana leucyny na fenyloalaninę, histydynę lub tyrozynę skutkuje przeniesieniem przez enzym reszty galaktozy z UDP-Gal. Podobnie w przypadku transferazy B: gdy metionina zostaje wymieniona na leucynę (lub A, C, G, N, T) enzym rozszerza swoistość do dwóch donorów. Zmiana aminokwasu na prolinę (w pozycji 266) prowadzi do rozszerzenia swoistości enzymu i wykorzystywania UDP-GalNAc jako głównego donora (Yamamoto *i in.*, 2015). Podobny wpływ zmiany reszty aminokwasowej na swoistość enzymu opisano dla ludzkiej $\beta 1,4$ -galaktozylotransferazy 1 kodowanej przez gen *B4GALT1*. Enzym z resztą tyrozyny w pozycji 289 sekwencji aminokwasowej przenosi resztę galaktozy na akceptory zakończone *N*-acetyloglukozaminą. Zamiana tyrozyny na leucynę, izoleucynę

lub asparaginę skutkuje rozszerzeniem swoistości donorowej enzymu, w wyniku czego do terminalnej GalNac może zostać przyłączona zarówno galaktoza, jak i *N*-acetylogalaktozamina (Ramakrishnan i Qasba, 2002).

Oprócz podstawień reszt aminokwasowych, swoistość akceptorowa enzymu może być również modyfikowana przez tworzenie kompleksów z innymi białkami. Przykładem może być ssacza β 1,4-galaktozylotransferaza 1, która zmienia swoistość substratową po związaniu α -laktoalbuminy, wielofunkcyjnego białka produkowanego przez gruczoł sutkowy. W nieobecności α -laktoalbuminy enzym przenosi reszty galaktozy z UDP-Gal na oligosacharydowe łańcuchy z terminalną *N*-acetyloglukozaminą. Jeżeli ten sam enzym tworzy heterodimer z α -laktoalbuminą, następują zmiany konformacyjne, które ograniczają wielkość miejsca aktywnego, przez co możliwe jest wiązanie jedynie glukozy, ale nie *N*-acetyloglukozaminy (Ramakrishnan i Qasba, 2010). Wykazano, że wiele glikozylotransferaz tworzy homo-, heterodimery i oligomery (Hashimoto *i in.*, 2010) i w wielu przypadkach kompleksy te mają wpływ na aktywność enzymatyczną i/lub lokalizację. Wśród nich znajdują się enzymy syntezujące *N*- i *O*-glikany, glikosfingolipidy oraz glikozaminoglikany (De Graffenried i Bertozzi, 2004; Lin *i in.*, 2011; Albesa-Jové *i in.*, 2015).

Uważa się, że GT są swoiste wobec glikoprotein lub glikosfingolipidów, ale mogą też rozpoznawać oba rodzaje akceptorów. Jest tak w przypadku ludzkich i mysich α 2,3-sialotransferaz (III, IV i VI) oraz α -1,3-fukozylotransferaz (Mikolajczyk, Kaczmarek i Czerwinski, 2020). Najlepiej przebadanym przykładem są wspomniane wyżej transferazy A i B odpowiedzialne za syntezę antygenów grupowych krwi na *N*- i *O*-glikanach oraz glikosfingolipidach (Cooling *i in.*, 2005).

4.1.3. Mechanizm działania

Reakcje katalizowane przez glikozylotransferazy są stereospecyficzne i wysoce regioselektywne w odniesieniu do tworzonych wiązań glikozydowych. Przyjmuje się, że większość glikozylotransferaz jest regioswoista zgodnie z hipotezą „jeden enzym, jedno wiązanie”, jednak pojawia się coraz więcej wyjątków od tej reguły (Togayachi *i in.*, 2001; Williams, Zhang i Thorson, 2007; Westman *i in.*, 2015). Przykładem może być ludzka fukozylotransferaza 2, odpowiedzialna za status wydzielacz/niewydzielacz (Se/se;

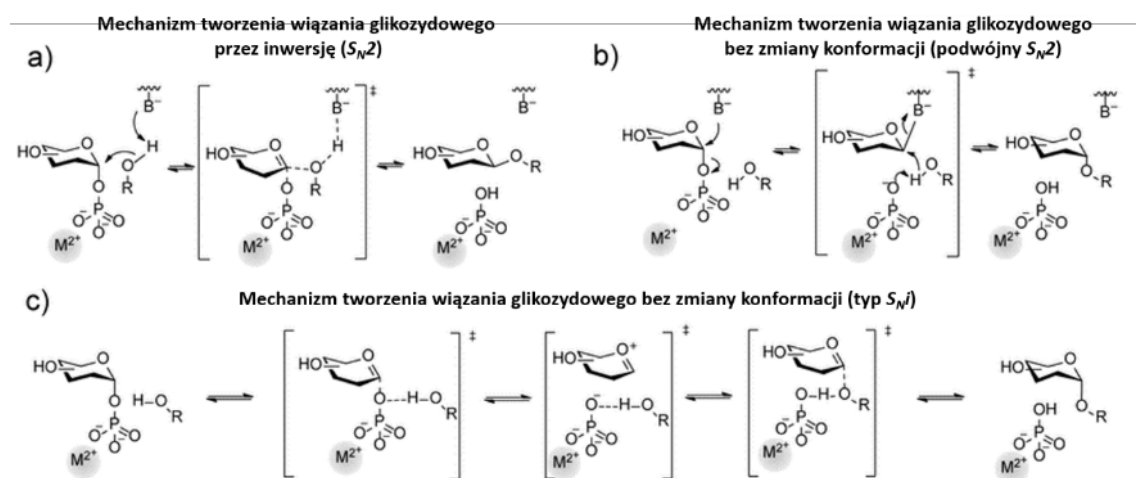
kodowana przez gen *FUT2*), która może dołączać reszty fukozy w pozycji α 1,2 (Holgersson i Löfling, 2006).

Glikozylotransferazy mogą tworzyć wiązania glikozydowe z inwersją lub zachowaniem konfiguracji anomerycznej substratu donorowego.

W przypadku enzymów inwertujących, grupa nukleofilowa (np. karboksylowa) łańcucha bocznego aminokwasu deprotonuje grupę hydroksylową w akceptorze, umożliwiając w ten sposób jej atak nukleofilowy na węgiel anomeryczny w donorze. Odległość między donorem ustabilizowanym w miejscu aktywnym a katalitycznym łańcuchem bocznym pozostawia przychodzącemu akceptorowi wystarczająco dużo miejsca, aby „zaatakować” węgiel anomeryczny z „tyłu” cukru (w większości przypadków β -strona), co generuje produkt o odwróconej konfiguracji (Ryc. 1a). W przypadku glikozylotransferaz zachowujących konfigurację anomeryczną, β -strona cukru donorowego jest umieszczona bliżej katalitycznego łańcucha bocznego, co pozwala tylko akceptorowi (tu aktywowanemu przez grupę opuszczającą) zaatakować centrum anomeryczne z boku grupy opuszczającej i prowadzi do ogólnego zachowania konfiguracji. Do tego wyniku mogą prowadzić dwa scenariusze: dwie kolejne substytucje nukleofilowe - S_N2 lub alternatywny mechanizm podobny do S_Ni (rzadki wariant S_N1) (Ryc. 1). W pierwszym scenariuszu, opisanym jako mechanizm podwójnego wypierania, pierwsze z dwóch podstawień S_N2 wynika z nukleofilowego ataku łańcucha bocznego aminokwasu na donor (a nie na akceptor, jak w przypadku enzymów inwertujących), oraz wytwarza kowalencyjny związek pośredni donor-enzym cukier o odwróconej konfiguracji. Następnie następuje nukleofilowy atak akceptora z drugiej strony, kolejna inwersja i tworzenie produktu. Tak więc dwie inwersje prowadzą do zachowania konfiguracji anomerycznej (Ryc. 1b).

Alternatywny mechanizm podobny do S_Ni („i” oznacza „wewnętrzny powrót” i odnosi się do rozkładu grupy opuszczającej, która wytwarza nukleofil atakujący karbokation po tej samej stronie) nie obejmuje tworzenia kowalencyjnego związku pośredniego. Enzymatyczny łańcuch boczny stabilizuje jedynie dodatni ładunek rozwijający się w anomerycznym centrum donora, podczas gdy grupa opuszczająca oddziałuje z akceptorem. Dlatego na tym etapie akceptor może być uważany za część grupy opuszczającej. Ta „rozszerzona” grupa opuszczająca odchodzi od węgla anomerycznego, rozkłada się, a tym samym uwalnia część akceptorową, która

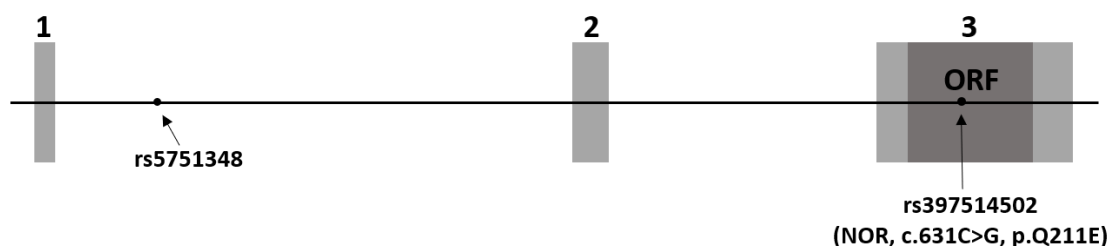
„powraca” do centrum anomerycznego, tworząc ostateczne wiązanie glikozydowe (Ryc. 1c) (Lairson *i in.*, 2008; Gloster, 2014; Ardèvol i Rovira, 2015; Albesa-Jové *i in.*, 2017).



Ryc. 1. Mechanizm reakcji glikozylotransferaz po inwersji (a) lub z zachowaniem konfiguracji (b, c) anomerycznego wiązania glikozydowego. Nie wszystkie glikozylotransferazy wymagają jonów metali dwuwartościowych (M^{2+}) dla katalitycznej aktywności (na podstawie: Mestrom *i in.*, 2019).

4.1.4. Ludzka syntaza Gb3/CD77

Ludzka syntaza Gb3/CD77 (syntaza P1/ P^k , α 1,4-galaktozylotransferaza, UDP-galaktoza: β -D-galaktozylo- β 1-R 4- α -D-galaktozylotransferaza), jest kodowana przez gen *A4GALT* (GenBank NG_007495.2) zlokalizowany na 22 chromosomie i składający się z trzech eksonów, z których trzeci koduje całą otwartą ramkę odczytu (ORF) (Ryc. 2). Enzym ten jest odpowiedzialny za biosyntezę glikosfingolipidowych antygenów należących do układu grupowego krwi P1PK (Daniels 2013). Syntaza Gb3/CD77 katalizuje przeniesienie reszty galaktozy na laktozyloceramid i paraglobozyd – prekursorzy antygenów grupowych krwi: P^k (głobotriaosyloceramidu, Gb3, CD77) i P1. Oba antygeny zawierają terminalną strukturę Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1. Enzym z podstawieniem p.Q211E (określany w tej pracy terminem muteina) spowodowanym mutacją c.631C>G (rs397514502) wykazuje rozszerzoną swoistość akceptorową i przyłącza resztę galaktozy również do akceptorów glikosfingolipidowych z końcową *N*-acetylogalaktozaminą (GalNAc) (Suchanowska *i in.*, 2012; Kaczmarek *i in.*, 2016).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający ludzki gen *A4GALT*. Na szaryo zaznaczono obszar trzech eksonów (na podstawie grafiki przyg. przez dr Katarzynę Szymczak-Kulus).

Ludzka syntaza Gb3/CD77 (EC 2.4.1.228) należy do 32 rodziny glikozylotransferaz (CAZY, <http://www.cazy.org>). Jest białkiem o długości 353 reszt aminokwasowych; teoretyczna masa cząsteczkowa wynosi 40 499 Da, a punkt izoelektryczny 9,16. Struktura przestrzenna nie została określona, ale uważa się, że jest białkiem przezbłonowym typu II i znajduje się w błonie aparatu Golgiego.

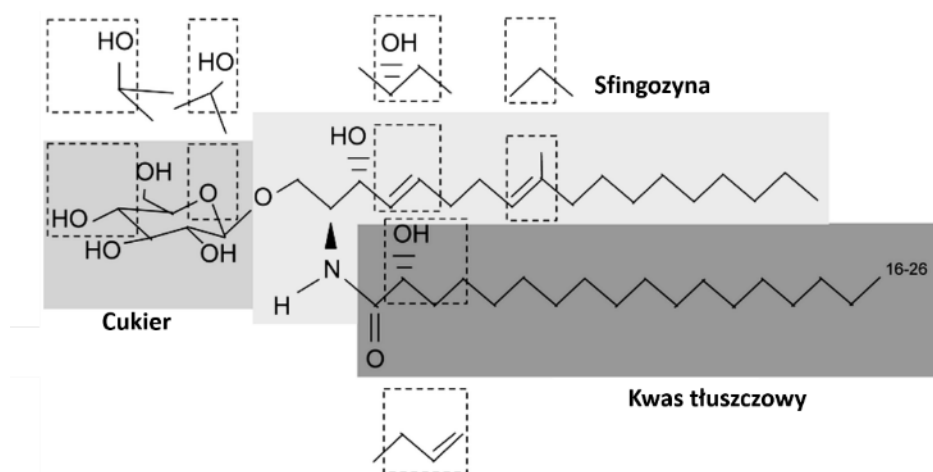
Syntaza Gb3/CD77 zawiera motyw DXD (DTD, 192-194 aa, baza UniProtKB - Q9NPC4 (A4GAT_HUMAN)) i ma dwa miejsca N-glikozylacji (N₁₂₁ i N₂₀₃). W Laboratorium Glikobiologii IITD PAN wykazano, że rekombinowana domena katalityczna ludzkiej syntazy Gb3/CD77 uzyskana w komórkach owadziej linii Sf9 staje się nieaktywna po traktowaniu PNGazą F, co sugeruje, że N-glikany odgrywają ważną rolę w aktywności tego enzymu (Szymczak-Kulus *i in.*, 2016). Nadprodukcując syntazę Gb3/CD77 w komórkach CHO-Lec2 również wykazano, że obecność N-glikanów wpływa na aktywność enzymu. Obecność N-glikanu w pozycji N₂₀₃ była konieczna dla aktywności, ale aktywność wariantu pozbawionego N-glikanu w pozycji N₁₂₁ była podobna do aktywności enzymu w pełni N-glikozylowanego, co sugeruje, że ten glikan nie odgrywa żadnej roli w aktywności enzymatycznej. Enzym pozbawiony obu glikanów nie wykazywał żadnej aktywności enzymatycznej (Mikolajczyk *i in.*, 2021).

Do niedawna uważano, że ludzka syntaza Gb3/CD77 może dodawać końcową resztę galaktozy jedynie do akceptorów glikosfingolipidowych. Jednak ostatnio wykazano, że glikoproteiny wyizolowane od osób o genotypie *P¹P¹* i zawierające terminalne struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc (nazywane dalej glikotopami P1), rozpoznawane są przez przeciwciała anti-P1 (Stenfelt *i in.*, 2019). Kompleksowa analiza aktywności syntazy Gb3/CD77 wobec akceptorów glikoproteinowych przeprowadzona w Laboratorium Glikobiologii wykazała, że enzym ten dodaje reszty galaktozy również do glikoprotein, a produkty tej reakcji, czyli glikoproteiny z terminalną strukturą

Gal α 1 \rightarrow 4Gal, mogą pełnić funkcję receptorów dla toksyn Shiga (Szymczak-Kulus *i in.*, 2021).

4.2. Glikosfingolipidy: struktura i biosynteza

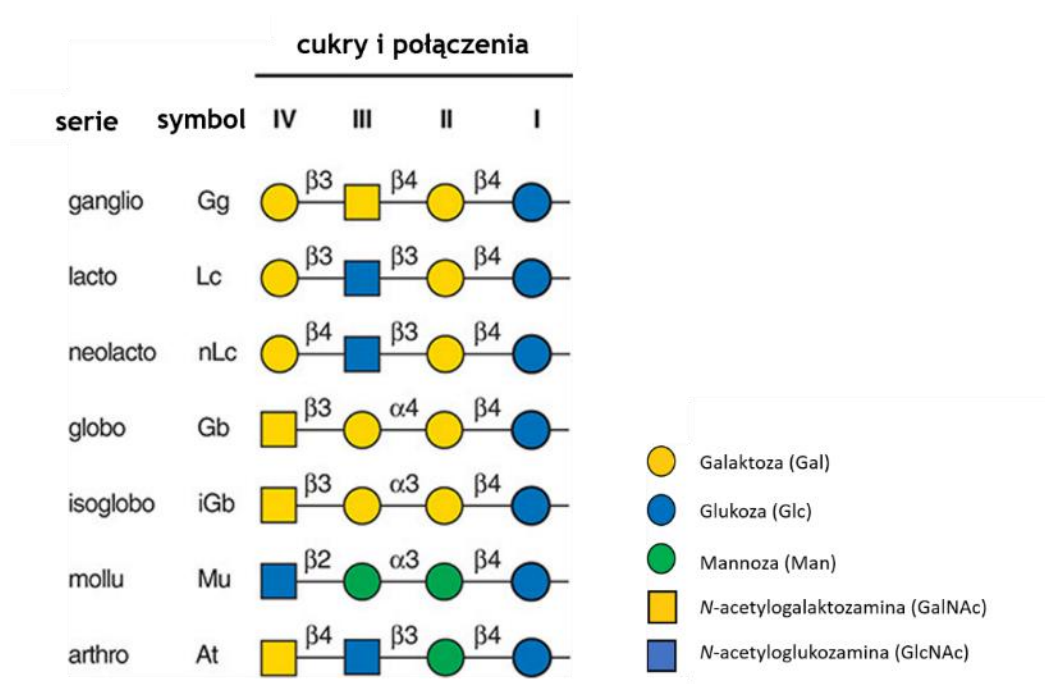
Glikosfingolipidy są amfipatycznymi lipidami zbudowanymi z hydrofilowego cukru i hydrofobowej reszty ceramidu. Ceramidy to grupa związków złożonych ze sfingozyny (aminoalkoholu) połączonej z resztą kwasu tłuszczowego przez wiązanie amidowe. W wyniku połączenia polarnej „głowy” i hydrofobowego „ogona” (jak w przypadku fosfolipidów) glikosfingolipidy mogą ulegać wbudowywaniu w błonę lipidową. Ze względu na różnorodność struktur cukrowych (od monocukrów do



Ryc. 3. Schemat budowy glikosfingolipidu.

rozgałęzionych glikanów), glikosfingolipidy stanowią największą grupę wśród sfingolipidów (Merrill *i in.*, 2007; Gault, Obeid i Hannun, 2010). Rdzeń sfingozynowy składa się zazwyczaj z 14 do 20 nasyconych lub jednonienasyconych łańcuchów alifatycznych z grupami hydroksylowymi (Ryc. 3). Różnice w długości łańcucha sfingozyny, obecność wiązań podwójnych czy dodatkowych grup hydroksylowych są charakterystyczne dla różnych organizmów (Merrill *i in.*, 2007; Pata, Hannun i Ng, 2010).

W zależności od składu części cukrowej, glikosfingolipidy można podzielić na kilka grup. Monoglukozyloceramidy (nazywane również cerebrozydami) mogą być galakto- lub glukozyloceramidami (Merrill *i in.*, 2007). Synteza wszystkich kompleksowych glikosfingolipidów, które mogą składać się nawet z 20 monosacharydów, wiąże się z wydłużeniem łańcucha glukozyloceramidu. U bezkręgowców dodawana jest reszta



Ryc. 4. Struktury neutralnych cukrów rdzenia glikosfingolipidów i nazwy klas.

mannozy z wytworzeniem wiązania $\beta 1 \rightarrow 4$ -; u kręgowców jest to reszta galaktozy (Kojima *i in.*, 2013; Schnaar i Kinoshita, 2017). Dodawanie kolejnych cząsteczek cukrów prowadzi do powstania serii struktur rdzenia (rdzeń to połączenie czterech neutralnych cukrów), sklasyfikowanych w siedmiu grupach wg Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) (Ryc. 4).

Synteza ceramidu zachodzi w cytoplazmatycznej części retikulum endoplazmatycznego; następnie jest on transportowany przez część luminalną do aparatu Golgiego. Dalsza biosynteza glikosfingolipidów zachodzi w lumenalnej części aparatu Golgiego poprzez sekwencyjne przyłączenie kolejnych cząsteczek monosacharydów do powstającego glikosfingolipidu (D'Angelo *i in.*, 2013; Schnaar i Kinoshita, 2017). Glikosfingolipidy są transportowane do zewnętrznej części błony plazmatycznej, gdzie gromadzą się głównie w formie mikrodomen lipidowych (takich jak tratwy lipidowe) z resztą cukrową skierowaną do środowiska zewnątrzkomórkowego (Gault, Obeid i Hannun, 2010). Cząsteczki kompleksowych glikosfingolipidów ulegają degradacji w lizosomach, gdzie reszta cukrowa jest degradowana przez swoiste hydrolazy (Hill *i in.*, 2018). Glukozyloceramid jako jedyny glikosfingolipid może podlegać degradacji zarówno w lizosomach, jak i cytozolu (bez obecności saponin). Wrodzony niedobór jednej z hydrolaz bądź saponin wiąże się z wystąpieniem lizosomalnych chorób

spichrzeniowych, które odznaczają się nagromadzeniem glikosfingolipidów (Platt *i in.*, 2018; Sun, 2018).

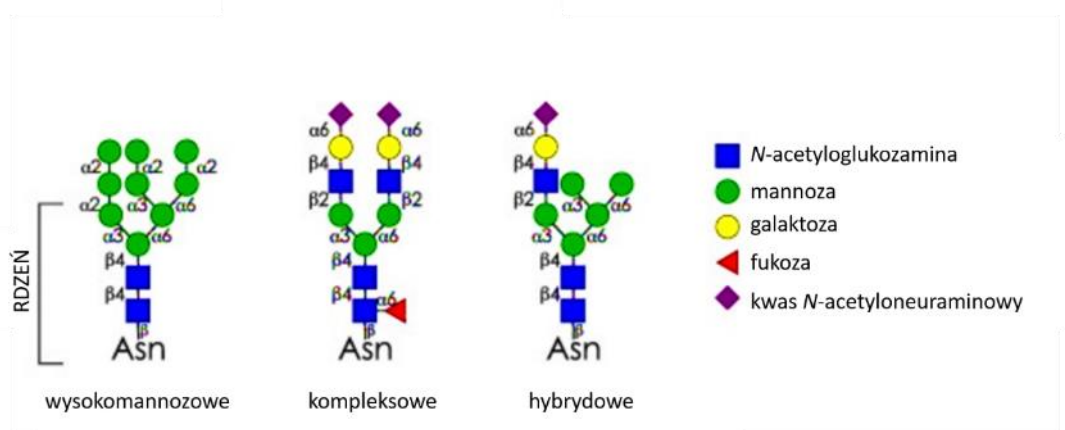
4.3. Biosynteza N- i O-glikanów

4.3.1. N-glikany

N-glikany są oligosacharydami kowalencyjnie przyłączonymi do reszt asparaginy w łańcuchu polipeptydowym za pomocą wiązania N-glikozydowego. Minimalną sekwencją aminokwasową wymaganą dla przyłączenia N-glikanu do reszty asparaginy jest N-X-S/T, w której „X” oznacza dowolny aminokwas z wyjątkiem Pro. Sekwencja taka nazywana jest sekwonem (sequon), wykazano jednak, że nie wszystkie sekwony ulegają N-glikozylacji. N-glikozylacja może wystąpić na wszystkich typach struktur drugorzędowych, ale okolice β -skrętów wydają się być najbardziej optymalne. Istnieje korelacja między stopniem dostępności potencjalnych miejsc N-glikozylacji na powierzchni białka a stopniem obsadzenia takich miejsc; jest mało prawdopodobne, że N-glikozylacja wystąpi w sterycznie osłoniętych sekwonach N-X-S/T (Varki *i in.*, 2009; Esmail i Manolson, 2021).

Złożony N-glikan ma dwie anteny lub rozgałęzienia zainicjowane przez dodanie dwóch reszt GlcNAc. Trój- i czteroantenowe N-glikany powstają przy inicjowaniu rozgałęzień od reszt mannozy (C-4 rdzenia $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man i C-6 rdzenia $\alpha 1 \rightarrow 6$ Man). Inny rodzaj rozgałęzienia, znaleziony u ptaków i ryb, inicjowany jest w C-4 rdzenia $\alpha 1 \rightarrow 6$ Man. Wszystkie eukariotyczne N-glikany mają wspólną sekwencję rdzenia, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{N-X-S/T}$) i można je podzielić na trzy typy: oligomannozowe, w których tylko reszty Man przedłużają rdzeń; kompleksowe, w którym anteny rozpoczynają się od reszt GlcNAc i hybrydowe, w których reszta Man rozciąga się na ramię $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ rdzenia, a jedna lub dwie reszty GlcNAc rozciągają się na ramię $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$ (Ryc. 5). Główną modyfikacją rdzenia w N-glikanach kręgowców jest obecność fukozy przyłączonej wiązaniem $\alpha 1 \rightarrow 6$ Fuc do GlcNAc połączonego z Asn w rdzeniu N-glikanowym. $\alpha 1,6$ -fukozylotransferaza (FUT8) wymaga uprzedniego działania MGAT1 ($\alpha 1,3$ -mannozylo-glikoproteina 2- β -N-acetyloglukozaminylotransferaza) (Herscovics 1999). Przeprowadzone analizy podkreślają kluczową rolę ramienia N-glikanu $\text{GlcNAc-}\beta 1 \rightarrow 2\text{-Man-}\alpha 1 \rightarrow 3\text{-Man}$ syntezowanego przez MGAT1 dla wysokiego powinowactwa rozpoznawania substratu

przez FUT8. Glikany, które nie zostały zmodyfikowane przez MGAT1 są mało efektywnymi substratami dla ludzkiej FUT8, nawet przy nadprodukcji ostatniego z enzymów (Boruah *i in.*, 2020). Ponadto wyłączenie syntezy MGAT1 skutkuje w produkcji wysokomannozowych struktur N-glikanów i akumulacji substratów dla FUT8 (García-García *i in.*, 2021).



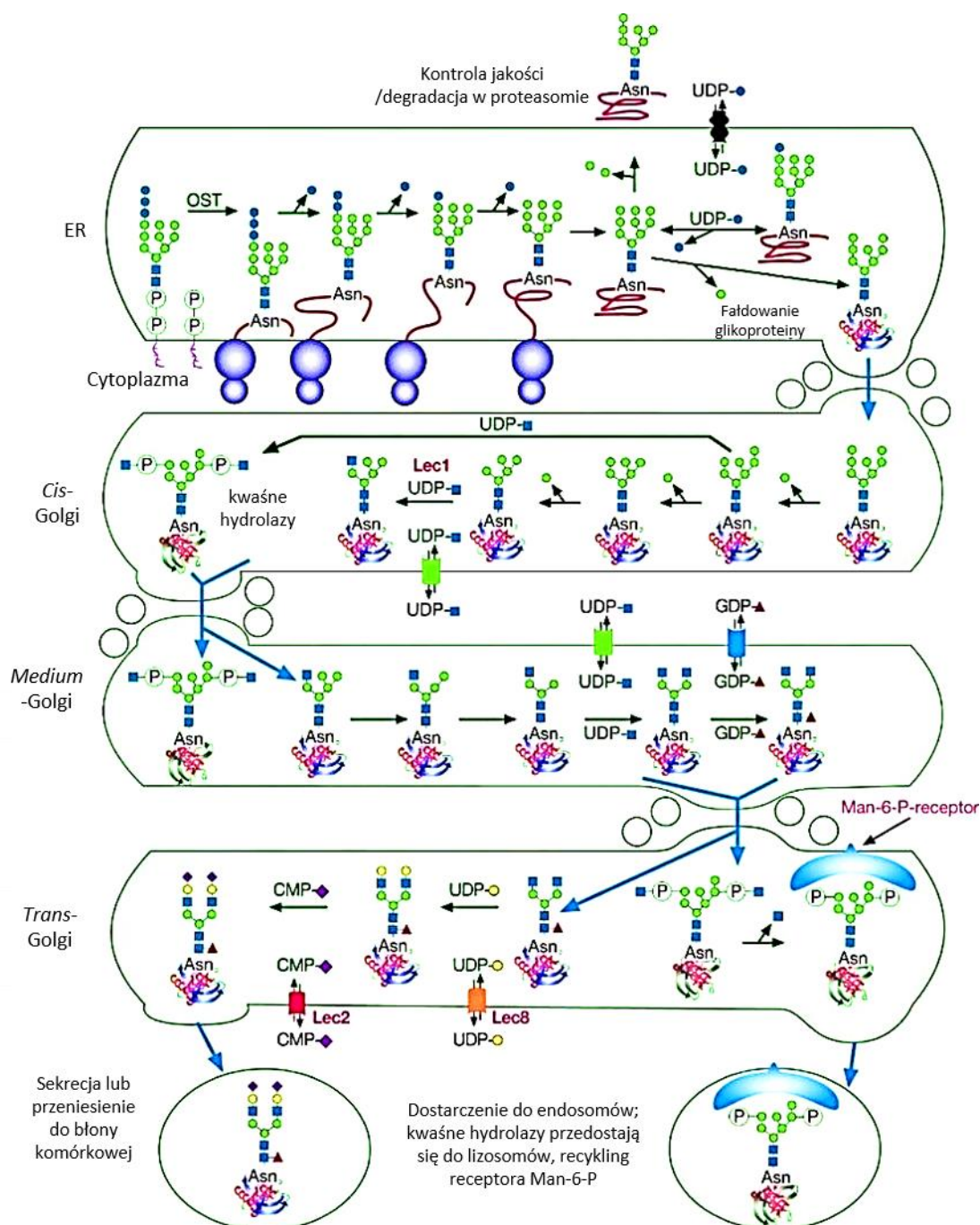
Ryc. 5. Struktury N-glikanów powszechnie występujących u eukariontów.

Biosynteza N-glikanów u ssaków rozpoczyna się na lipidowej cząsteczce poliizoprenoidowej zwanej fosforanem dolicholu (Dol-P). Pierwszy etap jest katalizowany przez GlcNAc-1-fosfotransferazę (DPAGT1), która przenosi resztę GlcNAc-1-P z UDP-GlcNAc na Dol-P i tworzy Dol-P-P-GlcNAc. Inhibitor tego enzymu, tunikamycyna, może być stosowana do hamowania N-glikozylacji w komórkach. Powstały 14-cukrowy glikan jest przenoszony przez oligosacharylotransferazę (OST) na resztę Asn w dostępnych sekwonach N-X-S/T w regionach białkowych, które zostały poddane translokacji przez błonę ER (Ryc. 6).

Po kowalencyjnym przyłączeniu Glc3Man9GlcNAc2 do N-X-S/T w białku, N-glikan ulega dalszym modyfikacjom w ER. Białka opiekuńcze obecne w ER rozpoznają zmodyfikowane N-glikany, co odgrywa kluczową rolę w regulacji fałdowania glikoprotein (Ryc. 6).

Biosynteza hybrydowych i złożonych N-glikanów rozpoczyna się w środkowej części aparatu Golgiego w wyniku działania N-acetylglikozylotransferazy (GlcNAc-TI, MGAT1), która dodaje resztę GlcNAc do C-2 reszty $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man w rdzeniu Man5GlcNAc2 (Ryc. 6).

Większość złożonych i hybrydowych N-glikanów ma wydłużone rozgałęzienia, które są tworzone przez dodanie reszty Gal do reszty GlcNAc; powstają wtedy



Ryc. 6. Schemat biosyntezy i dojrzewania N-glikanu (na podstawie *Essentials of Glycobiology*, Varki i współpr., 2017).

podjednostki budulcowe Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc, określane jako *N*-acetylolaktozamina typu 2 lub sekwencje „LacNAc”. Połączone disacharydy LacNAc tworzą powtórzenia tandemowe zwane poli-LacNAc. W niektórych glikoproteinach reszta GalNAc jest dodawana do reszty GlcNAc z utworzeniem wiązania β ; takie anteny mają struktury GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc (LacdiNAc) (Aebi 2013).

N-glikany mogą podlegać rozgałęzieniom przez dodanie reszt kwasów sjałowych, fukozy, galaktozy, *N*-acetylglukozaminy i siarczanu. Wiele z tych struktur jest

wspólnych dla N- i O-glikanów oraz glikosfingolipidów (Shrimal, Cherepanova i Gilmore, 2015).

N-glikany wpływają na wiele właściwości glikoprotein, w tym na ich konformację, rozpuszczalność, antygenowość, aktywność i rozpoznawanie przez białka wiążące glikany (Spiro, 2002; Varki *i in.*, 2009). Wykazano, że N-glikany stają się bardziej rozgałęzione w wyniku transformacji nowotworowej (Oliveira-Ferrer, Legler i Milde-Langosch, 2017; Pang *i in.*, 2018).

4.3.2. O-glikany

O-glikany są oligosacharydami kowalencyjnie przyłączonymi do reszt seryny lub treoniny za pomocą wiązania O-glikozydowego. W skład O-glikanów wchodzi reszty GalNAc, Gal, GlcNAc, Fuc i Sia (ale nie Man, Glc lub Xyl). Długość łańcucha oligosacharydowego O-glikanu może wynosić od pojedynczej reszty GalNAc do ponad 20 reszt cukrowych (Varki *i in.*, 2009). Do najlepiej poznanych białek bogatych w O-glikany należą mucyny, które są głównym składnikiem wydzielin, wyścielają powierzchnie nabłonkowe organizmu, w tym przewód pokarmowy, moczowo-płciowy i oddechowy, gdzie chronią komórki nabłonka przed fizycznym i chemicznym uszkodzeniem oraz przed infekcją. Mucyny zawierające wiele złożonych O-glikanów mogą stanowić barierę dla drobnoustrojów jelitowych. Glikany mucyn mają cztery główne struktury rdzenia (Brockhausen i Melamed, 2021). Pojedyncza reszta GalNAc przyłączona do Ser/Thr jest nazywana antygenem Tn. Niepodstawiony rdzeń 1 O-glikanu nosi nazwę antygeny Thomsena-Friedenreicha (antygen TF lub T). Antygeny Tn i T mają zazwyczaj przyłączone reszty kwasu sjałowego, a ich nieusjałowane formy występują w podwyższonych stężeniach w mucynach z komórek nowotworowych (Radhakrishnan *i in.*, 2014) (Ryc. 7).

O-glikany są dodawane do białek w aparacie Golgiego. Glikozylotransferazy biorące udział w ich biosyntezie są białkami przezbłonowymi typu II z krótkim ogonkiem cytoplazmatycznym na N-końcu skierowanym w stronę cytoplazmy, domeną przezbłonową, krótkim regionem trzonu i domeną katalityczną w części luminalnej aparatu Golgiego. Układ enzymów w obrębie błon Golgiego można porównać do „linii montażowej”, z reakcjami zachodzącymi od części cis do części trans aparatu Golgiego. (Varki *i in.*, 2017).

Lokalizacja w komórce, poziom aktywności i swoistość substratowa glikozylotransferaz zaangażowanych w syntezę O-glikanów mają wpływ na ich zróżnicowanie. Istnieje wiele enzymów biorących udział w syntezie N-glikanów i glikosfingolipidów, które są aktywne również wobec O-glikanów, a niektóre z nich preferują O-glikany jako substraty akceptorowe (Van Die *i in.*, 1999). Na miejsce przyłączenia O-glikanu wpływ ma sekwencja aminokwasowa białka, ale nie ma ściśle określonej sekwencji reszt aminokwasowych, takiej jak sekwony w N-glikozylacji.

Synteza O-glikanu rozpoczyna się od przeniesienia reszty GalNAc z UDP-GalNAc na Ser lub Thr przez polipeptydową transferazę GalNAc (GALNT). Wszystkie GALNT wiążą UDP-GalNAc jako substrat donorowy, ale mogą różnić się swoistością akceptora peptydowego. U człowieka występuje 20 transferaz GalNAc produkowanych tkankowo swoiście i różniących się swoistością. Wykazano, że część enzymów preferuje przenoszenie reszty GalNAc na reszty Thr niż Ser (James *i in.*, 2020).

W wyniku dodania jednego lub dwóch cukrów do reszty GalNAc O-glikanu powstaje kilka rodzajów rdzeni O-glikanów (Ryc. 7). Rdzeń 1 (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc-O-Ser/Thr) powstaje w wyniku działania C1GALT1 (syntaza rdzenia 1), która katalizuje przeniesienie reszty Gal z UDP-Gal na GalNAc-O-Ser/Thr). Enzym ten, obecny u zwierząt, jest aktywny w wielu typach komórek. Wykazano, że obecność białka opiekuńczego C1GALT1C1 (COSMC), podczas syntezy w retikulum endoplazmatycznym, zapewnia prawidłowe fałdowanie i aktywność enzymu w aparacie Golgiego. Brak syntazy rdzenia 1 w niektórych typach komórek powoduje wysoką ekspresję antygenów Tn i sjalo-Tn (np. limfocyty T Jurkat i białaczkowe komórki macierzyste raka okrężnicy [LSC]) (Ju *i in.*, 2008).

Za syntezę rdzenia 2 odpowiadają dwa enzymy: β 1,6-N-acetyloglukozaminylotransferaza 1 rdzenia 2 (C2GnT-1) oraz glukozaminylo(N-acetylo) transferaza 1 (GCNT1).

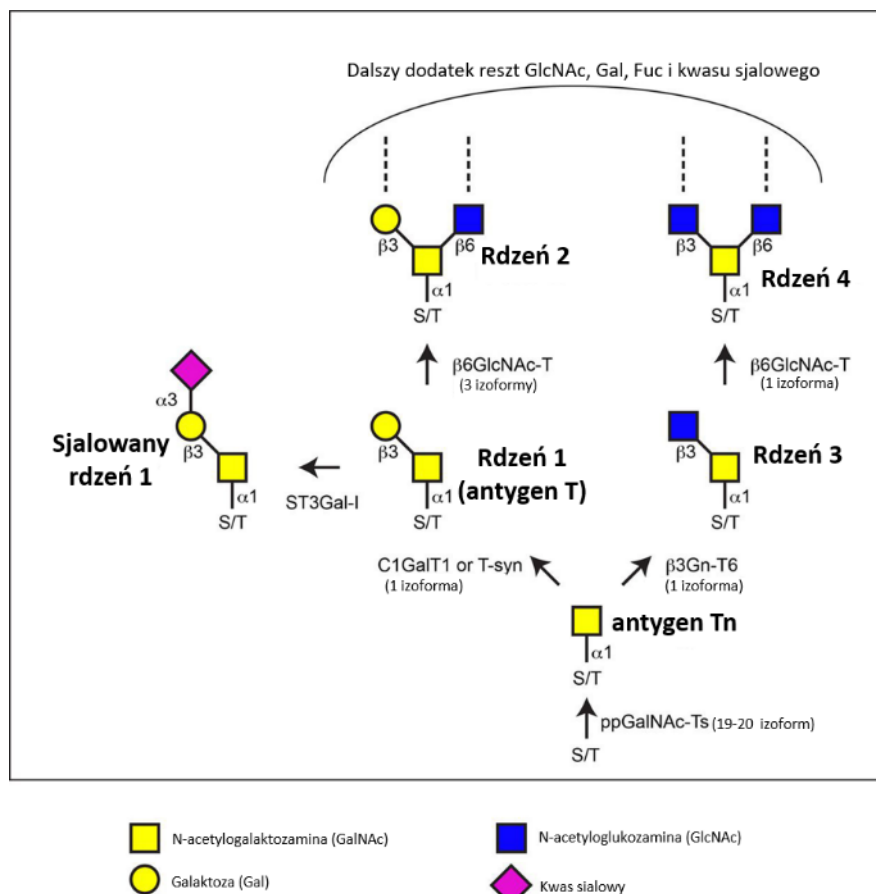
Synteza O-glikanów rdzenia 3 ogranicza się głównie do nabłonka przewodu pokarmowego i dróg oddechowych oraz gruczołów ślinowych. Enzymem odpowiedzialnym za syntezę jest β 1-3-N-acetyloglukozaminylotransferaza 6 rdzenia 3 (syntaza rdzenia 3, C3GnT6; B3GNT6) przezbłonowe białko należące do rodziny GT31 glikozylotransferaz.

Synteza rdzenia 4 wymaga działania glukozaminylo-(*N*-acetylo) transferaza 3 typu mucyny (GCNT3 typu M) oraz obecności rdzenia 3 O-glikanu. GCNT3 jest białkiem przezbłonowym typu II należącym do rodziny GT14. Synteza zarówno rdzenia 3, jak i rdzenia 4 O-glikanów hamuje progresję nowotworu, chociaż molekularne mechanizmy hamowania są nieznane (Tian i Ten Hagen, 2009; Fernández *i in.*, 2018; Gupta *i in.*, 2020).

Dołączanie kolejnych reszt cukrowych w łańcuchu O-glikanu jest katalizowane przez enzymy z rodzin β 1,3-*N*-acetyloglukozaminylotransferaz (B3GNT2, B3GNT4, B3GNT8) oraz β 1,3- i β 1,4-galaktozylotransferaz wykazujących różne zakresy swoistości względem glikanów. Wymienione transferazy są białkami przezbłonowymi typu II zlokalizowanymi w przedziałach aparatu Golgiego (Togayachi *i in.*, 2010). Liniowe jednostki poli-*N*-acetylolaktozoaminy mogą ulegać rozgałęzieniu przez enzymy z rodziny β 1,6-*N*-acetyloglukozaminylotransferaz (np. glukozaminylo(*N*-acetylo) transferaza 2, GCNT2), w wyniku czego z antygeny grupowego krwi i powstaje antygen I (Shaz 2009). W reakcji wydłużania łańcucha cukrowego O-glikanów biorą udział również enzymy z rodziny α 2,6-sjalotransferaz (ST6GALNAC1 do ST6GALNAC4) (Mikolajczyk, Kaczmarek i Czerwinski, 2020).

Przyłączenie kwasów sjałowych blokuje dalsze liniowe wydłużanie łańcuchów O-glikanów. Wykazano, że podwyższony poziom ekspresji ST3GAL1 ma miejsce w nowotworach piersi, jak również korelację podwyższonego poziomu sjałotransferaz (ST6GAL1) z przejściem epitelialno-mezenchymalnym komórek nowotworowych i zwiększonym potencjałem do przerzutowania (Garnham *i in.*, 2019). Opisano wpływ poziomu α 2,6-sjałotransferaz (ST6GALNAC1, ST6GALNAC4) na progresję i przerzutowanie nowotworu jelita grubego i nowotworu pęcherzykowego tarczycy (Miao *i in.*, 2016; Kvorjak *i in.*, 2020).

Do enzymów biorących udział w wydłużeniu łańcucha cukrowego O-glikanów należą również α 1,2-fukozylotransferazy: FUT1 i FUT2. Ponadto fukozylotransferaza 3 (FUT3) syntezuje antygeny grupowe Lewis (Czerwiński 2015; Daniels 2013), a fukozylotransferazy 4-11 syntezują inne antygeny grupowe Lewis, takie jak Le^x i Le^y (Kaczmarek 2010). Usjałowane i siarczanowane antygeny Lewis są ligandami dla selektyn, a struktury kończące się resztą Gal ligandami dla galektyn (Suzuki *i in.*, 2012; Jin i Wang, 2020; Blenda *i in.*, 2022).



Ryc. 7. Rodzaje rdzeni O-glikanów (na podstawie: Tran i Ten Hagen, 2013).

O-glikany mogą wpływać na kształtowanie prawidłowej konformacji i ekspozycji epitopów peptydowych oraz właściwości adhezyjnych mucyn i glikoprotein. Mogą też być rozpoznawane przez selektyny i galektyny, które są białkami odgrywającymi ważną rolę we wrodzonej odporności. Struktury O-glikanów mogą też ulegać zmianom podczas aktywacji limfocytów. Niektóre O-glikany są markerami w diagnozowaniu i prognozowaniu przebiegu nowotworów (np. CA-125 czyli sjalo-Le(a)) (Cervoni *i in.*, 2020). Mucyny odgrywają rolę w obronie przed zakażeniem SARS-CoV-2 w sposób zależny od obecności kwasów siałowych na powierzchni ich O-glikanów. Wysłunięto hipotezę, że wiązanie białka S wirusa SARS-CoV-2 do kwasów siałowych może potencjalnie przyczynić się do zmniejszenia podatności niektórych populacji na infekcje lub wpływać na rozprzestrzenianie się wirusa (Dhar *i in.*, 2021; Nguyen *i in.*, 2022; Wardzala *i in.*, 2022).

4.3.3. Glikany O-GlcNAc

Grupy hydroksylowe seryny lub treoniny mogą być modyfikowane przez *N*-acetyloglukozaminę przyłączoną wiązaniem β . Taki rodzaj glikozylacji różni się od innych form glikozylacji białek m.in lokalizacją (białka jądrowe, mitochondrialne i cytoplazmatyczne), brakiem wydłużania lub modyfikacji oraz wielokrotnym przyłączaniem i usuwaniem w czasie funkcjonowania białka (Zachara, Akimoto i Hart, 2015).

Glikoproteiny z dołączoną resztą cukrową O-GlcNAc znaleziono we wszystkich badanych organizmach wielokomórkowych. Białka zmodyfikowane O-GlcNAc zostały również znalezione w wielu wirusach (np. adenowirus, SV40, cytomegalowirus, rotawirus, bakulowirus, HIV i inne) (Chou i Hart, 2001; Graham *i in.*, 2008; Zachara, Akimoto i Hart, 2015).

Dynamiczny cykl dodawania i usuwania O-GlcNAc jest regulowany przez skoordynowane działania enzymów: transferazy O-GlcNAc (OGT) i obojętnej β -heksozaminidazy znanej jako O-*N*-acetyloglukozaminaza (OGA). Regulacja miejsca startu transkrypcji i alternatywne składanie prowadzi do syntezy co najmniej trzech izoform OGT i dwóch izoform OGA. Zarówno OGT, jak i OGA mają tylko jedną podjednostkę katalityczną i funkcjonują w komórce jako holoenzymy niekowalencyjnie związane z białkami pomocniczymi (Alteen, Tan i Vocadlo, 2021).

Transferaza O-GlcNAc (OGT, β -*N*-acetyloglukozaminylotransferaza; EC 2.4.1.255) katalizuje dodanie *N*-acetyloglukozaminy z UDP-GlcNAc do określonych reszt seryny lub treoniny w celu utworzenia wiązania β O-glikozydowego. UDP uwalniany podczas reakcji przenoszenia reszty GlcNAc jest silnym inhibitorem OGT. W warunkach, w których UDP jest szybko degradowany (jak ma to miejsce w komórce), aktywność OGT zależy od poziomu UDP-GlcNAc (Aquino-Gil *i in.*, 2017).

W przeciwieństwie do N- i O-glikanów, wiązanie O-GlcNAc może zmieniać się w odpowiedzi na stres komórkowy, cykl komórkowy, depolaryzację neuronów czy sygnalizację insulinową (Chen, Chi i Boyce, 2018; Ong, Han i Yang, 2018). Obserwacje te wraz z danymi dotyczącymi OGT wykorzystującej motywy aminokwasowe podobne do kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAP) kierowanych przez prolinę sugerują, że O-GlcNAc jest regulatorową posttranslacyjną modyfikacją analogiczną do fosforylacji (Yuan, Tang i Li, 2020).

O-GlcNAc glikozylacja odgrywa dużą rolę w fizjologii komórki i progresji chorób. Duża liczba procesów komórkowych (związanych m.in. z ekspresją genów, translacją, degradacją białek) jest skorelowana z tą modyfikacją (Machacek, Slawson i Fields, 2018; Qiang, Slawson i Fields, 2021). Nietypową aktywność OGT i OGA jak i korelację pomiędzy zmienionym metabolizmem komórkowym a dynamicznym cyklem O-GlcNAc opisano we wszystkich dotychczas badanych ludzkich nowotworach (Fehl i Hanover, 2021; Parker, Peterson i Slawson, 2021).

4.4. Układy grupowe krwi P1PK i GLOB

4.4.1. Struktura i występowanie

Ludzki układ grupowy krwi P1PK został odkryty w 1927 r. przez Karla Landsteinerja i Petera Levine'a (Landsteiner i Levine, 1927); jest sklasyfikowany przez Międzynarodowe Towarzystwo Transfuzji Krwi (*International Society Of Blood Transfusion*, ISBT) pod numerem 003 (www.isbtweb.org). Należą do niego 3 antygeny glikosfingolipidowe: P1, P^k (Gb3/CD77) oraz NOR. Terminalne struktury tych glikosfingolipidów to Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 w antygenach P1 i P^k, oraz Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 w antygenie NOR (Kaczmarek *i in.*, 2014). Antygeny P^k i NOR (który występuje w formach NOR1 i NOR2) należą do serii globo, natomiast antygen P1 do serii neolakto. Struktury antygenów układów grupowych krwi P1PK przedstawiono w Tabeli 1. Upřednio do układu grupowego krwi P1PK należał antygen P (GLOB1, globotetraozylceramid, globozyd, Gb4Cer) jednak w 2004 roku Ringressi i współpr. wykazali, że obecność tego antygeny zależy od aktywności β 1,3-*N*-acetylogalaktozaminylotransferazy (syntazy P). W związku z tym przeniesiono globozyd do nowoutworzonego układu grupowego krwi GLOB, w skład którego wchodzi również antygen PX2 (*BGvar | Blood Group Associated Genomic Variant Resource - CSIR IGIB*; Ringressi *i in.*, 2004).

Tabela 1. Struktury antygenów grupowych krwi należących do układu grupowego krwi P1PK

Antygen	Struktura	Seria
P ^k (Gb3,CD77)	Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcCer	globo
P1	Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcCer	neolakto
NOR1	Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcCer	globo
NOR _{int}	GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcCer	globo
NOR2	Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcCer	globo

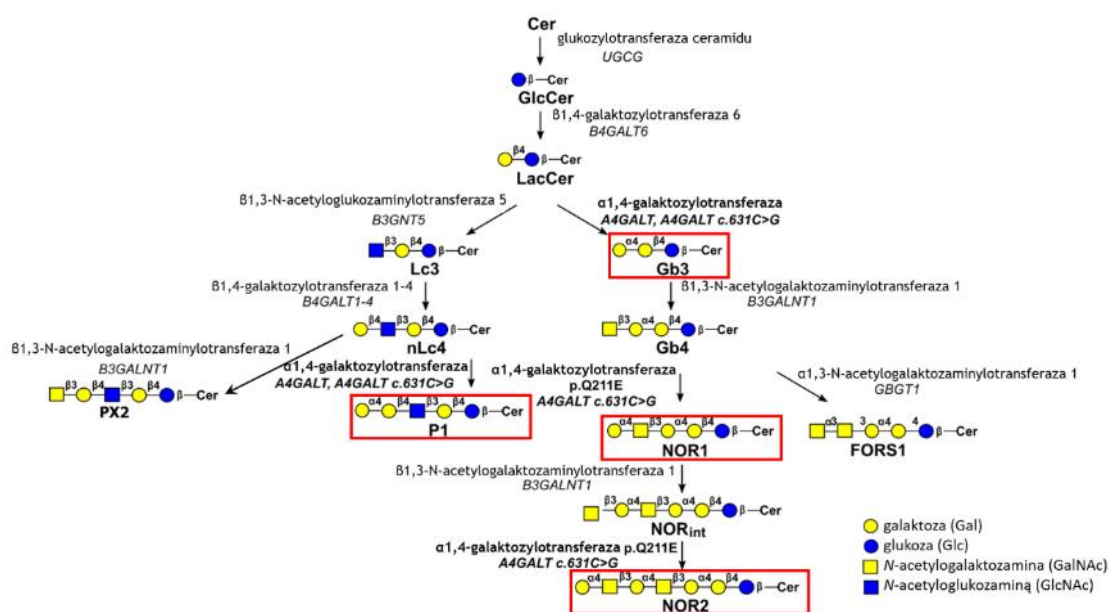
Antygen P^k jest obecny u większości ludzi (z wyjątkiem rzadkiego fenotypu p), a antygen P1 występuje u ok. 75% osób należących do kaukaskiej grupy etnicznej, 20% osób grupy azjatyckiej oraz 94% grupy afrykańskiej. W zależności od obecności antygeny P1 mamy do czynienia z fenotypem P₁ (antygen P1 jest obecny) lub fenotypem P₂ (brak antygeny P1) (Kaczmarek *i in.*, 2014). Rzadki fenotyp p jest spowodowany brakiem antygenów P^k i P1.

Antygen P^k występuje na limfocytach, komórkach mięśni gładkich czy śródbłonku wyściełającym układy: moczowy, oddechowy, nerwowy i pokarmowy (Müthing *i in.*, 1999). Jego obecność wykazano również w nowotworach: jajnika (Johansson *i in.*, 2009), jelita grubego (Kovbasnjuk *i in.*, 2005) i żołądka (Jin i Teneberg, 2022). Obecność antygeny P1 poza komórkami linii erytroidalnej (Cooling 2015) stwierdzono na komórkach nowotworowych jajnika (Jacob *i in.*, 2014) oraz gruczolakoraku żołądka (Jin i Teneberg, 2022). Nie ma danych na temat obecności antygeny NOR na komórkach innych niż erytrocyty.

Antygen P występuje na erytrocytach, komórkach śródbłonka oraz na megakariocytach i fibroblastach. Jego obecność wykazano również w monocytach, limfocytach i prekursorach szpiku (Cooling *i in.*, 2003). Antygen ten znaleziono również na komórkach nowotworowych, a także w komórkach wątroby płodu, serca płodu i łożyska (Daniels 2013). Antygen PX2 (GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcCer) jest obecny w niewielkich ilościach na powierzchni erytrocytów, ale jego poziom jest wyższy u osób o fenotypie p, co jest wynikiem braku antygeny P^k, który jest głównym substratem dla β 1,3-N-acetylogalaktozaminylotransferazy. Istnieje hipoteza zakładająca, że z powodu braku preferowanego akceptora syntaza P dodaje terminalną

resztę GalNAc z większą wydajnością do paraglobozydu (Westman *i in.*, 2015). Nie ma danych dotyczących ekspresji antygenu PX2 w tkankach ludzkich innych niż erytrocyty (Ricci Hagman 2018).

Antygeny układu grupowego P1PK powstają w wyniku działania syntazy Gb3/CD77 (α 1,4-galaktozylotransferazy, syntazy P^k/P1). Obecność podstawienia w pozycji 211 sekwencji aminokwasowej (zamiana reszty glutaminy na resztę kwasu glutaminowego; p.Q211E) powoduje rozszerzenie swoistości akceptorowej: enzym taki może dołączać resztę galaktozy do *N*-acetylogalaktozaminy globozydu (Gb4, antygen P, globotetraozylceramid) tworząc strukturę antygenu NOR1 (Suchanowska *i in.*, 2012). Antygen NOR2 powstaje poprzez wydłużenie łańcucha cukrowego NOR1 przez β -1,3-*N*-acetylogalaktozaminylotransferazę (powstaje NOR_{int}) i syntazę Gb3/CD77. Terminalna struktura Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 została jak dotąd znaleziona jedynie u żaby śmieszki *Rana ridibunda* (Mourad *i in.*, 2001). Struktura antygenów NOR została wyjaśniona w całości w naszym laboratorium (Duk *i in.*, 2001). Szlak biosyntezy antygenów P1, P^k, NOR, P i PX2 został przedstawiony na Ryc. 8.



Ryc. 8. Szlak biosyntezy glikosfingolipidowych antygenów ludzkiego układu grupowego krwi P1PK i antygenów pokrewnych. Na czerwono zaznaczono antygeny produkowane przez syntazę Gb3/CD77 (na podstawie grafiki przyg. przez dra R. Kaczmarka).

Fenotypy i genotypy układu grupowego P1PK przedstawiono w Tabeli 2.

Molekularne podstawy układu grupowego P1PK przez długi czas pozostawały zagadką. Wykazano, że poziom transkryptyu genu *A4GALT* u osób o fenotypie P₁ jest wyższy niż u osób P₂, co przekłada się na podwyższenie ilości syntazy Gb3/CD77 (Iwamura *i in.*, 2003; Thuresson, Westman i Olsson, 2011; Kaczmarek *i in.*, 2018). Obecnie większość badaczy uważa, że za zróżnicowanie fenotypów P₁/P₂ odpowiada polimorfizm pojedynczego nukleotydu rs5751348, ulokowany w regionie intronu 1 genu *A4GALT*. Swoiste wiązanie czynnika wczesnej odpowiedzi na wzrost (*EGR1*, *early growth response factor 1*) do fragmentu obejmującego resztę guanidyny w miejscu SNP (rs5751348) powoduje podwyższenie ilości transkryptyu *A4GALT*, co wiąże się z występowaniem fenotypu P₁. Jeżeli w tym miejscu znajduje się reszta tymidyny, to wiązanie *EGR1*, a więc i ekspresja genu jest niska, co w przypadku homozygotyczności powoduje powstanie fenotypu P₂ (Yeh *i in.*, 2018). Niezależnie wykazano, że czynnik transkrypcyjny Runt 1 (*RUNX1*, *Runt-related transcription factor 1*) wiąże się do fragmentu obejmującego resztę guanidyny w tym samym miejscu, co również powoduje podwyższenie transkrypcji genu *A4GALT* (Westman *i in.*, 2018).

Tabela 2. Fenotypy i genotypy układu grupowego P1PK

Fenotyp	Genotyp	Antygeny
	<i>A4GALT</i>	
P ₁	<i>p¹p¹</i>	P, P ₁ , P ^k
	<i>p¹p²</i>	
P ₂	<i>p²p²</i>	P, P ^k
p	ψ ψ	-
P ^k ₁	<i>p¹p¹</i>	P ₁ , P ^k
	<i>p¹p²</i>	
P ^k ₂	<i>p²p²</i>	P ^k
P ₁ NOR	<i>p¹NORp¹</i>	P, P ₁ , P ^k , NOR ₁ , NOR ₂ , NOR _{int}
	<i>p¹NORp²</i>	

(ψψ – brak kodowania funkcjonalnych białek)

4.5. Antygeny cukrowe u kręgowców jako czynniki modulujące oddziaływania z patogenami

Glikany związane z powierzchnią komórki lub wewnątrzkomórkowymi białkami i lipidami biorą udział w wielu biologicznych procesach. Oligosacharydowe struktury na powierzchni komórki mogą być ligandami dla czynników adhezji komórkowej, interakcji makrocząsteczek i patogenów, i w ten sposób wpływać na oddziaływania z tymi czynnikami (Moremen, Tiemeyer i Nairn, 2012; Varki *i in.*, 2017).

Interakcje zachodzące między białkiem patogenu i oligosacharydowym receptorem na komórce gospodarza są często pierwszym etapem infekcji, w związku z tym oligosacharydy takie znajdują się pod duża presją ewolucyjną. Może ona spowodować zmianę struktur cukrowych na powierzchni komórek gospodarza; utrata antygeny cukrowego może umożliwić powstanie przeciwciał, które rozpoznają takie same antygeny na powierzchni patogenów. Jeżeli patogen wiąże się do cukrowego antygeny, jego utrata może spowodować oporność na ten patogen. Alternatywnie, zmienione oligosacharydy, mogły odgrywać rolę receptorów pułapkowych (*decoy receptors*), które wiążąc patogeny uniemożliwiają ich wniknięcie do komórki. Różnorodność strukturalna glikanów może stanowić ochronę przed infekcjami również w ramach jednego gatunku, czego przykładem mogą być cukrowe układy grupowe krwi u człowieka (Czerwiński i Kaczmarek, 2013; Czerwiński, 2015). Istnieje kilka antygenów, które uległy zmianie pod wpływem presji ze strony patogenów.

4.5.1. Antygen Gal α 1 \rightarrow 3Gal

Terminalne połączenie Gal α 1 \rightarrow 3Gal jest syntezowane przez α 1,3-galaktozylotransferazę (α 3GalT, GGTA1, kodowaną przez gen *A3GALT* należącą do rodziny GT6 według bazy CAZy) (Coutinho *i in.*, 2003). Różnice w produkcji epitopu Gal α 1 \rightarrow 3Gal i naturalnych przeciwciał rozpoznających ten epitop wśród gatunków ssaków wykazali Galili i współpr. (Galili *i in.*, 1987).

Struktura Gal α 1 \rightarrow 3Gal występuje u większości kręgowców, w tym u lemurów i małp Nowego Świata, ale nie u małp Starego Świata, małp człekokształtnych czy ludzi (Galili *i in.*, 1987; Suchanowska i Czerwiński, 2009). Molekularne podstawy inaktywacji genu *A3GALT* u małp Starego Świata, małp człekokształtnych i ludzi przypisuje się utracie przez niego zdolności do kodowania aktywnego białka około 28 milionów lat temu

w wyniku pojawienia się kodonu STOP w pozycji 260 sekwencji nukleotydowej. Mutacje te, skutkujące utratą aktywności białka umożliwiły produkcję przeciwciał anty-(Gal α 1 \rightarrow 3Gal), co mogło wzmacniać obronę przed patogenami produkującymi takie struktury (Koike *i in.*, 2002; Suchanowska i Czerwiński, 2009).

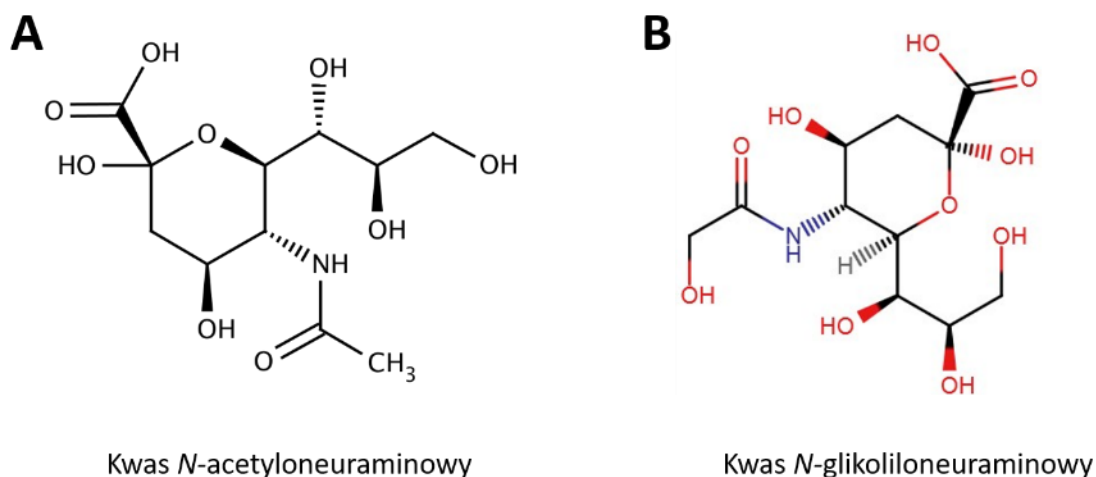
Syntaza iGb3 (iGb3S, kodowana przez gen *A3GALT2*) również należy do rodziny GT6 i przenosi resztę galaktozy z UDP-Gal na Gal β 1 \rightarrow 4Glc z utworzeniem wiązania α 1 \rightarrow 3 (Milland, Christiansen i Sandrin, 2005). Ludzki homolog syntazy iGb3 nie jest aktywny ze względu na mutacje punktowe w eksonie 5 genu (Christiansen *i in.*, 2008). Według bazy danych NCBI (dostęp 01.2022), niektóre ryby doskonałokostne mają paralogi *A3GALT* (lub GT6m8, jednej z glikozylotransferaz ssaczych z rodziny GT6 zidentyfikowanej przez Turcot-Dubois i współpr. (Turcot-Dubois *i in.*, 2007)). U przedstawiciela płazów, tropikalnej żaby szponiastej (*Xenopus tropicalis*) nie ma genów kodujących enzymy z rodziny GT6. Mimo braku identyfikacji homologów genu *A3GALT* u gadów, glikoproteiny będące składnikami jadu kobry nepalskiej (*Naja naja kaouthia*) z kladu Lepidozaurów (Lepidosauria) zawierają N-glikany o strukturze Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4(Fuca α 1 \rightarrow 3)GlcNAc β 1 (Gowda *i in.*, 2001). Nie zidentyfikowano homologów genów kodujących glikozylotransferazy z rodziny GT6 u ptaków (Suzuki 2019).

Struktura Gal α 1 \rightarrow 3Gal jest podstawowym receptorem dla enterotoksyny *A Clostridium difficile*. Można przypuszczać, że endemiczna infekcja naczelnych Starego Świata, których N-glikany mają terminalne struktury Gal α 1 \rightarrow 3Gal szczepem bakterii wytwarzającym toksynę mogła wywołać presję selekcyjną w kierunku ewolucji naczelnych pozbawionych tych struktur i tym samym niepodatnych na działanie patogenu (Macher i Galili, 2008). Wykazano, że struktura Gal α 1 \rightarrow 3Gal obecna w otoczce wirusa ptasiej grypy jest rozpoznawana przez receptory endocytarne komórek gospodarza (ptaka) powodując przyłączenie i wejście cząsteczki wirusa do komórki (De Geus *i in.*, 2013). Brak struktury Gal α 1 \rightarrow 3Gal i wysokie miano przeciwciał anty-Gal α 1 \rightarrow 3Gal są przeszkodą w wykonywaniu ksenoprzeszczepień (Christiansen *i in.*, 2008).

4.5.2. Kwas *N*-glikoliloneuraminowy (Neu5Gc)

Neu5Gc jest wariantem kwasu sjałowego, w którym grupa *N*-acetylowa ma przyłączoną grupę -OH (Ryc. 9). Reakcja przyłączenia tej grupy do kwasu *N*-acetyloneuraminowego jest katalizowana przez hydroksylazę kwasu cytydino-monofosfo-*N*-acetyloneuraminowego (CMAH), kodowana przez gen *CMAH*. Kwas *N*-glikoliloneuraminowy jest produkowany u wszystkich ssaków z wyjątkiem człowieka i małp Nowego Świata (Springer i Gagneux, 2016). Ludzki gen *CMAH* zawiera delecję 478 par zasad, w tym 92 z eksonu 6, w wyniku czego pojawia się przedwczesny kodon stop.

Ponadto kwas *N*-glikoliloneuraminowy zidentyfikowano u ryb kostnych (np. danio pręgowany, rozdymka, tilapia i ryb celakantokształtnych), płazów (np. żaby szponiaste), gadów (jaszczurka anolisa) a także u głowonokordy (lancet), przedstrunowców (żółędziogłowce) i szkarłupni (jeżowca i rozgwiazdy).



Ryc. 9. Struktury kwasów sjałowych.

Geny homologiczne do *CMAH* u ssaków wywodzą się najprawdopodobniej z genów u bezkręgowców, ryb, płazów i owodniowców (wspólny przodek gadów/ptaków i ssaków). Genów homologicznych do mysiego *CMAH* nie znaleziono w genomach żadnego z gatunków ptaków (66 gatunków dostępnych w bazie NCBI/BLAST). Schauer i współpr. zbadali obecność Neu5Gc w tkankach i jajach różnych ptaków (kurczak, kaczka, indyk, gęś, struś, emu, ara, papużka falista, jerzyk i jaskółka) i gadów (m.in. kilku gatunków węży, krokodyli i żółwi), ale nie wykryli Neu5Gc, co sugeruje brak aktywnej formy enzymu u tych gatunków (Schauer *i in.*, 2009). Analiza struktur glikanów glikoprotein białka jaja i przeciwciał IgY kilku rodzajów ptaków,

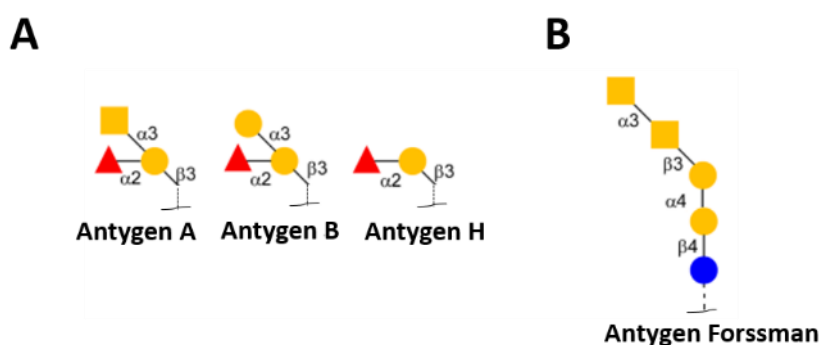
(gołębie i mewy), wykazała obecność reszt kwasu sialowego, ale był to kwas *N*-acetyloneuraminowy (Neu5Ac) (Takahashi *i in.*, 2001; Suzuki *i in.*, 2003, 2009).

Mutacje w enzymie *CMAH* mogą powodować polimorfizm grupy krwi u kotów i psów. Większość kotów syntezuje kwas *N*-glikolineuraminowy, z wyjątkiem niektórych ras, jak brytyjska krótkowłosa. Osobniki tej rasy mają przeciwciała rozpoznające kwas *N*-glikoliloneuraminowy, a przetoczenie im krwi od kota produkującego Neu5Gc może spowodować hemolityczną reakcję poprzetoczeniową (Omi *i in.*, 2016). Natomiast większość psów nie produkuje kwasu *N*-glikoliloneuraminowego w wyniku kilku missensownych mutacji punktowych, z wyjątkiem dalekowschodnich ras jak Shiba inu (Parker *i in.*, 2004; Schauer, 2016).

Uważa się, że do inaktywacji genu *CMAH* u człowieka doszło około 2,8 miliona lat temu. Spowodowało to oporność na zakażenie zarodźcem *Plasmodium falciparum*, która została przełamana ok. 50 000 lat temu (Altman i Gagneux, 2019; Burzyńska *i in.*, 2021). Poza rodzajem *Plasmodium sp.* kwas *N*-glikoliloneuraminowy pełni rolę receptora dla ludzkich wirusów grypy (A i B) czy toksyny subtylasy AB wytwarzanej przez bakterie *E.coli* (Burzynska *i in.*, 2021). Unikalna wśród innych toksyn AB₅, podjednostka A tej toksyny to proteaza serynowa podobna do subtylasy, która specyficznie łączy białko opiekuńcze BiP retikulum endoplazmatycznego, indukując stres ER prowadzący do apoptozy komórki. Podjednostka SubB cytotoksyny wykazuje swoistość względem glikanów kończących się resztą Neu5Gc (połączoną wiązaniem $\alpha 2 \rightarrow 3$ z galaktozą), którego ludzie nie produkują. Może być on jednak przyswajany z diety, zwłaszcza bogatej w czerwone mięso (Beddoe *i in.*, 2010; Tsutsuki *i in.*, 2020; Yahiro *i in.*, 2020).

4.5.3. Antygeny GalNAc/Gal α 1 \rightarrow 3Gal (ABH) i GalNAc α 1 \rightarrow 3GalNAc (Forssman)

Za syntezę antygenów należących do ludzkich układów grupowych krwi ABO i Forssman (Ryc. 10) odpowiedzialne są enzymy należące do rodziny GT6 glikozylotransferaz. U ssaków zidentyfikowano kilku członków tej rodziny: glikozylotransferazy A i B (ABO), Forssman (FS, α 1,3-*N*-acetylogalaktozaminylotransferaza globozydu; *GBGT1*) (Turcot-Dubois *i in.*, 2007). U człowieka zmienność aktywności enzymatycznej wymienionych glikozylotransferaz jest podstawą układów grupowych krwi ABO i Forssman (ISBT: 001 oraz ISBT: 031).



Ryc. 10. Struktury cukrowe antygenów ABH i Forssman

Na scenariusz ewolucyjny dla genów ABO składa się kilkanaście zdarzeń obejmujących m.in. pojawienie się prototypu genu homologicznego do *A3GALT2*, jego duplikacje, dywergencje czy utratę wśród przedstawicieli kręgowców (niektóre gatunki gadów, ptaków i żab z rodzaju *Xenopus*) (Kitano, Blancher i Saitou, 2012). Obecność enzymów zdolnych do syntezowania antygenów układów grupowych krwi ABO i Forssman została stwierdzona u większości kręgowców (Yamamoto 2017). Antygeny A i B występują u kilku gatunków naczelnych, w tym u ludzi, makaków, pawianów, orangutanów i koczodanów; zmiany te nie wykazują jednak polimorfizmu transgatunkowego, tak więc prawdopodobnie wyewoluowały oddzielnie (Segurel *i in.*, 2012). Wśród ptaków jedynie przedstawiciele dwóch gatunków strusia (*Struthionidae*) i kiwi brunatnego (*Apteryx australis*) mają jeden homolog genu *ABO* (Suzuki 2019).

Antygeny układu grupowego krwi ABO mogą pełnić rolę receptorów dla wielu patogenów. Najszerzej opisanym jest bakteria *Vibrio cholerae* czy enterotoksyczne szczepy *E. coli* (ETEC) i bakterie z rodzaju *Streptococcus*. Znaczenie zróżnicowanego polimorfizmu fenotypów ABO wykazano w podatności i rozprzestrzenianiu się zakażeń

wirusowych: rotawirusami, norowirusami czy koronawirusami (Cooling, 2016; Goel *i in.*, 2021).

U człowieka syntaza antygeny Forssman jest w większości populacji nieaktywna. Za przywróconą aktywność u niektórych osób odpowiada mutacja punktowa zamiany reszty argininy na resztę glutaminy w pozycji 296 sekwencji aminokwasowej *GBGT1*. Opisano kilka genów homologicznych do ludzkiej α 1,3-*N*-acetylogalaktozaminylotransferazy globozydu (*GBGT1*, syntaza antygeny Forssman, FS) u niektórych ryb (Turcot-Dubois *i in.*, 2007). Prawie wszystkie gatunki ptaków (w tym ptaków z kladu *Neoaves* (np. gołębia (*Columba livia*), kukułki (*Cuculus canorus*) i sokoła (*Falco peregrinus*)), których genomy dostępne są w bazach danych mają co najmniej jeden homolog mysiego genu kodującego antygen Forssman (60–68% homologii).

Antygen Forssman może pełnić funkcje receptora dla patogenów takich jak enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (w szczególności wytwarzające Stx2e) czy parwowirus B19. Badania wskazują jednak, że wiązanie to należy traktować jako dodatkowe, a nie zastępujące inny receptor (Xu *i in.*, 1999; Müthing *i in.*, 2012; Cooling, 2016).

4.5.3. Antygen Gal α 1 \rightarrow 4Gal

Za syntezę antygenów o terminalnych strukturach Gal α 1 \rightarrow 4Gal należących do ludzkiego układu grupowego P1PK odpowiedzialna jest syntaza Gb3/CD77, należąca do rodziny GT32 glikozylotransferaz kodowana przez gen *A4GALT* (podrozdział 4.1.4). Płazy, ryby chrzęstne i celakantokształtne również mają homologi ludzkiego *A4GALT*, podczas gdy nie znaleziono homologów u *Actinoptergii* (np. danio pręgowany i medaka). U gadów, przedstawiciele *Crocodylia* (cztery gatunki krokodyli) i *Tesudinata* (cztery gatunki żółwi) mają pojedyncze homologi *A4GALT*, a *Lepidosauria* (węże i jaszczurki) mają jeden homolog *A4GALT*. Większość gatunków ssaków ma pojedynczy homolog ludzkiego genu *A4GALT*, który najprawdopodobniej koduje syntazę Gb3/CD77. Wyjątkiem są cztery gatunki *Eutheria* (np. marmozeta białoczuba (*Callithrix jacchus*) i płetwal karłowaty (*Balaenoptera acutorostrata*)) oraz dziobak (*Ornithorhynchus anatinus*), które mają dwa homologi *A4GALT*. Brak genu *A4GALT* lub jego skrócona forma zostały stwierdzone u dwóch gatunków *Eutheria* (mroczek brunatny (*Eptesicus fuscus*) i nietoperz Brandta (*Myotis brandti*)). Jednak homologia sekwencji

aminokwasowych między syntazami Gb3/CD77 ssaków/ptaków a ich homologów u niższych kręgowców (płazów i ryb) jest niska (40–60%), i trudno jest określić aktywność enzymatyczną lub swoistość substratową na podstawie porównania jedynie samych sekwencji.

Badanie występowania genów *A4GALT* wśród ptaków zasugerowało jedną wyraźną różnicę opartą na ich filogenezie. Sześć gatunków *Palaeognathae* (struś, emu, dwa gatunki kiwi i dwa gatunki cykorii) oraz sześć gatunków *Galloanserae* (kaczka krzyżówka, gęś łabędzie, kura, indyk, przepiórka i perliczka) ma jeden homolog *A4GALT*. Chociaż u dwóch gatunków kiwi stwierdzono dwa homologu genu *A4GALT*, to jeden z tych genów ma skróconą sekwencję, w której brak regionu kodującego miejsce aktywne. Paralog *A4GALT* u przedstawicieli *Palaeognathae* i *Galloanserae* najprawdopodobniej koduje syntazę Gb3/CD77. U przedstawicieli 54 gatunków *Neoaves* znaleziono wiele homologów *A4GALT* (0-7 genów), przy czym dwie trzecie gatunków tej parvklasy miało więcej niż dwa homologu *A4GALT*. Analiza *in silico* wykazała, że w genomie gołębia istnieje 7 genów mogących kodować syntazę Gb3/CD77 (Tabela 3).

Tabela 3. Podobieństwo (%) sekwencji nukleotydowych 7 genów gołęziej syntazy Gb3/CD77

GEN	<i>A4GALT6</i>	<i>A4GALT7</i>	<i>A4GALT3</i>	<i>A4GALT2</i>	<i>A4GALT1</i>	<i>A4GALT4</i>	<i>A4GALT5</i>
<i>A4GALT6</i>	-	72.79	63.15	62.30	63.91	64.55	72.18
<i>A4GALT7</i>	72.79	-	84.40	82.96	83.89	83.70	85.06
<i>A4GALT3</i>	63.15	84.40	-	93.32	92.40	90.56	93.33
<i>A4GALT2</i>	62.30	82.96	93.32	-	93.52	90.04	93.90
<i>A4GALT1</i>	63.91	83.89	92.40	93.52	-	91.22	93.36
<i>A4GALT4</i>	64.55	83.70	90.56	90.04	91.22	-	96.34
<i>A4GALT5</i>	72.18	85.06	93.33	93.90	93.36	96.34	-

Obecność terminalnej struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal opisano u ssaków w glikosfingolipidach produkowanych przez komórki krwi oraz komórki nabłonka i śródbłonka (Yang, Bergström i Karlsson, 1994). Epitop Gal α 1 \rightarrow 4Gal występuje na glikosfingolipidach i na glikoproteinach, takich jak N-glikany (Suzuki, Laskowski i Lee, 2006; Stenfelt *i in.*, 2019). Strukturę Gal α 1 \rightarrow 4Gal znaleziono w O-glikanach z jerzykowatych (*Collocalini*) (Wieruszkeski *i in.*, 1987), kilku płazów np. żaby (Guerardel *i in.*, 2000; Delplace *i in.*, 2002) oraz aksolotla (*Ambystoma mexicanum*) (Strecker *i in.*,

1992) czy w oligosacharydach pochodzących z N-glikanów z rekina (*Scyliorhinus caniculus*) (Plancke *i in.*, 1996).

Analiza glikoprotein z jaj 181 gatunków ptaków wykazała, że struktura Gal α 1 \rightarrow 4Gal występuje u licznych przedstawicieli *Neoaves* i może mieć związek z ewolucją współczesnych ptaków (Suzuki, Laskowski i Lee, 2006). Wśród współczesnych ptaków, jedynie osobniki należące do *Ratitae/Galloanserae* nie produkują glikoprotein zawierających struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal, natomiast ptaki należące do *Neoaves* w większości mają glikoproteiny z taką strukturą. Genetyczne podstawy tej różnicy pozostają niewyjaśnione.

Antygen P^k (dalej stosowana będzie nazwa Gb3) może pełnić rolę receptora dla adhezyny SadP bakterii *Streptococcus suis*, cytotoksyny VacA *Helicobacter pylori* (Roche *i in.*, 2007), oraz dla adhezyny Pap uropatogennych bakterii *E. coli*, które mają fimbrie P (Ferrando *i in.*, 2017). Ponadto Gb3 uznawany jest za główny receptor dla toksyn Shiga (Stx) produkowanych przez bakterie *Shigella dysenteriae* serotypu 1 oraz enterokrwotoczne szczepy bakterii *E. coli* (Bruyand *i in.*, 2018; Lee i Tesh, 2019).

4.6. Toksyny Shiga

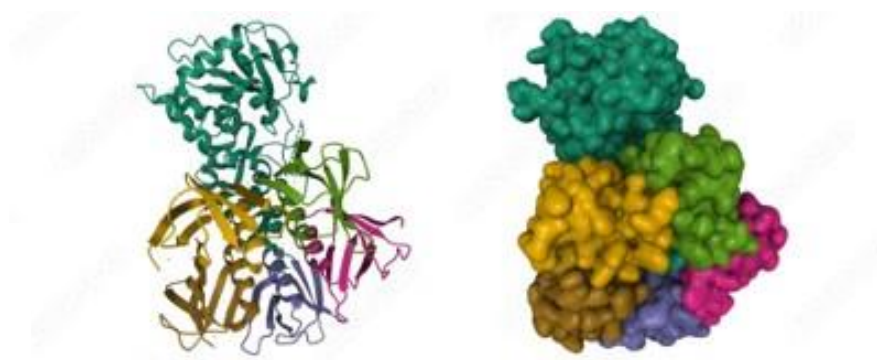
4.6.1. Nazewnictwo

Toksyny te zawdzięczają nazwę japońskiemu mikrobiologowi Kiyoshiemu Shidze, który w 1897 odkrył bakteryjne pochodzenie czerwonki wywoływanej przez *Shigella dysenteriae* (Shiga 1898). Opisanie cytotoksyny wytwarzanej przez bakterie *E. coli*, toksycznej dla komórek Vero (linia wyprowadzona z nerki afrykańskiej małpy zielonej), zaowocowało nazwą „werotoksyna” (verotoxin, VT) (Konowalchuk, Speirs i Stavric, 1977). Później okazało się, że niektóre bakterie *E. coli* wytwarzają toksyny podobne do toksyny produkowanej przez *S. dysenteriae* (O'Brien *i in.*, 1984). Dalsze badania wykazały, że „werotoksyny” i „toksyny podobne do Shiga” są identyczne.

4.6.2. Struktura

Toksyny Shiga (Stx) są zaliczane do klasy toksyn białkowych określanymi jako holotoksyny AB₅ (Fan *i in.*, 2000). Do tej grupy należą też toksyna krztuśca (Ptx), cholery (Ctx), termolabilne enterotoksyny wytwarzane przez *E. coli* (LT-I i LT-II) oraz subtylaza

(SubAB) (Paton *i in.*, 2004; Johannes i Römer, 2010). Toksyny te składają się z pojedynczej podjednostki A oraz 5 podjednostek B (Ryc. 11). Aktywność enzymatyczna odpowiedzialna za cytotoksyczność zlokalizowana jest w podjednostce A (o długości 293 aa w Stx1 i 297 w Stx2), która jest często klasyfikowana jako białko inaktywujące rybosom typu II (RIP, *ribosome-inactivating protein*) lub toksyna białkowa kierowana przez ER (ERT, *ER-routing protein toxin*). Podjednostka A składa się z fragmentów A1 oraz A2 połączonych mostkiem disiarczkowym. Pentamer podjednostek B tworzy por, w którym znajduje się C-końcowy fragment podjednostki A. Każda z podjednostek B zbudowana jest z 69 (Stx1) lub 71 (Stx2) reszt aminokwasowych i obejmuje trzy miejsca wiązania receptora. Toksyna wiąże się do powierzchni komórki za pośrednictwem pentameru podjednostek B, które mogą rozpoznawać do piętnastu cząsteczek receptora (Scheutz *i in.*, 2012; Silva *i in.*, 2017).



Ryc. 11. Struktura 3D toksyny Shiga typu 1 (Stx1) z *E. coli* O157:H7. (Na podstawie struktury krystalicznej 1DM0 w bazie danych białek (PDB, protein data base))

4.6.3. Klasyfikacja

Różnice w strukturze pomiędzy typami i podtypami toksyn Shiga mają mały wpływ na swoistość i siłę wiązania tych toksyn. Uwalniane przez enterokrwotoczne szczepy *E. coli* wytwarzające Stx (STEC) toksyny Shiga dzielą się na dwa typy: Stx1 (prawie identyczny z toksyną wydzielaną przez *S. dysenteriae* serotypu 1), oraz Stx2, która ma podobną strukturę, ale różne sekwencje aminokwasowe (Liu *i in.*, 2021). Stx2 wykazuje większą toksyczność i częściej wiąże się z ciężkim przebiegiem infekcji STEC w porównaniu do Stx1 (Melton-Celsa 2014). Warianty Stx1 i Stx2 można podzielić na podtypy w oparciu o podobieństwo sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej. Stx1 ma co najmniej 4 podtypy, podczas gdy Stx2 ma 12 podtypów (Tabela 4). Różnice

w strukturze wśród podtypów toksyn często powodują zmiany w wiązaniu receptorów i toksyczności (Silva, Brandon i Skinner Xiaohuaahe, 2017). Uważa się, że obecność genów kodujących Stx w szczepach *E. coli* może być konsekwencją horyzontalnego transferu genów ze szczepów *Shigella*, w którym pośredniczą bakteriofagi lambdoidalne (Pinto *i in.*, 2021).

Tabela 4. Typy i subtypy toksyn Shiga

Typ	Podtyp	Odnosićnik
Stx1	Stx1a	(O'Brien <i>i in.</i> , 1984)
	Stx1c	(Zhang <i>i in.</i> , 2002)
	Stx1d	(Burk <i>i in.</i> , 2003)
	Stx1e ⁺	(Probert, McQuaid i Schrader, 2014)
Stx2	Stx2a	(O'Brien <i>i in.</i> , 1984)
	Stx2b	(Paton <i>i in.</i> , 1992)
	Stx2c	(Russmann <i>i in.</i> , 1994)
	Stx2d	(Samuel <i>i in.</i> , 1990)
	Stx2e	(Gannon i Gyles, 1990)
	Stx2f	(Schmidt, Scheef, Morabito, Caprioli, Lothar H. Wieler, <i>i in.</i> , 2000)
	Stx2g	(Leung <i>i in.</i> , 2003)
	Stx2h*	(Bai <i>i in.</i> , 2018)
	Stx2i*	(Lacher <i>i in.</i> , 2016)
	Stx2j*	(Koutsoumanis <i>i in.</i> , 2020)
	Stx2k*	(Hughes <i>i in.</i> , 2019)
	Stx2l*	(Lacher <i>i in.</i> , 2016)

⁺ znaleziono tylko u *Enterobacter cloacae*

*przypisane tymczasowo

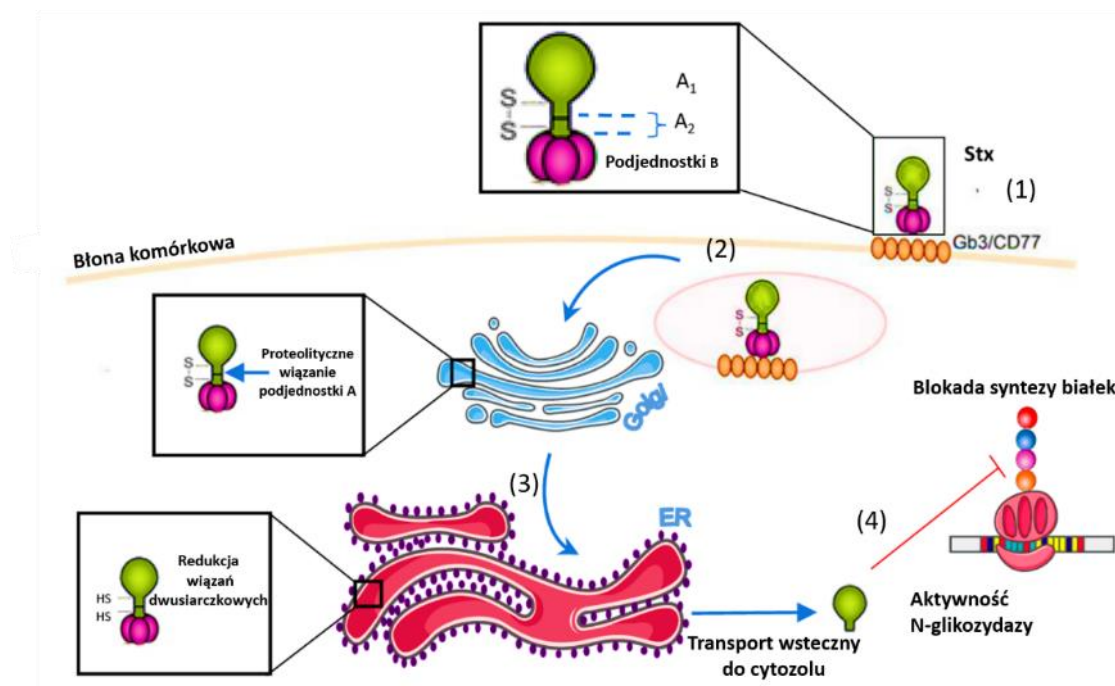
4.6.4. Mechanizm działania

Toksyny Shiga są odporne na działanie enzymów trawiennych, co umożliwia im uniknięcie degradacji w przewodzie pokarmowym. Trawienie trypsyną nie wpływa na biologiczną aktywność holotoksyny Stx1, ale powoduje ok. trzydziestokrotny wzrost aktywności holotoksyny Stx2 (MacLeod *i in.*, 1991). W ludzkiej okrężnicy Stx mogą być uwalniane przez STEC w postaci wolnej poprzez indukowaną przez fagi lizę komórek bakteryjnych lub poprzez przyłączenie do wydzielanych przez bakterie pęcherzyków

zewnętrznych (OMV, *outer membrane vesicles*). Po wnikięciu do krwiobiegu, pentameryczne podjednostki toksyn Shiga wiążą się do GSL serii globo, wykazując silną preferencję dla trisacharydu Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc. Toksyna Stx2e (patogenny dla świń podtyp Stx), wykorzystuje jako receptor również Gb4Cer (GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc), Gb5Cer ze strukturą Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc) oraz GalNAc α 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer, czyli antygen Forssman.

Badania mające na celu identyfikację nieglikosfingolipidowego receptora dla Stx na ludzkich granulocytach obojętnochłonnych ostatecznie wykazały, że jest nim cząsteczka TLR4 (Brigotti *i in.*, 2013). Wzajemne oddziaływanie Stx z TLR4 sugeruje mechanizm interakcji białko-białko między podjednostką A Stx a TLR4, który może działać niezależnie od interakcji białko-cukier między pentamerem B Stx a Gb3Cer (Gallegos *i in.*, 2012; Detzner, Krojnewski, *i in.*, 2021).

Gb3 jest uważany za główny receptor dla obu typów holotoksyn Stx, przez co możliwa jest konkurencja toksyn o ten sam receptor. W testach *in vitro* wykazano, że holotoksyna Stx1 wiąże się do Gb3 szybciej niż Stx2, tym samym blokując jej dostęp do receptora (Binnington *i in.*, 2002). Wykazano, że zastosowanie inhibitora szlaku biosyntezy glikosfingolipidów powoduje całkowite zahamowanie efektu cytotoksycznego Stx2 i częściowe dla Stx1, co sugeruje, że Stx1 wiąże się również do receptorów glikoproteinowych (Szymczak-Kulus *i in.*, 2021). Wpływ na siłę wiązania Stx1 i Stx2 do komórki gospodarza ma również skład dwuwarstwy lipidowej (Hoey *i in.*, 2003; Smith *i in.*, 2006). Ze względu na wiązanie się do różnych mikrodomen w błonie komórkowej, Stx1 i Stx2 mogą być transportowane do cytozolu różnymi drogami (Tam *i in.*, 2008).



Ryc. 12. Schemat mechanizmu działania toksyn Shiga. (1) Wiązanie do Gb3 na powierzchni komórki. (2) Endocytoza. (3) Transport do aparatu Golgiego a następnie do ER. StxA1 hamuje syntezę białek w cytozolu (4) przez odcięcie reszty adeniny z 28S RNA podjednostki 60S rybosomu. Przygotowane na podstawie: (Robert i Wiels, 2021).

Po związaniu do powierzchni komórki, toksyny mogą być internalizowane za pośrednictwem kilku mechanizmów. Po rozpoznaniu Gb3, toksyna Shiga może wniknąć do komórki w wyniku endocytozy, a następnie zostać przetransportowana do cytozolu (Ryc. 12). Linie komórkowe z zaburzonymi zdolnościami sortowania endosomów w aparatach Golgiego są odporne na cytotoksyczny efekt Stx, mimo że wiążą i wchłaniają toksyny (Sandvig *i in.*, 1992). Po fuzji endosomów z pęcherzykami, pęcherzyki zawierające toksynę są transportowane wzdłuż mikrotubul do części trans aparatu Golgiego (Hehnly, Sheff i Stamnes, 2006). Podczas gdy receptor powraca na powierzchnię komórki, toksyna pozostaje w komórce (nawet jeżeli nie jest translokowana do cytozolu). Wykorzystując transport wsteczny przez aparat Golgiego cząsteczka toksyny Stx dociera do retikulum endoplazmatycznego i błony jądrowej (Sandvig *i in.*, 1992). Dotarcie do ER jest warunkiem wywarcia działania cytotoksycznego, ponieważ tylko tutaj może dojść do translokacji toksyny do cytozolu. Niektóre komórki mają alternatywny szlak endocytozy dla Stx, w którym pośredniczą cząsteczki Gb3 zlokalizowane poza tratwami lipidowymi w błonie komórkowej. Endocytoza niezależna od klatryny powoduje transport Stx do późnych endosomów, w których toksyna jest degradowana (Falguières *i in.*, 2001). Stx może być skutecznie

transportowana w taki sposób aż do aparatu Golgiego, ale komórki wykazujące tylko taki rodzaj transportu są ok. 1000 razy mniej wrażliwe na toksynę w porównaniu do komórek zdolnych do transportu do ER i błony jądrowej (Arab i Lingwood, 1998). Podczas transportu do ER podjednostki StxA oddzielają się od podjednostek B po proteolizie i redukcji wiązań disiarczkowych i wiążą się do rybosomu (Garred *i in.*, 1997). Zdolność do inaktywacji podjednostki 60S rybosomu czyni z toksyny Stx silny inhibitor syntezy białek (Menge, 2020). Aktywność N-glikozydazowa fragmentu A1 polega na wiązaniu i odcinaniu konserwatywnej reszty adeniny w pętli α -sarcyny 28S rybosomalnego RNA eukariotycznej podjednostki 60S rybosomu. Enzymatyczna inaktywacja eukariotycznych rybosomów powoduje nieodwracalne zahamowanie biosyntezy białek komórkowych. Dotyczy to szczególnie tych rybosomów, które są związane z mRNA i są biochemicznie aktywne w czasie, gdy Stx rozszczepia wiązanie glikozydowe, ponieważ Stx wiążą tylko podjednostki rybosomalne 60S, będące częścią pełnego rybosomu. Fragment A1 toksyny Stx2 wykazuje większe powinowactwo do rybosomów, depurykuje je z większą szybkością i hamuje translację bardziej wydajnie niż fragment A1 Stx1 (Basu *i in.*, 2015). Działanie cytotoksyczne polega nie tylko na zahamowaniu translacji (Shi *i in.*, 2017), ale także na uruchomieniu odpowiedzi na stres rybotoksyczny, która wywołuje uszkodzenie rybosomu przez podjednostkę A1. Odpowiedź ta uruchamia kaskady sygnałowe prowadzące do apoptozy (Johannes i Römer, 2010; Detzner, Pohlentz i Müthing, 2020). Uważa się, że stres rybotoksyczny i stres związany z ER odgrywają większą rolę w cytotoksyczności Stx niż zahamowanie syntezy białek (Lee i Tesh, 2019).

Różnice w mechanizmach wiązania receptorów Stx1 i Stx2 oraz różnice w preferencjach wiązania receptorów między Stx1 i Stx2 mogą przyczyniać się do różnic w cytotoksyczności obserwowanych między toksynami. Holotoksyny Stx wnikają do komórek poprzez szlaki endocytozy zależne od klatryny lub niezależne od klatryny w zależności od typu badanej komórki. Uważa się, że proces zależny od klatryny jest najczęstszym szlakiem wychwyty komórkowego po związaniu receptora przez toksyny (Saleh i Gariépy, 1993).

Pełne spektrum mechanizmów wychwyty komórkowego Stx nie jest jeszcze dobrze scharakteryzowane. Na przykład Malyukova i współpr. (Malyukova *i in.*, 2009) wykazali, że makropinocytoza może być alternatywnym szlakiem wychwytywania Stx do komórek, które nie wykazują ekspresji Gb3. Wychwyty toksyn przez komórki nabłonka

jelitowego pozbawione Gb3 angażuje nie tylko te komórki jako inercyjną drogę transportu, ale również wpływa na ich funkcje *in vivo* i *in vitro*. Ludzkie neutrofile przenoszą toksyny, mimo braku receptorów (Gb3) dla Stx (Brigotti *i in.*, 2013).

Interakcja pomiędzy czynnikami wirulencji STEC a komórkami krwi sprzyja agregacji komórek krwi i ekspresji czynnika tkankowego (TF) na błonach komórkowych, jak również wydzielaniu mikrocząstek bogatych w TF. Proces ten jest wzmagany przez krążące cytokiny oraz uszkodzenia śródbłonka wywołane przez toksyny. Produkcja tych mikrocząstek TF sprzyja występowaniu zakrzepów w przebiegu zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) (Ståhl *i in.*, 2009). Badania *in vitro* wykazały, że mikropęcherzyki pochodzące z ludzkich komórek krwi zawierające Stx ulegają endocytozie w ludzkich kłębuszkowych komórkach śródbłonka, gdzie mikropęcherzyki uwalniają swoją zawartość Stx, a toksyna dociera do rybosomów, powodując śmierć komórek. Istnieją dowody na to, że mikropęcherzyki zawierające Stx2 odgrywają kluczową rolę w transporcie i przenoszeniu Stx2 *in vivo*, a nawet są przenoszone z komórki do komórki (Ståhl *i in.*, 2015), co sugeruje, że ukierunkowanie na komórki gospodarza nieprodukujące Gb3 może być niedocenianym mechanizmem patogennym (Menge, 2020; Detzner, Pohlentz i Müthing, 2020).

4.6.5. Znaczenie epidemiologiczne

Głównym szczepem STEC zakażającym ludzi jest *E.coli* O157:H7 (Johannes i Römer, 2010). Szacuje się, że rocznie na całym świecie około 2,8 miliona ostrych zachorowań jest powodowanych przez te bakterie (Majowicz *i in.*, 2014). Zakażenia STEC wywołują krwotoczne zapalenie jelita grubego, które często prowadzi do wystąpienia zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS, *hemolytic uremic syndrome*), ciężkiego powikłania charakteryzującego się m.in. małopłytkowością, niedokrwistością i ostrą niewydolnością nerek (Lingwood 2020). Grupą obarczoną największym ryzykiem rozwoju HUS są osoby starsze oraz dzieci poniżej 10 roku życia (ok. 15% pacjentów) (Tarr, Gordon i Chandler, 2005).

STEC mogą wywoływać poważne epidemie (Kim, Lee i Kim, 2020). W 1982 r. w stanach Oregon i Michigan (Stany Zjednoczone Ameryki Północnej) miały miejsce dwie epidemie zachorowań na krwotoczne zapalenie okrężnicy i HUS. Szczep *E. coli* O157:H7 został wyizolowany z próbki kału pacjentów i uznany za przyczynę choroby (Rangel *i in.*, 2005). Po roku obecność toksyn Shiga została potwierdzona przez porównanie toksyn

oczyszczonych z *S. dysenteriae* i trzech izolatów *E. coli* z epidemii (O'Brien *i in.*, 1984), w wyniku czego szczep STEC O157 został uznany za szczep stanowiący poważne zagrożenie dla przemysłu i funkcjonowania szpitali. W ciągu 30 lat od pierwszego raportu na temat szczepu O157:H7 opisano w Stanach Zjednoczonych łącznie 740 ognisk zakażeń spowodowanych przez STEC O157:H7 i O157:NM; 13 526 przypadków zakończyło się 2765 hospitalizacjami (20%), u 653 rozwinął się HUS (4,8%), a 73 pacjentów zmarło (0,5%) (Rangel *i in.*, 2005; Heiman *i in.*, 2015). Infekcje innymi szczepami (O26, O103, O91, O145, i O146) powodują mniej epidemii niż O157, mimo że występują dwukrotnie częściej (Scallan *i in.*, 2011; Terajima *i in.*, 2014). W latach 1998 - 2016, region europejski (EUR) i region Zachodniego Pacyfiku (WPR) zgłosiły 211 ognisk zakażeń STEC (EUR: 176, WPR: 35), a w obu Amerykach zgłoszono 708 ognisk zakażeń (FAO/WHO 2018). W Japonii doszło do największej zarejestrowanej epidemii STEC O157 w regionie Zachodniego Pacyfiku: ponad 12 680 pacjentów, z czego u 121 wystąpił HUS (Japonia, 1996) (Fukushima *i in.*, 1999). Po tej epidemii częstość przypadków STEC wzrosła: od 1999 do 2012 r. w Japonii zgłoszono ponad 3000 przypadków, podczas gdy w poprzednich 5 latach (1991–1995) średnia roczna wynosiła 105 przypadków (Terajima *i in.*, 2014). Najpoważniejsza epidemia STEC nie-O157 (O104) miała miejsce w Europie (Niemcy, 2011): w okresie 3 miesięcy zgłoszono 3816 przypadków. Początkowo uważano, że źródłem zakażenia były produkty mięsne lub ogórki, ale później okazało się, że były to kiełki kozieradki. Pomimo mniejszej liczby przypadków niż podczas epidemii w Sakai, w Niemczech odsetek HUS ($n = 845$, 22,4%) i zgonów ($n = 54$) był wyższy (Frank *i in.*, 2011).

Według raportów Europejskiego Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób, łączna liczba potwierdzonych zakażeń STEC wyniosła 3 573 w 2009 r. i wzrosła do 6 073 przypadków w 2017 r. (Anon 2018). Najczęściej opisywaną serogrupą w latach 2009-2017 była O157, a następnie O26, O103, O91, O145 i O146. Udział serogrupy O157 spadł jednak z 51,7 do 31,9%, podczas gdy odsetek zakażeń szczepami innymi niż O157 odpowiednio wzrósł. Wśród 31 krajów w Europie, Niemcy i Wielka Brytania miały najwyższy wskaźnik infekcji STEC wśród ludzi (wg danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority, EFSA): liczba zakażeń STEC/100 000 mieszkańców) (Kim, Lee i Kim, 2020).

4.6.6. Zwierzęta jako rezerwuary enterokrwotocznych szczepów *E. coli* produkujących toksyny Shiga

Głównymi źródłami infekcji bakteriami produkującymi toksyny Shiga jest skażona żywność (jak np. surowe mięso, mleko, a także warzywa), woda oraz bezpośredni kontakt ze zwierzętami będącymi nosicielami tych szczepów bakterii. Odnotowano również zarażenia w wyniku kontaktów międzyludzkich, jednak większość zidentyfikowanych zakażeń miała pochodzenie odzwierzęce (Persad i Lejeune, 2014; Radosavljević, Finke i Belojević, 2016).

STEC wykryto u wielu gatunków ssaków, ptaków, ryb i kilku gatunków owadów. Namnażanie bakterii może zachodzić w przewodzie pokarmowym niektórych zwierząt, zwłaszcza przeżuwaczy, które uważa się za główne rezerwuary szczepów STEC. Nosicielstwo może być bierne lub przejściowe, bez znaczącego wzrostu liczby bakterii w żywicielu. Zwierzęta mogą być klasyfikowane jako gatunki rezerwuarowe, żywiciele zewnętrzni lub żywiciele końcowi. Klasyfikacja ta opiera się na zdolności zwierzęcia do przenoszenia STEC na inne gatunki zwierząt oraz utrzymania zakażenia STEC przy braku ciągłej ekspozycji na bakterie. Żywiciele dodatkowi, chociaż zdolni do przenoszenia STEC na inne zwierzęta, nie są w stanie utrzymać infekcji przy braku powtarzającej się ekspozycji na patogen. Duża różnorodność gatunków żywicieli rezerwuarowych i dodatkowych skutkuje złożonymi ścieżkami przenoszenia. Dowody epidemiologiczne wskazują, że ptaki, świnie, psy i konie mogą być żywicielami dodatkowymi (Fairbrother i Nadeau, 2006; Doane *i in.*, 2007; Gioia-Di Chiacchio *i in.*, 2016; Borges *i in.*, 2017; Mughini-Gras *i in.*, 2017).

Wykazano, że świnie przenoszą i wydzielają STEC przez okres do 2 miesięcy po zakażeniu (Booher, Cornick i Moon, 2002). Ponadto, ponieważ świnie mają w jelitach receptory Stx (Gb3), są one podatne na szczepy STEC produkujące Stx2e, które powodują obrzęk z objawami klinicznymi (zaburzenia koordynacji, obrzęk powiek, w ostatniej fazie częściowy paraliż) i wysoką śmiertelnością (Steil *i in.*, 2016). Co więcej, opisano przypadki infekcji w wyniku kontaktu z końmi (Luna *i in.*, 2018), chociaż konie nie są uważane za rezerwuary STEC ze względu na niską częstość występowania tego patogenu u przedstawicieli tego gatunku (Lengacher *i in.*, 2010). Opisano również przypadki stwierdzenia nosicielstwa STEC u przedstawicieli drobiu domowego, takich jak kura domowa, kaczka i indyk (Doane *i in.*, 2007; Koochakzadeh *i in.*, 2015; Russo *i in.*, 2021).

Wykazano również, że kury, które zostały eksperymentalnie inokulowane STEC O157, mogą wydalać bakterie w kale przez prawie rok (Schoeni i Doyle, 1994).

Zwierzęta towarzyszące (domowe) mogą odgrywać dużą rolę w epidemiologii zakażeń STEC, ponieważ mogą być bezobjawowymi nosicielami wielu serotypów STEC (Hogg *i in.*, 2009; Rumi *i in.*, 2012). Opisano kilka infekcji mających swoje źródło u psów i kotów (Persad i Lejeune, 2014; McFarland *i in.*, 2017). STEC został również znaleziony w odchodach dzikich psowatych, ale nie kotowatych (Mora *i in.*, 2012).

Występowanie STEC u dzikich zwierząt, które mogą przenosić bakterie na ludzi poprzez bezpośredni i/lub pośredni kontakt, jest ważne z punktu widzenia zdrowia publicznego. Wykazano, że STEC można znaleźć u przedstawicieli miejskich gatunków zwierząt, takich jak szczury (Himsworth *i in.*, 2015), gołębie (Schmidt, Scheef, Morabito, Caprioli, Lothar H Wieler, *i in.*, 2000; Morabito *i in.*, 2001; Ghanbarpour i Daneshdoost, 2012; Gargiulo *i in.*, 2014; Murakami *i in.*, 2014; De Oliveira *i in.*, 2018; Luzzago *i in.*, 2021) i muchy (Kobayashi *i in.*, 1999). Wiele gatunków dzikich ptaków, które żyją w pobliżu hodowli, składowisk odpadów i obszarów zamieszkałych przez ludzi, również zostało zidentyfikowanych jako potencjalne źródła infekcji STEC (Nielsen *i in.*, 2004; Foster *i in.*, 2006; Pedersen i Clark, 2007; Koochakzadeh *i in.*, 2015; Kuczkowski *i in.*, 2016). Pasza dla zwierząt domowych stanowi dobre źródło pożywienia dla gryzoni, ptaków i owadów. Zwierzęta te w poszukiwaniu łatwo dostępnego pokarmu trafiają do gospodarstw, gdzie mogą przenosić STEC na zwierzęta hodowlane i ludzi.

Dzikie zwierzęta przebywające w pobliżu obiektów inwentarskich mogą ulegać zakażeniom STEC (Espinosa *i in.*, 2018). Wykazano, że niektóre duże ogniska zakażeń STEC zostały wywołane przez odchody dzikich zwierząt (Söderqvist *i in.*, 2019). Dzikie zwierzęta zostały zidentyfikowane jako źródło STEC w latach 90., a ponad 70% odpowiednich badań opublikowano od przełomu XX/XXI wieku identyfikując coraz większą liczbę gatunków dzikich zwierząt, w tym ptaków jako żywicieli rezerwuarów lub dodatkowych STEC (Wallace, Cheasty i Jones, 1997; Bonnedahl *i in.*, 2009; Persad i Lejeune, 2014; Fadel, Afifi i Al-Qabili, 2017; Sanches *i in.*, 2017; Espinosa *i in.*, 2018; Murphy *i in.*, 2021). Niewiele badań dotyczy jednak roli dzikich ptaków w przenoszeniu STEC na ludzi i zwierzęta domowe oraz w łańcuchu pokarmowym. Ptaki mogą mieć bezpośredni kontakt z ludźmi, zwierzętami domowymi i dzikimi, zwiększając w ten sposób częstość występowania STEC (Reed *i in.*, 2002; Kirschner *i in.*, 2004; Wani

i in., 2004; Kobayashi *i in.*, 2009; Kauffman i LeJeune, 2011; Williams, Pearl i LeJeune, 2011; Yuri *i in.*, 2016; Louise Wester *i in.*, 2021; Seleem, Sabry i Abdel-Moein, 2021). Monitorowanie wędrówek i liczebności niektórych gatunków ptaków jako działanie prewencyjne może pomóc w ograniczaniu rozprzestrzeniania się STEC (Daszak, Cunningham i Hyatt, 2000; Tsiodras *i in.*, 2008; Radhouani *i in.*, 2012).



5. CEL PRACY

Szczepy STEC i *Shigella dysenteriae* typu 1 wytwarzające toksyny Shiga stanowią rosnące zagrożenie dla ludzi. Głównym receptorem dla toksyn Shiga jest glikosfingolipidowy antygen grupowy krwi P^k (Gb3) należący do ludzkiego układu grupowego krwi P1PK. Byłoby od lat uznawane jest za główny rezerwuuar dla patogennych bakterii *E. coli* zakażających człowieka. Wśród gatunków rozważanych jako nośniki STEC, ptaki wymieniane są jako grupa o dużym potencjale epidemiologicznym ze względu na możliwość łatwego przenoszenia patogenów na duże odległości i łatwość dostępu do siedlisk ludzkich i zwierząt hodowlanych. Podobnie jak by było wykazują one oporność na zakażenia STEC, mimo obecności funkcjonalnych receptorów. Ptasia syntaza Gb3/CD77 nie jest tak dobrze scharakteryzowana jak ludzki enzym, a jej rola w zakażeniach STEC i podstawy mechanizmów molekularnych oporności ptaków na działania toksyn Shiga są nieznane i nigdy dotąd nie były przedmiotem badań.

Celem pracy było:

1. Określenie poziomu homologów antygenów ludzkiego układu grupowego krwi P1PK u ptaków;
2. Molekularna charakterystyka syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu z gołębi;
3. Próba odpowiedzi na pytanie: dlaczego ptaki są odporne na zakażenia STEC?



6. MATERIAŁY I METODY

Jeżeli nie wykazano inaczej, wszystkie użyte odczynniki i drobny sprzęt laboratoryjny pochodziły z firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

6.1. Przeciwciała

Tabela 5. Przeciwciała monoklonalne

Przeciwciała	Klon	Producent/Odnośnik
anty-P1	P3NIL100	Immucor Inc
anty-P1	650	Ce-Immundiagnostika
anty-CD77	5B5	BioLegend
anty-NOR*	nor118	(Duk i in., 2005)
anty-Gb4*	PA5	(Okuda 2017)
anty-Stx1B, koniugat z FITC	13C4	Merck
mysie anty-Stx1B		Otrzymano od dra B. Bednarza, IITD PAN
anty-6x-His Tag	HIS.H8	Thermo Fisher Scientific

* użyty jako supernatant z hodowli komórek hybrydoma

Tabela 6. Przeciwciała poliklonalne

Przeciwciało	Koniugat	Producent
Kozie anty-ludzkie poliklonalne przeciwciało (IgG/IgA/IgM)	Biotyna	Sigma-Aldrich
Kozie anty-mysie poliklonalne przeciwciało (IgG/A/M (H/L))	Biotyna	BioRad Laboratories
Kozie anty-ludzkie (IgM) przeciwciało	FITC	Thermo Fisher Scientific
Kozie anty-mysie (IgM) przeciwciało	FITC	Thermo Fisher Scientific
Kozie anty-mysie poliklonalne (IgG/IgA/IgM - F(ab') ₂ fragment) przeciwciało	FITC	Agilent Technologies
Kozie anty-ptasie poliklonalne (IgG (H+L)) przeciwciało	HRP	MyBioSource

6.2. Izolacja, manipulacja i analiza gotębiego DNA

6.2.1. Pobranie i przechowywanie krwi ptasiej

Krew została pobrana od zdrowych pacjentów Kliniki Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w ramach badań okresowych. Do doświadczeń związanych z izolacją DNA lub badaniem aglutynacji krew pobrano do probówek z EDTA jako antykoagulantem, natomiast do doświadczeń z badaniem oddziaływania surowic krew pobierano bez użycia czynników antykoagulacyjnych. Analizy z użyciem cytofluorometrii przepływowej były wykonywane maksymalnie w ciągu 24 h od pozyskania próbki krwi.

6.2.1.1. Analiza cytofluorometryczna antygenów układu grupowego krwi P1PK

Obecność homologów antygenów układu grupowego krwi P1PK na ptasich erytrocytach przeprowadzono z użyciem cytofluorometrii przepływowej z wykorzystaniem przeciwciał: anty-P1/P^k (klon 650, określane jako „mysie”), anty-P1 (klon P3NIL100, określane jako „ludzkie”) w rozcieńczeniu 1:2 000 oraz anty-NOR (klon nor118, nadsącz z hodowli komórek hybrydoma) w rozcieńczeniu 1:50. Jako przeciwciał drugorzędowych użyto skoniugowanych z fluorochromem (FITC) przeciwciał wskazanych w Tabeli 6 w rozcieńczeniu 1:100. Rozcieńczenia dla wszystkich użytych przeciwciał zostały przygotowane w buforze PBS, pH 7,4. Inkubacje z przeciwciałami lub podjednostką 1B toksyny Shiga (w końcowym stężeniu 1 µg/ml) prowadzono na lodzie przez 40 min. (dla przeciwciał skoniugowanych z FITC w ciemności) a następnie 3 razy przepłukano próbki zimnym roztworem PBS, pH 7,4. Następnie zawieszono erytrocyty w 500 µL PBS, pH 7,4. Analizę przeprowadzono z użyciem cytofluorometru przepływowego FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) dla 10 000 zdarzeń a wyniki przeanalizowano w programie Flowing Software (Perttu Terho, University of Turku, Turku, Finlandia).

Dla analiz cytofluorometrycznych prowadzonych dla linii komórkowych zastosowano następujące rozcieńczenia przeciwciał pierwszorzędowych: 1:100 – dla anty-P1/P^k (klon 650) i anty-P1 (klon P3NIL100) oraz 1:20 dla anty-NOR (klon nor118).

Do pomiarów ilościowych dla antygenów P1/P^k na ptasich erytrocytach wykorzystano mikrokulki kalibracyjne (Quantum calibration microspheres, BioRad,

Hercules, CA, USA), których intensywność fluorescencji każdej z pięciu populacji była odczytywana w każdym eksperymencie a następnie używana do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej (średnia intensywność fluorescencji do cząsteczek równoważnych jednostkom rozpuszczalnego fluorochromu, MFI/MESF). Na podstawie uzyskanej krzywej oraz wartości molarnego stosunku fluorochromu do białka (cząsteczka przeciwciała skoniugowanego z FITC) wyznaczono liczbę cząsteczek wiążących przeciwciała (ABC, antibody *binding capacity*) przypadającą na erytrocyt.

6.2.1.2. Aglutynacja

Erytrocyty przemyto trzykrotnie zimnym roztworem PBS, pH 7,4, wirowano przez 3 min. 400 x g (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf) w 4 ° C. 20 µL upakowanych erytrocytów zmieszano w stosunku 1:1 (v/v) z papainą i inkubowano 40 min. w 37 °C. Następnie co najmniej 5 razy przepłukano erytrocyty jak opisano powyżej. Reakcję aglutynacji prowadzono w 96-dołkowych U-kształtnych polistyrenowych płytkach (NUNC) z użyciem 2% roztworu erytrocytów, który zmieszano w stosunku 1:1 (v/v) z roztworem przeciwciał bądź surowic w odpowiednim rozcieńczeniu. Aglutynację określano po godzinie inkubacji w 4 °C. Do reakcji hamowania aglutynacji użyto seryjnych rozcieńczeń roztworu owomukoidu jaja gołębiego zawierającego antygeny P1, glikoforyny A (od osób o grupach krwi A lub O) oraz BSA (kontrola negatywna) o stężeniu wyjściowym 200 µg/ml lub 50 µg/ml (dla glikoforyny A od osoby o grupie krwi O). Roztwory te inkubowano przez 1 h w RT z wytrząsaniem z 100X rozcieńczoną surowicą gołębią, a następnie dodano 2% roztwór erytrocytów ludzkich (o różnych fenotypach, Tabela 16) w stosunku 1:1 (v/v) z roztworem czynnik hamujący – surowica. Aglutynację lub jej hamowanie określano po godzinie inkubacji w 4 °C. Dodatkowo wykonano detekcję wiązania glikoforyny A przez przeciwciała z ptasiej surowicy z użyciem testu ELISA. Płytki 96-dołkowe opłaszczono roztworem glikoforyny A o końcowym stężeniu 2 µg/ml inkubowano kolejno z roztworem blokującym (5% BSA w PBS, pH 7,4), gołębią surowicą (100-krotnie rozcieńczoną w PBS, pH 7,4) oraz przeciwciałem anty-ptasie IgG skoniugowanym z HRP (1000-krotnie rozcieńczone w 1% BSA w PBS; Tabela 6, podrozdział 6.1). Każdą z inkubacji prowadzono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Do wywołania reakcji użyto odczynnika OPD (o-fenyldiamina) rozpuszczonego w mieszaninie metanolu i 0,1 M buforu cytrynianowego, pH 4,5, z dodatkiem 10 µl H₂O₂.

Odczyt wykonano przy długości fali $\lambda = 490$ nm za pomocą czytnika do mikroplątek EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

6.2.2. Izolacja genomowego DNA

Izolacja genomowego DNA z pełnej krwi gołębiej została przeprowadzona za pomocą zestawu Quick Blood DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta z drobnymi modyfikacjami. Inkubacja z proteinazą K została wydłużona z 5 do 15 minut. Etap denaturacji został skrócony do 3 minut.

6.2.3. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)

Skład wszystkich użytych w pracy mieszanin reakcyjnych był następujący:

- 100-300 ng matrycy
- 0,2 mM każdego ze starterów (synteza zlecona firmie Genomed)
- 200 μ M każdego z dNTPs
- 1U polimerazy HF Taq
- 20 μ L 5X buforu dla polimerazy HF Taq z dodatkiem $MgCl_2$
- H_2O – do 100 μ L

Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone z użyciem aparatu MJ Mini gradient thermocycler (BioRad, Hercules, CA, USA). Sekwencje starterów oraz warunki reakcji zostały zebrane w Tabeli 7 i 8.

Tabela 7. Startery użyte do amplifikacji i sekwencjonowania gołębiego genu *A4GALT* (F – forward, starter dla nici kodującej; R- reverse, starter dla nici matrycowej)

Nazwa	Sekwencja
P_ <i>A4GALT</i> _XhoI_F	5' CTCGAGATGTCCAGCTACCTGCAA 3'
P_ <i>A4GALT</i> _NotI_R	5' GGCGGCCGCTCACATTACAGGCCTTGAC 3'

Tabela 8. Warunki reakcji PCR

Krok	Temperatura [$^{\circ}C$]	Czas [hh:mm:ss]	
1. Wstępna denaturacja	98	00:00:30	30X
2. Denaturacja	98	00:00:20	
3. Przyłączanie	55-60	00:00:30	
4. Wydłużanie/elongacja	72	00:00:20	
5. Końcowa elongacja	72	00:10:00	

6.2.4. Precypitacja DNA

Do roztworu DNA dodano 1 μ l glikogenu (20 mg/ml), 3 M roztwór octanu sodu, pH 5,2 w stosunku 1:3 (v/v) oraz zimny 96% etanol w stosunku 3:1 (v/v) i wymieszano przez kilkakrotne odwrócenie probówki. Mieszaninę inkubowano co najmniej 1 h w temperaturze -20°C a następnie zwirowano 21 000 x g (Eppendorf 5415 R, Eppendorf) przez 30 min. w 4°C . Osad przemyto 1 ml 70% zimnego etanolu, zwirowano jak wyżej, a następnie wysuszono w wirówkowym koncentratorze próżniowym (Savant DNA SpeedVac Concentrator) przez 10 min. Następnie rozpuszczono w H_2O .

6.2.5. Oczyszczanie DNA

Do oczyszczania DNA wykorzystano preparatywną elektroforezę w żelu agarozowym przy napięciu 4-5 V/cm długości żelu. Do wizualizacji prążków użyto transluminatora UV, prążki zostały wycięte skalpelem, a DNA ekstrahowano z żelu za pomocą zestawu Gel-Out kit (A&A Biotechnology, Gdańsk) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Stężenie próbek DNA określano z użyciem nanospektrofotometru UV/Vis: Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite Spectrophotometer.

6.2.6. Sekwencjonowanie

Usługa sekwencjonowania została zlecona zewnętrznej firmie (Genomed). Analizy zgodności sekwencji DNA wykonywano z użyciem narzędzia BioEdit v7.2.6.

6.2.7. Elektroforeza DNA

Fragmenty DNA były analizowane za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (Sigma-Aldrich) zawierającym barwnik Midori Green Advance DNA Stain (ABO, Gdańsk). Do próbek dodano bufor obciążający 6X DNA Gel Loading Dye. Elektroforeza była prowadzona w buforze TAE przy napięciu 90 V w temperaturze pokojowej w aparacie Wide Mini-Sub Cell GT Horizontal Electrophoresis System (BioRad). Prążki DNA były wizualizowane z wykorzystaniem systemu GBox (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania) z transluminatorem UV i porównywane do markera masy GeneRuler 1 kb DNA Ladder, (ready-to-use).

6.2.8. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Trawienia enzymami restrykcyjnymi na potrzeby analitycznego rozdziatu elektroforetycznego były prowadzone przez 3 h w temperaturze 37 °C (ThermoStat Plus, Eppendorf). W reakcjach używano ok. 100-300 ng DNA, 1U enzymu restrykcyjnego (maksymalnie używano mieszaniny 2 enzymów) oraz buforu dedykowanego danemu enzymowi lub grupie enzymów zgodnie z zaleceniami producenta. Dla preparatywnego rozdziatu w żelu agarozowym do sekwencyjnego trawienia wykorzystywano 1 µg DNA, a reakcję prowadzono przez noc w warunkach dedykowanych dla używanego enzymu (4 U/reakcja). Precypitację DNA wykonywano zgodnie z opisem powyżej (6.2.4).

6.2.9. Izolacja RNA

Izolację RNA z ptasich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) lub organów wykonano za pomocą zestawu do izolacji RNA NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel, Hoerd, Francja) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

6.2.10. Odwrotna transkrypcja mRNA

Do syntezy komplementarnego DNA (cDNA) użyto ok. 250 ng RNA oraz SuperScript III First-Strand Synthesis kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) z wykorzystaniem tzw. „losowych starterów” (*random primers*).

6.2.11. Analiza poziomu transkryptu *A4GALT*

Dla ilościowej analizy transkryptu genu *A4GALT* oraz jego paralogu, cDNA otrzymane z RNA gołębia i kury (75 ng) zostało użyte jako matryca dla reakcji PCR wraz z zaprojektowanymi sondami *TaqMan* skierowanymi na fragment różniący obydwa geny. Sondy zostały zaprojektowane tak, aby rozpoznawać również fragmenty sekwencji krótkiego genu *A4GALT*. Reakcja była prowadzona w objętości 20 µL w aparacie 7500 Fast Real-Time PCR System. Poziomy transkryptów *A4GALT* zostały znormalizowane względem genów referencyjnych: *ACTB* (β-aktyna, #Hs99999903_m1) dla ludzkiej linii komórkowej 2102Ep oraz krótkiego *GAPDH* dla próbek uzyskanych z ptasich komórek i organów. Wszystkie doświadczenia zostały wykonane w trzech powtórzeniach biologicznych i statystycznych. Do analizy wyników użyto programów Sequence Detection software Version 1.3.1 oraz GraphPad Prism 8.0. Sekwencje

zaprojektowanych sond i starterów zebrano w Tabeli 9, natomiast warunki reakcji PCR w Tabeli 10.

Tabela 9. Sondy i startery użyte do analizy ekspresji genu *A4GALT*

Nazwa	Sekwencja
StarterF-1	5' TGTACTGAAGAACTTGAAGAAC 3'
StarterR-P	5' ATGAACTCATGCTTCGG 3'
StarterR-M	5' ATGAACTCATGCTTGGG 3'
Sonda (enzym P)	5' TGCCCTCGGGCTCCAGTCTC 3'
Sonda (enzym M)	5' TGCCCTTGGTATTGAGTCTC 3'

Tabela 10. Warunki qPCR użyte dla analizy ekspresji genu *A4GALT*

Parametr	Warunki reakcji		
	Denaturacja wstępna	PCR (40 cykli)	
		Denaturacja	Wydłużanie
Temperatura (°C)	95	95	60
Czas (s)	600	15	60

6.3. Przygotowanie wektorów kodujących gołębią syntazę *Gb3/CD77* oraz jej paralog

6.3.1. Klonowanie do wektora pCAG

Fragmenty DNA namnożone w reakcji PCR wklonowano do wektora pCAG (otrzymany od prof. Petera W. Andrews z Uniwersytetu Sheffield, Wielka Brytania; mapa wektora przedstawiona na Ryc. S1) w miejsca restrykcyjne *XhoI/NotI* za pomocą ligazy T4. Mieszanina reakcyjna zawierała: 50 ng insertu, 50 ng wektora (w stosunku molowym 3:1), 2 U ligazy T4 oraz 1,5 µL 10X buforu do ligazy. Reakcje były prowadzone przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie wykonano precypitację produktów reakcji zgodnie z opisem z podrozdziału 6.2.4. i zawieszono w 10 µL H₂O. Kolejnym krokiem była transformacja elektrokompetentnych bakterii *E. coli* (6.3.2. oraz 6.3.3.).

6.3.2. Przygotowanie elektrokompetentnych bakterii *E. coli*

Bakterie *E. coli* (szczep XL-1, Stratagene, La Jolla, CA, USA) zostały wysiane na płytki agarowe SB (Super Broth, skład podany w Tabeli S5) z dodatkiem tetracykliny i inkubowane przez noc w 30 °C. Z płytki pobrano pojedynczą kolonię i nastawiono inokulum w 10 ml pożywki SB z dodatkiem 10 µg/ml tetracykliny w 30 °C z wytrząsaniem

180 rpm (New Brunswick Excella E24, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) na 16 h (hodowla całonocna), a następnie przeniesiono do 200 ml świeżej pożywki i prowadzono hodowlę do czasu uzyskania $OD_{600} = 0,5$. Hodowlę wirowano (10 min, 6371 x g, Beckman, JA-10 rotor) a otrzymany osad dwa razy przemyto 350 ml zimnej, sterylnej wody. Następnie zawieszono w 10 ml 20% glicerolu i ponownie wirowano. Ostatecznie osad rozpuszczono w 2 ml 20% glicerolu i rozporcjowano po 100 μ l, zamrożono w mieszaninie zimnego etanolu i suchego lodu. Tak przygotowane komórki elektrokompetentne przechowywano w -80°C .

6.3.3. Transformacja elektrokompetentnych komórek *E. coli*

Do 2 mm kuwet (BioRad) przeniesiono mieszaninę 50 μ L elektrokompetentnych komórek *E.coli* oraz 1 μ g DNA (z wytrąconej mieszaniny ligacyjnej) i wykonano elektroporację z użyciem aparatu Gene Pulser (BioRad) z użyciem następujących ustawień: 2000 V, 50 μ F oraz 1500 Ω . Niezwłocznie przeniesiono komórki do 0,5 ml pożywki SOC (skład w Tabeli S5) i inkubowano przez 1 h w 37°C z wytrząsaniem 210 rpm (New Brunswick Excella E24 incubator shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Z prowadzonej hodowli 50 μ l wysiano na płytce agarowej (SB z dodatkiem 100 μ g/ml karbenicyliny) i inkubowano w 37°C przez noc.

6.3.4. Izolacja plazmidowego DNA

Do namnożenia plazmidów wykorzystano szczep *E. coli* XL-1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Do izolacji DNA plazmidowego wykorzystano gotowe zestawy Mini- lub Maxiprep kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Do minipreparacji DNA (do 20 μ g DNA) użyto 2 ml hodowli całonocnej *E. coli* XL-1 w pożywce SB z dodatkiem 100 μ g/ml karbenicyliny. W drugim przypadku (maksipreparacja, do 500 μ g DNA) założono hodowlę 10 ml (inokulum), która po 4-8 h (widoczne zmętnienie) została przeniesiona do 200 ml świeżej pożywki z dodatkiem antybiotyku na 16 h (hodowla całonocna, 37°C , 180 rpm). W dalszych etapach postępowano zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

6.3.5. Przygotowanie wektorów kodujących rozpuszczalną formę gołębiej syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu

Aby określić część sekwencji aminokwasowej kodującą domenę katalityczną syntazy Gb3/CD77 lub jej paralogu tak, aby była możliwa produkcja aktywnych, rozpuszczalnych form obydwu enzymów, przeprowadzono analizę bioinformatyczną

narzędziem Phyre2. Fragment określony dla enzymu „P” to 38-361 aa (odpowiednio 114–1083 w sekwencji nukleotydowej ORF genu *A4GALT_p*) natomiast dla enzymu „M” 41-361 aa (odpowiednio 123–1083 w sekwencji nukleotydowej ORF genu *A4GALT_m*) (Ryc. S4). Dla wyznaczonych fragmentów zostały zaprojektowane startery zawierające miejsca restrykcyjne dla enzymów NotI i EcoRI (Tabela 11 oraz zastosowane warunki reakcji PCR w Tabeli 12) pozwalające na wklonowanie fragmentów genów *A4GALT_p* oraz *A4GALT_m* do wektora EBA181-bio (Addgene, Watertown, MA, USA), wcześniej zmodyfikowanego poprzez dodanie sekwencji sygnałowej (fragment lekkiego łańcucha κ mysiego przeciwciała IgG), metek ułatwiającym oczyszczanie i detekcję produkowanego białka (8xHis, FLAGTag oraz fragmentu Fc ludzkiego przeciwciała IgG1) na miejsca restrykcyjne XhoI/NotI (mapa zmodyfikowanego wektora umieszczona na Ryc. S2).

Tabela 11. Startery użyte do amplifikacji i sekwencjonowania gołębic genów *A4GALT_p* oraz *A4GALT_m* (F – forward, starter dla nici kodującej; R- reverse, starter dla nici matrycowej)

Nazwa	Sekwencja
<i>A4GALT_p</i> _NotI_F	5' AAAAAA GCG GCC GCC TTC TCA GGA ACA CCT CTG 3'
<i>A4GALT_p</i> _EcoRI_R	5' AAAAAA GAA TTC TCA CAT TAC AGG CCT TGA C 3'
<i>A4GALT_m</i> _NotI_F	5' AAAAAA GCG GCC GCC AAA CAG TTT TTC GCT TCT CCT 3'
<i>A4GALT_m</i> _EcoRI_R	5' AAAAAA GAA TTC TCA TCT GTG CAG ATG TGG 3'

Tabela 12. Warunki reakcji PCR

Krok	Temperatura [°C]	Czas [hh:mm:ss]	
1. Wstępna denaturacja	98	00:00:30	30X
2. Denaturacja	98	00:00:20	
3. Przyłączanie	52-58	00:00:30	
4. Wydłużanie/elongacja	72	00:00:20	
5. Końcowa elongacja	72	00:10:00	

6.4. Linie komórkowe zastosowane w badaniach

6.4.1. Hodowla ludzkiej linii komórkowej 2102Ep

Hodowla ludzkiej linii komórkowej 2102Ep (potworniakoraka jądra, otrzymana od prof. Petera W. Andrewsa z Uniwersytetu Sheffield, Wielka Brytania) była prowadzona w medium DMEM wzbogaconym glukozą (4,5 g/L) z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej

(FBS, 10%, v/v), 2 mM glutaMAX i koktajlu antybiotyków (Pen-Strep) w 37 °C i 5% CO₂ (inkubator do hodowli komórek ssaczych; IncuSafe MCO-170AICD-PE, PHCbi, Tokio, Japonia) w butlach hodowlanych przeznaczonych do hodowli adherentnej (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy). Komórki pasażowano co 3-4 dni roztworem trypsyny (skład w Tabeli S6).

6.4.2. Transfekcja komórek ludzkiej linii komórkowej 2102Ep wektorami kodującymi gołębią syntazę Gb3/CD77 i jej paralog

Dzień przed transfekcją zebrano komórki i wysiano na płytki 6-dołkowe do hodowli adherentnej (Sarstedt) w gęstości 2×10^5 komórek/dołek, tak aby w dniu transfekcji konfluencja hodowli wynosiła ok. 60%. 4 h przed transfekcją zmieniono medium na DMEM bez dodatku FBS. Mieszaninę transfekcyjną złożoną z 9,5 µg plazmidowego DNA oraz 35 µg polietylenoiminy (PEI, Polysciences, Warrington, PA) przygotowano w buforze HEPES (20 mM, pH 7,5) z dodatkiem 150 mM NaCl, inkubowano 20 min. w temperaturze pokojowej i dodano do odpowiednich dołków. Dobę po transfekcji zmieniono medium na pełne (z dodatkiem FBS). Kolejno, 48 h po transfekcji komórki poddano selekcji antybiotykiem dodając medium z 0,2 µg/ml puromycyny.

6.4.3. Hodowla linii komórkowej Expi293F

Komórki ludzkiej linii komórkowej Expi293F (zawieszinowa hodowla ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK, *human embryonic kidney*) hodowano w kolbach Erlenmeyera w minimalnej objętości 25 ml i maksymalnej 400 ml w 37 °C, przy ciągłym wytrząsaniu 125 rpm (Celltron, INFORS HT, Bottmingen, Szwajcaria) i 8% CO₂ (IncuSafe MCO-170AICD-PE, PHCbi, Tokio, Japonia) w dedykowanym przez producenta medium EXPI293™ Expression Medium do gęstości nie przekraczającej 3×10^6 komórek/ml. Komórki pasażowano średnio co 3-4 dni przy gęstości wyjściowej hodowli nie mniejszej niż $2,5 \times 10^5$ komórek/ml.

6.4.4. Transfekcja linii komórkowej Expi293F

Transfekcję linii komórkowej Expi293F wykonywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta wykorzystując do wprowadzenia plazmidowego DNA do komórek EXPIfectamine™ Transfection Kit. Optymalizację warunków transfekcji

przeprowadzono na płytkach 6-dołkowych przeznaczonych do hodowli zawiesinowych w objętości 2,5 ml dla każdego białka.

W związku z obniżoną stabilnością produkowanych białek zmniejszono temperaturę prowadzenia hodowli z 37 °C do 32 °C, a do transfekowanych komórek dodano inhibitor proteaz: MG-132 (MERCK, Darmstadt, Niemcy), w przypadku syntazy Gb3/CD77 (w tej pracy określona również jako „enzym P”) 24 h po transfekcji, natomiast dla paralogu (określanego w pracy jako „enzym M”) - 72 h po transfekcji.

6.4.5. Wyprowadzenie pierwotnych endotelialnych ptasich linii komórkowych

Do wyprowadzenia pierwotnych linii komórkowych wykorzystano fragmenty aorty pochodzące z gołębia (*Columba livia*) i kury (*Gallus gallus*). Tkanki po pobraniu płukano przez 2 h w temperaturze pokojowej z mieszaniem w buforze Hanksa (MERCK). Następnie tkankę podzielono na ok. 1,5 mm fragmenty, umieszczono na 12-dołkowych płytkach przeznaczonych do hodowli adherentnej w medium DMEM F-12 suplementowanym 10% FBS oraz koktajlem antybiotyków (Pen-Strep + amfB) w 37 °C przy 5% CO₂. Po około 4 dniach obserwowano na płytkach pierwsze kolonie komórek śródbłonka naczyniowego.

6.4.6. Tworzenie pseudonaczyń na podłożu Matrigel®

Podłoże Matrigel® (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta. 50 µL mieszaniny podłoża o końcowym stężeniu 10 mg/ml rozcieńczono w medium DMEM F-12 z dodatkiem i bez 10% FBS i rozprowadzono na studzienkach 96-dołkowej mikro płytki hodowlanej i inkubowano 30 min. w 37 °C. Komórki (1 x 10⁴ komórek/dołek) zostały zawieszane w odpowiedniej objętości medium bez i z dodatkiem FBS a następnie przeniesione na podłoże matrigel (50 µL/dołek, w sześciu powtórzeniach) i inkubowane do 16 h w 37 °C, 5% CO₂. Analizę wyników prowadzono pod mikroskopem Zeiss Axio Vert (Jena, Niemcy). Jako kontroli pozytywnej użyto ludzkiej linii komórek endotelialnych (HMVEC *Human Lung Microvascular Endothelial Cells*, dzięki uprzejmości dr Anny Urbaniak).

6.4.7. Unieśmiertelnienie gołębiej i kurzej linii endotelialnej

Do unieśmiertelnienia linii ptasich pierwotnych komórek endotelialnych wykorzystano system lentiwirusowy trzeciej generacji (VSV-G pseudotypowany). Przygotowanie wirusa zawierającego gołębią odwrotną transkryptazę telomerazy (miano

>10⁸ TU/ml) zostało zlecone zewnętrznej firmie VectorBuilder (Neu-Isenburg, Germany) (mapa wektora kodującego gołębi gen *TERT*, Ryc. S7). Dzień przed transdukcją kurze lub gołębie pierwotne komórki endotelialne (1 x 10⁴ komórek/ml) wysiano na płytkę 24-dołkową w medium DMEM F-12. Na 4 h przed transdukcją zmieniono medium na pozbawione surowicy. Mieszaninę transdukcyjną przygotowano w 1 ml medium Opti-MEM Reduced Serum z dodatkiem 20 µL zawiesiny wirusa oraz 16 µl polibrenu (stężenie wyjściowe 500 µg/ml, stężenie końcowe w roztworze: 8 µg/ml), czynnika ułatwiającego wiązanie cząsteczek wirusa do komórek. Po 24 h wymieniono medium na DMEM F-12 z dodatkiem 10% FBS. Po 96 h dodano medium selekcyjne z dodatkiem 0,2 µg/ml puromycyny.

6.4.8. Testy cytotoksyczności

Na jeden dzień przed eksperymentem komórki wysiano na mikropłytki 96-dołkowe do hodowli adherentnej (Sarstedt) w gęstości 2 x 10⁴ komórek/dołek. Po 24 h zmieniono medium bez dodatku FBS z następującymi stężeniami holotoksyn Stx1 i Stx2 ze szczepu O157 *E. coli*: 12,5, 50, 250, 500, 1000 ng/ml. Po 20 h inkubacji dodano 20 µl/dołek odczynnika MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Assay®, Promega, Madison, WI, USA) i inkubowano 2,5 h w 37 ° C, 5% CO₂. Zmierzono absorbancję przy λ = 490 nm na czytniku EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer, USA). Jako tło przyjęto absorbancję uzyskaną dla samego odczynnika MTS. Jako odniesienie do 100% żywotności przyjęto wartości absorbancji uzyskane dla komórek nietraktowanych holotoksynami. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach statystycznych i co najmniej trzech biologicznych.

Dla ptasich pierwotnych linii komórkowych pomiar żywotności komórek wykonano za pomocą odczynnika 5-CFDA, AM (*5-carboxyfluorescein diacetate, acetoxymethyl ester*) dla następujących stężeń holotoksyn Stx1 i Stx2: 0,5, 1, 5, 25, 50 µg/ml. Po 20 h inkubacji z holotoksynami komórki zostały oderwane od podłoża z użyciem skrobaków do hodowli komórkowej, zwirowane (200 x g, 5 min. Sigma 3K15; MERCK) i zawieszono w 100 µL medium DMEM F-12 bez FBS dla każdego stężenia. Odczynnik 5-CFDA, AM rozcieńczono 1: 100000 w medium DMEM F-12 bez FBS i dodano po 100 µL do zawiesiny komórek i inkubowano 15 min. w 37 ° C, 5% CO₂. Komórki analizowano z użyciem cytofluorometrii przepływowej (FACSCalibur, BD Biosciences) dla

10000 zdarzeń a wyniki przeanalizowano w programie Flowing Software (Perttu Terho, University of Turku, Turku, Finland).

6.5. Proteomika

6.5.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Rozdział białek wykonywano w obecności SDS (Roth, Karlsruhe, Niemcy) wykorzystując 10% żel poliakrylamidowy (skład w Tabeli S4) zgodnie z metodą Laemmli (Laemmli 1970) i zwizualizowane za pomocą barwnika CBB (Coomassie Brilliant Blue R-250, Roth, Karlsruhe, Niemcy). Jako standardu masy użyto PageRuler Prestained Protein Ladder (10 – 180 kDa). Przed nałożeniem na żel do próbek (50 µg białka) dodano buforu obciążającego (skład w Tabeli S4) a następnie denaturowano przez 5 min. w temperaturze 95 °C lub dla lizatów komórkowych (50 µg białka) w temperaturze 65 °C przez 10 min. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 45 min. przy napięciu 200 V w aparacie Mini-Protean Tetra Cell system (BioRad) wraz z zasilaczem PowerPac (BioRad).

6.5.2. Barwienie CBB

W celu wizualizacji prążków białkowych żel poliakrylamidowy po rozdziale płukano wodą a następnie inkubowano z roztworem barwnika CBB (0,6% (m/v) CBB R-250, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) lodowaty kwas octowy) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie w roztworze odbarwiającym (35% (v/v) metanol, 7% (v/v) lodowaty kwas octowy) w celu pozbycia się tła.

6.5.3 Western blotting

Transfer białek z żelu poliakrylamidowego po rozdziale elektroforetycznym na membranę nitrocelulozową (Roth, Niemcy) przeprowadzono zgodnie z protokołem (Towbin, Staehelin i Gordon, 1979) w buforze Tris-glicyna (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% (v/v) metanol) przez 1 h przy napięciu 100 V i natężeniu 0,25 A używając modułu Mini Trans-Blot i zasilacza PowerPac HC (BioRad). Membrany były blokowane w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) lub 5% rybiej żelatyny (dla lizatów białkowych uzyskanych z komórek 2102Ep) w TBS przez 1 h w temperaturze pokojowej lub przez noc w 4 °C zależnie od prowadzonego

doświadczenia. Następnie prowadzone były inkubacje z przeciwciałami lub podjednostką 1B toksyny Shiga (w stężeniu końcowym 1 µg/ml) (1 h, temperatura pokojowa). Membrany były płukane 2x H₂O i 3x TBS między inkubacjami, a następnie inkubowane w roztworze ekstrawidyny skoniugowanej z alkaliczną fosfatazą (ExAvAP, MERCK, rozcieńczona 5000x z dodatkiem 0,05% Tween20 (Roth, Karlsruhe, Niemcy) w 1% BSA (MERCK) w TBS. Jako substratów do wywołania reakcji dla alkalicznej fosfatazy użyto BCIP (sól disodowa fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (MERCK); 0,45 mM), NBT (chlorek 3,3'-(3,3'-Dimetoksy-4,4'-bifenylene) bis [2-(4-nitrofenylo) -5-fenylo-2H-tetrazolinu (MERCK); 0,4 mM NBT) w buforze Tris-HCl, pH 9,5 z dodatkiem chlorku sodu oraz jonów Mg²⁺ (0,1 M Tris-HCl, 100 mM chlorek sodu oraz 5 mM MgCl₂). Reakcje zatrzymywano przez zanurzenie membran w destylowanej wodzie.

6.5.4. Dot blotting

Fracje zebrane podczas oczyszczania białek na kolumnach powinowactwa były wstępnie analizowane z użyciem metody „dot blotting”. Na membranę nitrocelulozową naniesiono po 3 µL każdej frakcji jak również kontroli pozytywnej (białko z fragmentem Fc ludzkiego przeciwciała IgG1 jako metką) i negatywnej (bufor, w którym prowadzono rozdział chromatograficzny). Blokowano przez 45 min. w 5% odtłuszczonym mleku w TBS w temperaturze pokojowej. Płukano 3 razy w buforze TBS a następnie inkubowano przez kolejne 45 min. z roztworem przeciwciała w rozcieńczeniu 1:2500. Przy wywoływaniu membrany postępowano jak przy metodzie Western blotting (6.5.3).

6.5.5. Liza komórek 2102Ep

Nietransfekowane oraz transfekowane wektorami kodującymi gołębią syntazę Gb3/C77 lub jej paralog) komórki 2102Ep zostały zebrane za pomocą 0,25% roztworu trypsyny (jak opisano powyżej) zwirowane (200 x g, 5 min., Sigma 3K15) a osad zawieszony w odczynniku do lizy CellLytic M™ (MERCK) z dodatkiem koktajlu inhibitorów proteaz (100X) i wytrząsany przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Aby wyeliminować resztki komórek lizat zwirowano 15 min., 21130 x g (Eppendorf 5415 R, Eppendorf). Stężenie białek obecnych w nadsączu określono z użyciem dwóch metod: nanospektrofotometru UV/Vis Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite Spectrophotometer oraz zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit postępując zgodnie z wytycznymi określonymi przez producenta.

6.5.6. Oczyszczanie rozpuszczalnej formy gołębiej syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu

Do oczyszczania rozpuszczalnej formy gołębiej syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu wykorzystano chromatografię powinowactwa, stosując złożę z immobilizowanym białkiem A (IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Niemcy). Zawiesinę hodowlaną komórek EXP1293F odwirowano 10 min. przy 1000 x g (Sigma 3K15). Nadsącz dializowano 48 h (co najmniej czterokrotnie wymieniany bufor) do 20 mM buforu fosforanowego, pH 7,0, z dodatkiem 150 mM NaCl. Następnie zwirowano 10 min. 5000 x g (Sigma 3K15). Procedurę oczyszczania przeprowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta stosując 0,1 M glicynę, pH 2,7 jako bufor elucyjny i 1 M Tris-HCl, pH 8,5, jako bufor neutralizujący (Tabela S2). Zebrane frakcje zagęszczono z użyciem koncentratorów wirówkowych o odcięciu 30 kDa z membraną PES (Vivaspin®, MERCK) i analizowano wykorzystując metody dot blotting oraz Western blotting.

6.5.7. Trawienie rozpuszczalnej formy gołębiej syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu przez PNGazę F i O-glikanazę.

Preparaty białkowe (50 µg) uzyskane po oczyszczaniu na złożu z zimmobilizowanym białkiem A (podrozdział 6.5.6) poddano trawieniu w 37 °C przez noc przez dwie proteazy: PNGazę F (otrzymana od prof. dr hab. Mariusza Olczaka, Zakład Biochemii, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław) oraz O-GlcNAc-azę (Lectenz®Bio, Athens, GA, USA). Trawienie PNGazą F przygotowano zgodnie z opublikowanym protokołem (Maszczak-Seneczko *i in.*, 2011). Trawienie O-GlcNAc-azą przygotowano zgodnie z zaleceniami producentów.

6.5.8. Badanie aktywności enzymatycznej gołębiej syntazy Gb3/CD77 i jej paralogu za pomocą syntetycznych glikokoniugatów w teście ELISA

Mikro płytki 96-dołkowe Nunc Maxisorp® opłaszczono 2 µg/50 µL roztworami syntetycznych glikokoniugatów: Lac-PAA, nLc44-PAA Gb4-PAA (GlycoNZ, Auckland, Nowa Zelandia) (struktury cukrowe w Tabeli 13) w 50 mM buforze fosforanowym, pH 7,4 z dodatkiem 5 mM MgCl₂ i inkubowano przez noc w 4 °C. Następnie blokowano w 5% roztworze BSA w TBS przez 2 h w 37 °C a następnie przez noc w 4 °C. Próbkę enzymów (po 5 µg/dołek dla każdego z preparatów) rozcieńczono w 50 mM buforze kakodylowym (kakodylan sodu), pH 6,3, z dodatkiem jonów Mn²⁺ (14 mM MnCl₂) oraz nośnikiem substratu UDP-Gal (200 µM). Reakcje prowadzono przez noc w 37 °C. Rozcieńczenia

przeciwciał reagujących z produktami reakcji (1:100 dla anty-P1/P^k oraz anty-P1, 1:50 dla anty-NOR (klon nor118)) w 1% BSA w TBS dodano i inkubowano przez 90 min. w temperaturze pokojowej. Inkubację z biotynylowanymi przeciwciałami drugorzędowymi (anty-mysie lub anty-ludzkie (Tabela 6 w sekcji 6.1.) rozcieńczonymi 1:1000 prowadzono przez 1 h, a następnie inkubowano z koniugatem alkaliczna fosfataza - ekstrawidyną w rozcieńczeniu 1:10000 z dodatkiem 0,05% Tween20. Po każdej inkubacji płytki płukano pięciokrotnie buforem TBS, pH 7,4 z dodatkiem 0,05% Tween20. Dodatkowo po ostatniej inkubacji wykonano 3 płukania H₂O. Jako substratu dla alkalicznej fosfatazy użyto fosforanu p-nitrofenolu w 50 mM buforze węglanowym, pH 9,6, z dodatkiem jonów Mg²⁺ (1 mM MgCl₂). Absorbancję mierzono z użyciem czytnika EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer) przy λ = 405 nm po 10, 20, 45 i 60 min. Wyniki analizowano w programie Microsoft Office Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA). Jako kontroli negatywnych użyto niepełnych mieszanin reakcyjnych (brak nośnika substratu lub enzymu). Dodatkowo do pomiaru tła wykorzystano roztwór substratu w buforze węglanowym. Wszystkie reakcje były przygotowywane w trzech powtórzeniach.

Tabela 13. Struktury syntetycznych glikokoniugatów wykorzystanych w tej pracy

Glikokoniugat	Struktura	Prekursor dla
LacPAA	Galβ1→4Glc-PAA	P ^k
nLc4-PAA	Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-PAA	P1
Gb4-PAA	GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glc-PAA	NOR1

6.6. Izolacja, oczyszczanie i analiza glikosfingolipidów

6.6.1. Izolacja neutralnych glikosfingolipidów

Izolacja neutralnych glikosfingolipidów (z błon ptasich erytrocytów, komórek 2102Ep oraz komórek gołębiej i kurzej pierwotnej linii endotelialnej) składała się z etapów: ekstrakcji trzema różnymi układami chloroform/metanol, saponifikacji fosfolipidów, odsolenia na złożu Sephadex G-25 SuperFine (MERCK) oraz oddzielenia od gangliozydów na złożu DEAE-Sephadex (MERCK).

Ekstrakcję przeprowadzono metodą Folcha i współpr. (Folch, Lees i Sloane Stanley, 1957). Około 1x10⁸ komórek/ml (nietransfekowanych i stabilnie transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M i P) lub 200 mg błon ptasich erytrocytów (liofilizat) przeniesiono do kolby okrągłodennej. Glikosfingolipidy wyekstrahowano 10 ml

mieszaniny chloroform/metanol (2:1, v/v) przez 30 min. w 37 °C w łaźni wodnej z ultradźwiękami (Sonorex™, Banderlin (obecnie Merck), USA). Homogenat wirowano przez 5 min., 1620 x g (Sigma 3K15) i pozostały osad ponownie wyekstrahowano 10 ml mieszaniny chloroform/metanol/woda (38:19:3, v/v) przez 30 min w 37 °C. Po kolejnym odwirowaniu nadsącze połączono i całkowicie odparowano przy użyciu wyparki obrotowej (Buchi Rotavapor R-114, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria). Aby usunąć fosfolipidy, film lipidowy rozpuszczono i zmydlano w 1 ml 0,2 M KOH w 100% metanolu przez 3 godziny w 37 °C. Roztwór następnie zobojętniono 50% kwasem octowym i osuszono jak opisano powyżej. Próbkę odsalano na kolumnie do filtracji żelowej (Sephadex G-25). Żywicę wstępnie zrównoważono mieszaniną chloroform/metanol/woda (60:30:4,5, v/v). Osuszoną próbkę rozpuszczono w 2 ml tego samego rozpuszczalnika, naniesiono na żywicę, eluowano 9 ml układu i osuszono jak opisano powyżej. Aby oddzielić obojętne glikosfingolipidy od gangliozydów, wysuszoną próbkę rozpuszczono w 8 ml układu chloroform/metanol/woda (30:60:8, v/v) i nałożono na kolumnę jonowymienną dietyloaminoetylową (DEAE-Sephadex A-50) wstępnie zrównoważoną tym samym układem. Następnie obojętne glikosfingolipidy eluowano wspomnianym układem i suszono jak opisano powyżej.

6.6.2. Analiza neutralnych glikosfingolipidów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC)

Do analizy neutralnych glikosfingolipidów wykorzystano wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC, *high-performance thin layer chromatography*) na aluminiowych płytkach pokrytych żelem silikonowym Kiesielgel 60 (MERCK). Oczyszczone glikosfingolipidy zostały naniesione w odpowiedniej objętości układu chloroform/metanol (2:1, v/v) na płytki HPTLC i poddane rozdziałowi w układzie chloroform/metanol/woda (55:45:9, v/v/v).

6.6.3. Barwienie orcynolem płytek HPTLC

Wysuszone płytki HPTLC spryskano roztworem 0,2% orcynolu (MERCK) w 3 M H₂SO₄ i inkubowano w temperaturze 120 °C przez 5 min. (inkubator standardowy ED115 Binder, Tuttlingen, Niemcy).

6.6.4. Analiza HPTLC glikosfingolipidów

Wysuszone płytki HPTLC inkubowano przez 1 min. w 0,05% roztworze polimeru isobutylometakrylanu (MERCK) w heksanie. Wysuszono ponownie i płukano w TBS. Następnie blokowano w roztworze 5% BSA w TBS przez 1 h. Po tym czasie ponownie odpłukano w TBS i postępowano jak w metodzie Western blotting (podrozdział 6.5.3).

6.6.5. Metaboliczne znakowanie glikosfingolipidów ¹⁴C-galaktozą

Znakowanie metaboliczne glikosfingolipidów przygotowano zgodnie z protokołem opisanym przez Morimoto i współpr. (Morimoto *i in.*, 2020). Nietransfekowane i transfekowane wektorami kodującymi enzym P i enzym M komórki 2102Ep wysiano na 6-dołkową płytkę (3×10^5 komórek/dołek) w medium DMEM (jak w podrozdziale 6.4.1). Do przyżyciowego znakowania metabolicznego użyto ¹⁴C-galaktozy (PerkinElmer, USA). Komórki inkubowano przez noc w medium OptiMEM z dodatkiem 1% Nutridoma (MERCK) oraz 0,2 μ Ci ¹⁴C-galaktozy w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂). Izolacja i analiza glikosfingolipidów przebiegała jak w wyżej opisanych podrozdziałach. Jako układu rozwijającego dla rozdziału HPTLC użyto układu chloroform/metanol/0,25%CaCl₂ (65:35:8, v/v/v).

6.6.6. Analiza MALDI-TOF glikosfingolipidów neutralnych

Do identyfikacji izolowanych glikosfingolipidów neutralnych wykorzystano metodę spektrometrii mas: MALDI-TOF (laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą z detektorem czasu *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) przeprowadzoną na aparacie Autoflex III TOF/TOF™ (BrukerDaltonics, Bremen, Niemcy). Jako kalibratora zewnętrznego użyto Peptide Calibration Standard (BrukerDaltonics) oraz tricyklicznego alkaloidu norharman (9H-Pyrido[3,4-b] indolo, β -karbolina) w stężeniu 10 mg/ml w układzie chloroform/metanol (2:1, v/v) jako matrycy. Na płytkę naniesiono po 1 μ L próbki i matrycy. Eksperyment prowadzono w dodatnim trybie reflektromu ze skanowaniem widma w przedziale m/z 700 – 2500. Do wstępnej analizy uzyskanych widm użyto programu flexAnalysis 3.4 (BrukerDaltonics, Bremen, Niemcy).

6.7. Immunohistochemia

Skrawki do analizy immunohistochemicznej zostały pozyskane z organów gołębia i kury przez dr n. wet. Tomasza Piaseckiego z Katedry Epizootiologii Zwierząt Egzotycznych z Kliniką Ptaków Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Preparaty zostały

przygotowane przez zespół prof. Piotra Kuroпки z Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt UPWr). Barwienie immunohistochemiczne wykonano za pomocą zestawów EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH oraz EnVision FLEX HRP Magenta Substrate Chromogen System (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Przed nałożeniem roztworów przeciwciał preparaty inkubowano w buforze cytrynianowym, pH 6,0, z dodatkiem 0,05% Tween20 w 98 °C przez 20 min. Roztwory przeciwciał pierwszorzędowych (anty-P1/P^k (klon 650) i anty-P1 (klon P3NIL100) przygotowano w rozcieńczeniu 1:100, a podjednostek toksyny Shiga 1B w stężeniu końcowym 1 µg/ml w Dako Antibody Diluent® (Agilent Dako, USA) i inkubowano w 4 °C przez noc. Dla podjednostek toksyn Shiga oraz przeciwciała anty-P1 dodano inkubacje odpowiednio z mysimi przeciwciałami drugorzędowymi, odpowiednio anty-Stx1B, oraz króliczym anty-ludzkim skoniugowanym z HRP w rozcieńczeniach 1:1000. Inkubacje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 45 min. Wybarwione preparaty zanalizowano z użyciem mikroskopu ZEISS Axio Imager Z2 wraz z oprogramowaniem (Jena, Niemcy).

6.8. Statystyka

Do analizy wyników testów cytotoksyczności użyto t-testu dla grup niezależnych z poprawką Holma-Bonferroniego. Różnice w poziomie transkryptyu gołębih genów *A4GALT_p* i *A4GALT_m* użyto jednokierunkowego testu ANOVA z testem Bonferroniego *post hoc*. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem narzędzia GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6.9. Bioetyka

Krew pobierano od pacjentów po uzyskaniu świadomej zgody zgodnie z Deklaracją Helsińską. Procedury wykonywane na tkankach pobranych od uśmierconych ptaków zgodnie z polskim prawem nie wymagają zgody Komisji Etycznej.

6.10. Narzędzia bioinformatyczne

Lista wykorzystanych w pracy narzędzi bioinformatycznych ujęta w Tabeli 14.

Tabela 14. Narzędzia bioinformatyczne użyte do analizy wyników umieszczonych w pracy

Analiza sekwencji nukleotydowych	ClustalW, ClustalO (McWilliam i in., 2013); BioEdit 7.0
Analiza sekwencji aminokwasowych	Phyre2.0 (Kelley <i>i in.</i> , 2015); BLAST (States and Gish 1994); UniProt (Bateman <i>i in.</i> , 2021); PredictProtein (Bernhofer <i>i in.</i> , 2014)
Tworzenie map wektorów i modyfikacje sekwencji	SnapGene 6.0 (<i>SnapGene Software for everyday molecular biology</i>)
Analiza cytofluorometryczna	FlowingSoftware 2.5.1. (Sahraneshin Samani <i>i in.</i> , 2014)
Analiza występowania miejsc N-glikozylacji	NetNGlyc 1.0 (Gupta and Brunak 2002)
Analiza występowania reszt lizyny podatnych na ubikwitynację	iUbiq-Lys (Qiu <i>i in.</i> , 2015)

7. WYNIKI

7.1. Antygeny układu grupowego P1PK na komórkach ptaków

7.1.1. Glikotyipy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na erytrocytach

Syntaza Gb3/CD77 jest enzymem odpowiedzialnym za syntezę antygenów układu grupowego P1PK u człowieka. Liczba tych antygenów na powierzchni erytrocytów jest wyższa u osób z grupą krwi P₁, niż u osób z grupą krwi P₂ (Kaczmarek *i in.*, 2018). Na powierzchni erytrocytów ptaków nigdy nie była jednak przedmiotem analiz. Badano jedynie struktury oligosacharydów z glikoprotein białka jaja oraz niektórych tkanek pobranych od przedstawicieli 25 rzędów ptaków i wykazano, że zawierają one terminalne struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal (Suzuki, Laskowski, and Lee 2004). Aby określić poziom antygenów układu P1PK, erytrocyty 47 ptaków należących do 12 gatunków zbadano za pomocą cytofluorometrii przepływowej, stosując mysie przeciwciało monoklonalne anti-P1 (klon 650, swoistość: P1 i P^k) (Tabela 15). Stwierdzono, że struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal obecne są tylko u ptaków należących do parvklasy ptaków współczesnych (*Neoaves*) (Ryc. 13).

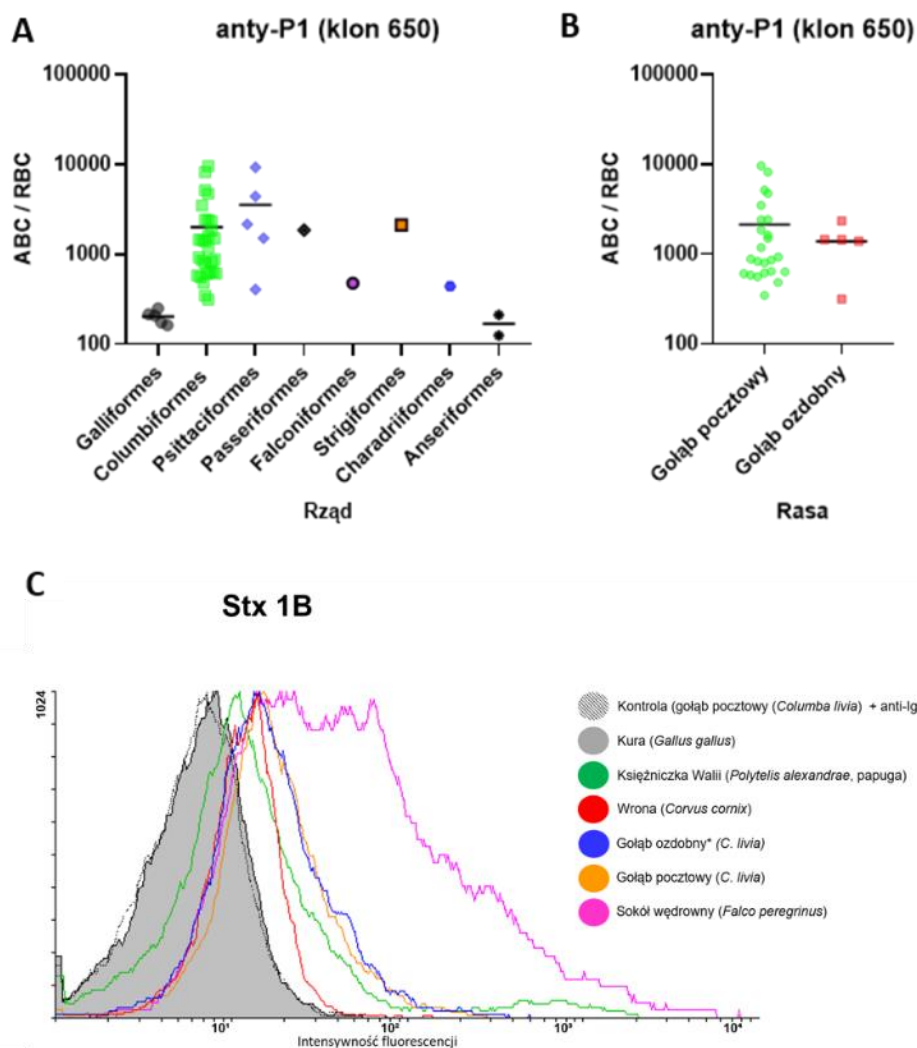
Tabela 15. Wiązanie przeciwciała anti-P1/P^k (klon 650) do erytrocytów różnych gatunków ptaków. Na czerwono oznaczono przedstawicieli rzędu *Galliformes*

Lp.	Gatunek	Rząd	Wiązanie przeciwciała anti-P1/P ^k
1	Kura (<i>Gallus gallus domestica</i>) (3)	Grzebiące (<i>Galliformes</i>)	-
2	Kura zielononóżka (<i>Gallus gallus</i>)		-
3	Gołąb pocztowy (<i>Columba livia</i>) (24)	Gołębiowe (<i>Columbiformes</i>)	+
4	Gołąb ozdobny (<i>Columba livia</i>) (6)		+
5	Papuzka falista (<i>Melopsittacus undulatus</i>) (2)	Papugowe (<i>Psittaciformes</i>)	+
6	Księżniczka Walii (<i>Polytelis alexandrae</i>) (3)		+
7	Puszczyk zwyczajny (<i>Strix aluco</i>)	Sowy (<i>Strigiformes</i>)	+
8	Słonka zwyczajna (<i>Scolopax rusticola</i>)	Siewkowe (<i>Charadriiformes</i>)	+

WYNIKI

9	Bażant (<i>Phasianus colchicus</i>)	Bażantowate (<i>Phasianiformes</i>)	-
10	Wrona siwa (<i>Corvus cornix</i>)	Wróblowe (<i>Passeriformes</i>)	+
11	Gęś domowa (<i>Anser domesticus</i>) (2)	Błazkodziobe (<i>Anseriformes</i>)	-
12	Kaczka (<i>Anas platyrhynchos</i>)		-

Najsilniejsze wiązanie przeciwciał obserwowano w przypadku erytrocytów gatunków należących do papugowych (*Pssitaciformes*), a największe zróżnicowanie wiązania miało miejsce wśród przedstawicieli gołębiowych (*Columbiformes*). Zbliżoną liczbę antygenów P1 i P^k obserwowano dla przedstawiciela wróblowych ((*Passeriformes*) wrona siwa) oraz puszczyka zwyczajnego (puszczykowate, *Strigidae*). Nie zaobserwowano wiązania przeciwciała do erytrocytów gatunków należących do rzędu bezgrzebieniowców (*Galliformes*). Ponadto, średnia liczba antygenów P1 i P^k na erytrocytach u przedstawicieli ptaków dziko żyjących z parvklasy ptaków współczesnych była niższa, niż u przedstawicieli gatunków żyjących blisko człowieka jako zwierzęta domowe lub hodowlane. Określono również liczbę antygenów P1 i P^k na erytrocytach gołębi pochodzących z dwóch ras: gołębia pocztowego oraz gołębia ozdobnego (*Columba livia*) (Ryc. 13B). U gołębia pocztowego zaobserwowano duże międzyosobnicze różnice w liczbie antygenów P1 i P^k na erytrocytach. W przypadku gołębia ozdobnego różnice były mniejsze, ale liczba przebadanych osobników była zbyt mała, aby jednoznacznie określić stopień zróżnicowania. Ze względu na brak dostępu do wystarczającej liczby (przynajmniej pięciu) przedstawicieli poszczególnych gatunków u papugowych, nie wykonano analizy międzyosobniczego zróżnicowania liczby antygenów P1 i P^k. Wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga zaobserwowano u wszystkich gatunków ptaków z parvklasy ptaków współczesnych; najsilniejsze dla erytrocytów sokoła.

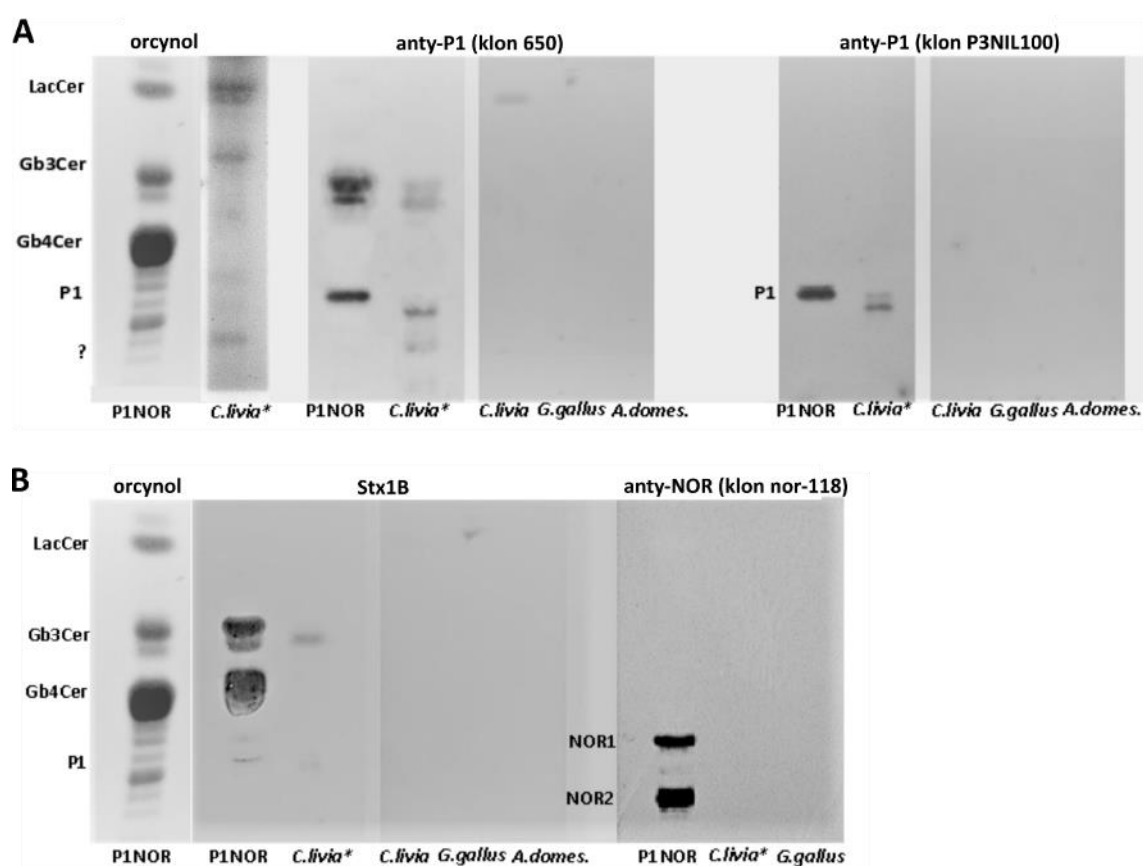


Ryc. 13. Analiza cytofluorometryczna wiązania przeciwciała anty-P1/P^k (klon 650) do erytrocytów różnych gatunków ptaków. Panel A: Analiza ilościowa antygenów P1 i P^k na erytrocytach ptaków różnych gatunków. Panel B: Porównanie liczby antygenów P1, P^k na erytrocytach dwóch ras gołębi. Panel C: Analiza wiązania podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) do ptasich erytrocytów. Oznaczenia: ABC: liczba cząsteczek wiążących przeciwciała (*Antibody Binding Capacity*); RBC: erytrocyt (*Red Blood Cell*).

7.1.1.1. Charakterystyka glikosfingolipidów i glikoprotein z erytrocytów ptaków

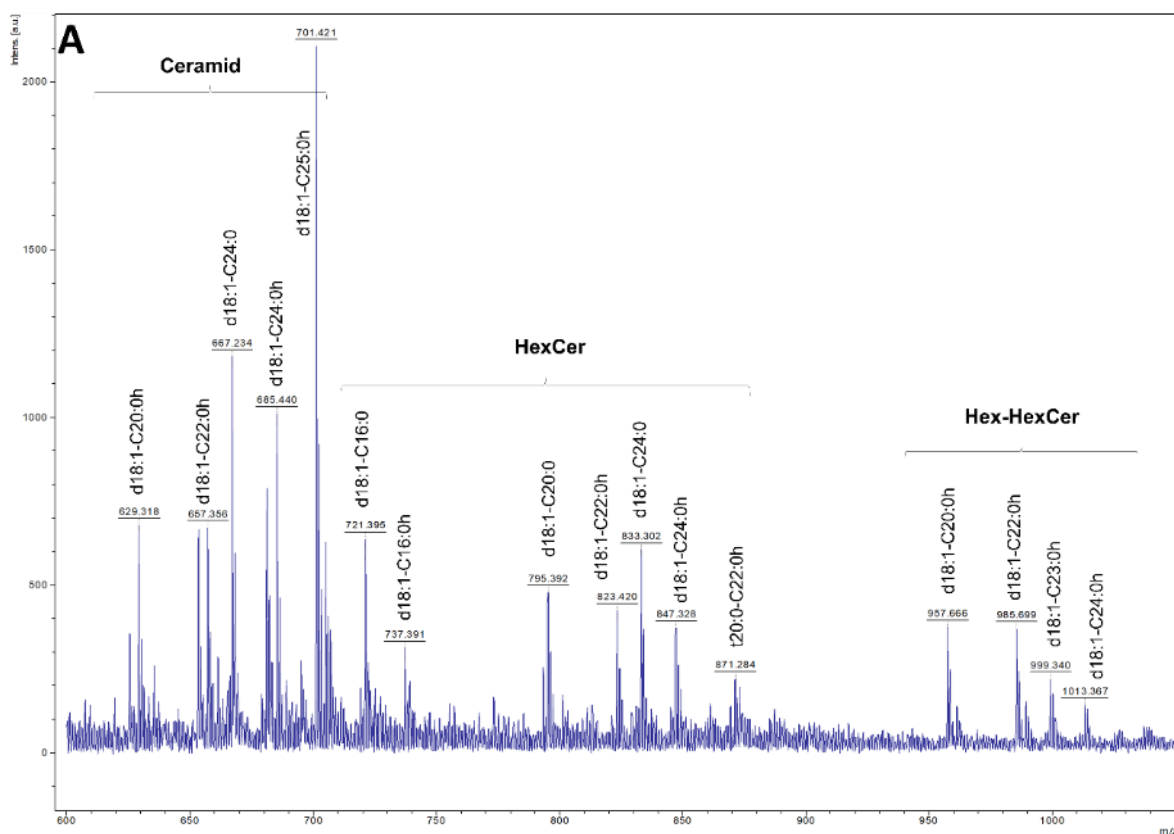
W celu określenia, czy glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal rozpoznawane przez mysie przeciwciała anty-P1/P^k (klon 650) znajdują się na glikoproteinach czy na glikosfingolipidach, z ptasich erytrocytów wyizolowano frakcję glikosfingolipidów neutralnych. Analiza za pomocą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), wykazała, że głównymi glikosfingolipidami w erytrocytach gołębi są GlcCer i LacCer. Ponadto, frakcja glikosfingolipidów neutralnych z gołębia ozdobnego zawierała Gb3Cer i glikosfingolipid o ruchliwości podobnej do ludzkiego antygeny grupowego krwi

P1 (Ryc.14A). Ten dodatkowy GSL był rozpoznawany przez ludzkie przeciwciało anti-P1 (klon P3NIL100). Podwójne prążki P1 rozpoznawane przez przeciwciało to najprawdopodobniej izoformy P1 zawierające kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcucha węglowego (Dupuy *i in.*, 1999). Nie wykryto glikosfingolipidów reagujących z przeciwciałem anti-NOR (Ryc.14B). We frakcji glikosfingolipidów neutralnych z erytrocytów przedstawicieli bezgrzebieniowców (kura domowa, gęś) i gołębia pocztowego nie obserwowano wiązania przeciwciał o swoistości anti-P1 (klon 650 i klon P3NIL100) ani anti-NOR. Podjednostka 1B toksyny Shiga wiązała się tylko do Gb3Cer (P^k) z GSL otrzymanych z erytrocytów gołębia ozdobnego (Ryc.14B).

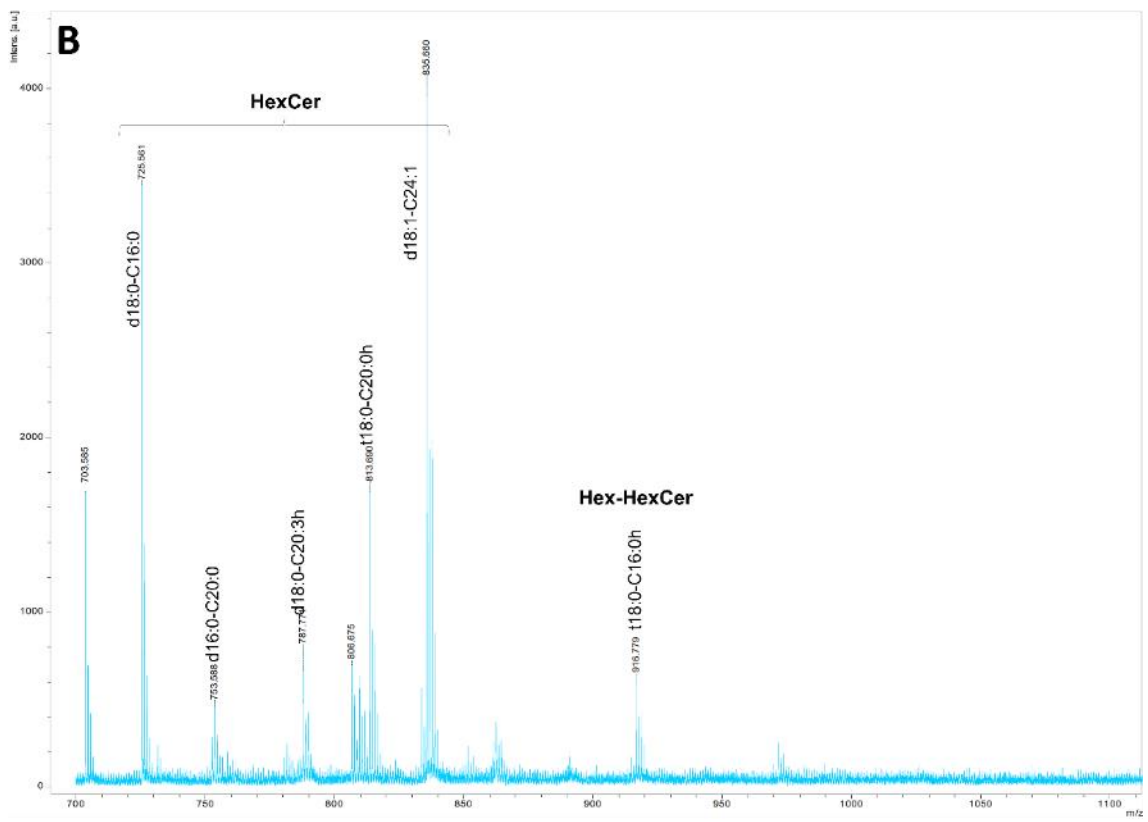
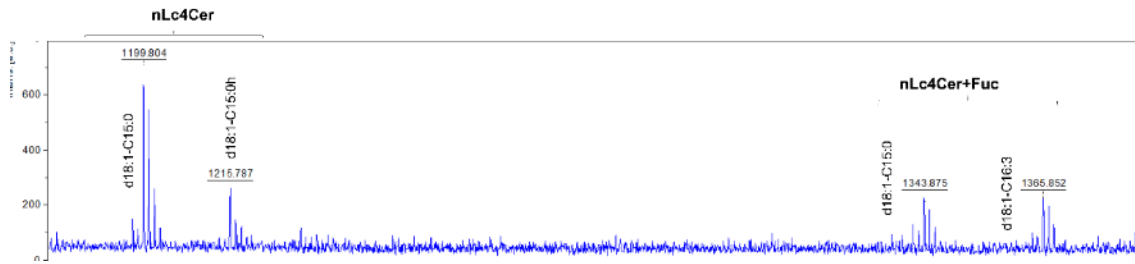


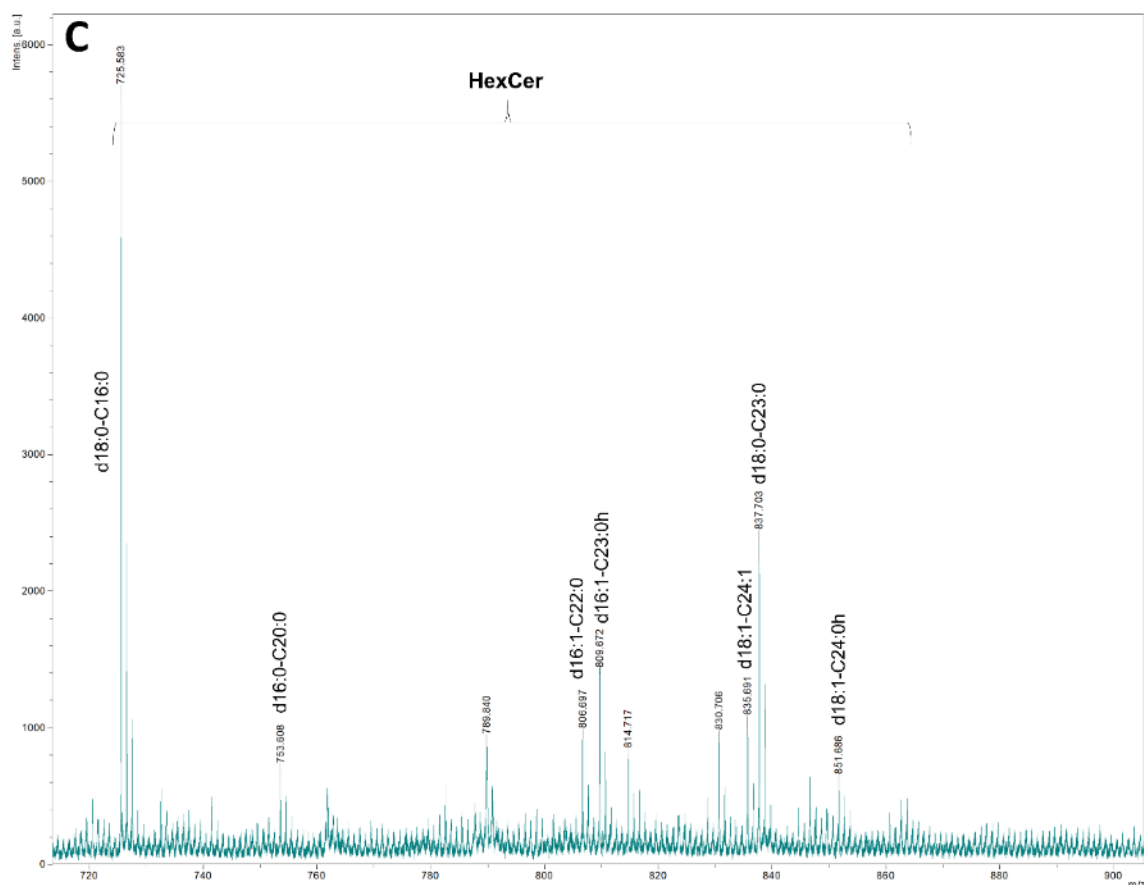
Ryc. 14. Analiza HPTLC frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z erytrocytów ptaków należących do ptaków współczesnych oraz bezgrzebieniowców. Panel A: Barwienie orcynolem oraz detekcja wiązania przeciwciał anti-P1 (klon 650 oraz P3NIL100). Panel B: Detekcja wiązania podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) oraz przeciwciała anti-NOR (nor118). Oznaczenia: P1NOR: GSL z ludzkich erytrocytów o fenotypie P₁NOR; *C. livia**: GSL wyizolowane z erytrocytów gołębia ozdobnego; *C. livia*: GSL wyizolowane z erytrocytów gołębia pocztowego; *G. gallus*: GSL z erytrocytów kury; *A. domes*: GSL wyizolowane z erytrocytów gęsi domowej.

Spektrometria MALDI-TOF wykazała, że glikosfingolipidy neutralne erytrocytów kury, gęsi, gołębi: ozdobnego i pocztowego zawierają kilka klastrów monosodowanych jonów addycyjnych $[M+Na]^+$ odpowiadających glukozyloceramidowi (GlcCer) (Ryc. 15). Różnice mas między jonami (głównie ~ 28 Da, odpowiadające masie cząsteczkowej dwóch grup metylowych) odpowiadają izoformom zawierającym grupy acylowe o różnej liczbie atomów węgla w cząsteczce ceramidu (np. 16:0, 18:0, 24:0). W próbce GSL z erytrocytów kury zidentyfikowano jony odpowiadające GlcCer przy m/z 725,6 i m/z 835,7 (odpowiednio grupy acylowe 16:0 i 24:1) (Ryc. 15C). W próbkach GSL wyizolowanych od gołębi ozdobnych znaleziono jony dla GlcCer oraz jony m/z 957,6, m/z 985,7 i m/z 1013,4 odpowiadające LacCer z hydroksylowanym łańcuchem acylowym (20:0h; 22:0h; 24:0h), m/z 1199,8 dla nLc4Cer (15:0) i m/z 1343,9 dla fukozylowanego paraglobozydu (Ryc.15A). GlcCer stanowił główny składnik frakcji glikosfingolipidów neutralnych z erytrocytów ptaków. Dodatkowo, we frakcji glikosfingolipidów neutralnych pochodzących z erytrocytów gołębia pocztowego poza jonami dla GlcCer (jak u kury) zidentyfikowano jon dla LacCer z hydroksylowanym łańcuchem acylowym (16:0h)



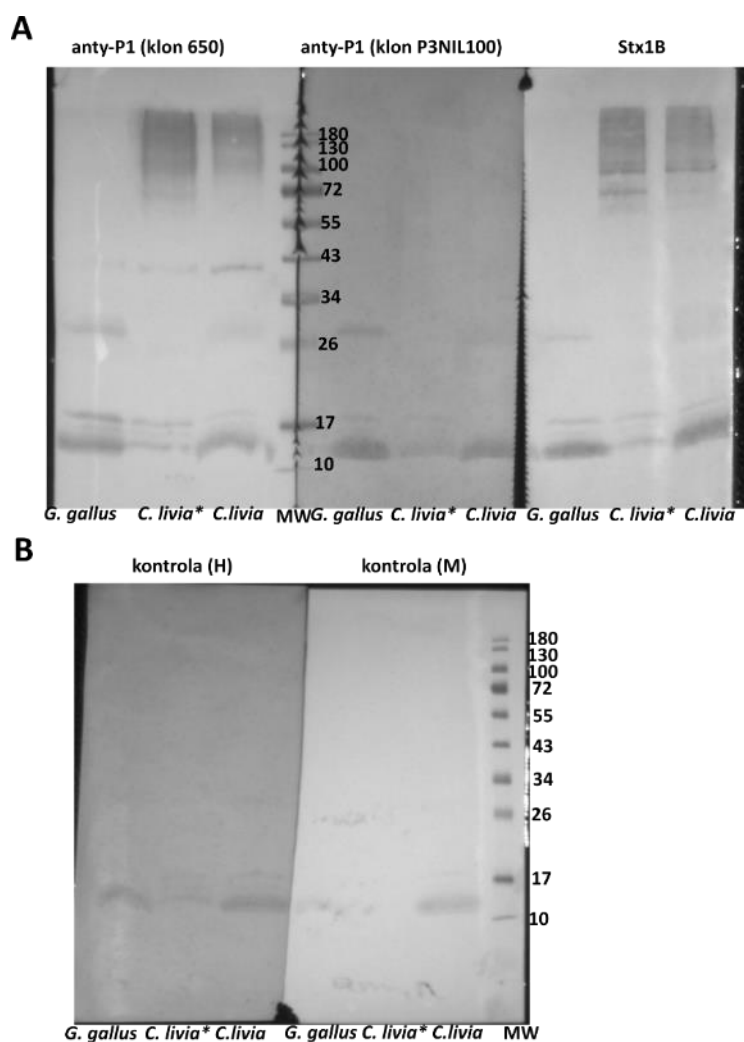
WYNIKI





Ryc. 15. Widma masowe MALDI TOF glikosfingolipidów neutralnych wyizolowanych z membran erytrocytów przedstawicieli ptaków współczesnych i bezgrzebieniowców. Panel A: widmo masowe GSL wyizolowanych z erytrocytów gołębia ozdobnego; Panel B: widmo masowe GSL wyizolowanych z erytrocytów gołębia pocztowego; Panel C: widmo masowe GSL wyizolowanych z membran erytrocytów kury. Oznaczenia: d18:1 lub t20: dwa typy zidentyfikowanych łańcuchów sfingozyny; h – OH; hydroksylowany łańcuch acylowy reszty ceramidu.

Analiza glikoprotein metodą Western blotting z zastosowaniem przeciwciał anti-P1 (klon 650 oraz P3NIL100) wykazała, że struktury rozpoznawane przez mysie przeciwciało anti-P1 (klon 650; prążki reprezentujące białka o masie cząsteczkowej 80 kDa i większe) są obecne tylko w lizatach białkowych uzyskanych z erytrocytów ptaków należących do parwklasy ptaków współczesnych. W obu próbkach otrzymanych z erytrocytów gołębia zaobserwowano prawie identyczne wiązanie przeciwciał anti-P1 (Ryc. 16A). W lizatach otrzymanych z erytrocytów ptaków należących do rzędu bezgrzebieniowców obserwowano tylko nieswoiste wiązanie (Ryc. 16A). W lizatach otrzymanych z erytrocytów przedstawicieli ptaków współczesnych wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga do glikoprotein było identyczne, co korelowało z wynikami cytofluorometrii przepływowej. Wiązanie do białek o masie cząsteczkowej niższej niż 17 kDa okazało się nieswoiste.

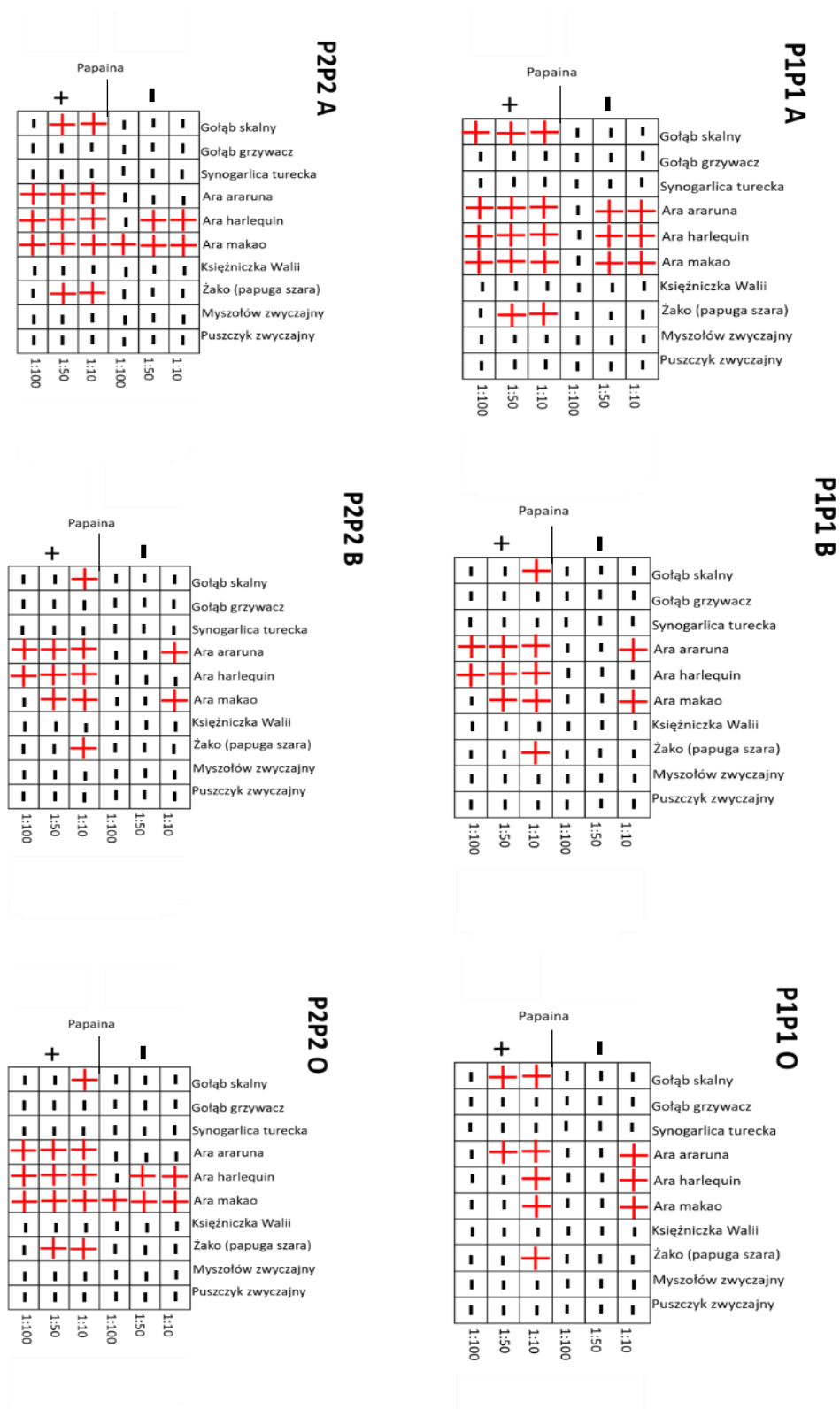


Ryc. 16. Analiza metodą Western blotting lizatów białkowych otrzymanych z erytrocytów gołębi: pocztowego (*C.livia*) oraz ozdobnego (*C.livia**) i kury (*G.gallus*). Panel A: Wiązanie przeciwciał anty-P1 (klon 650 oraz P3NIL100) oraz podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B). Panel B: Kontrole bez przeciwciał pierwszorzędowych dla anty-P1 (klon 650, mysie) (kontrola (M)) i dla anty-P1 (klon P3NIL100, ludzkie) (kontrola (H)). Użyte przeciwciała drugorzędowe wskazane w rozdziale „Materiały i metody”, Tabela 6 w podrozdziale 6.1. Oznaczenia: MW – standard masy cząsteczkowej (Page Ruler Prestained 10-180kDa).

7.1.2. Przeciwciała rozpoznające antygeny oligosacharydowe u ptaków

Zidentyfikowanie antygenów ludzkiego układu grupowego krwi P1PK u przedstawicieli parvklasy ptaków współczesnych oraz zwiększona liczba tych antygenów na erytrocytach gatunków żyjących blisko człowieka zasugerowały możliwość występowania przeciwciał rozpoznających antygeny tego układu grupowego u ptaków, podobnie, jak to może mieć miejsce u ludzi. Aby sprawdzić obecność takich przeciwciał, wykonano testy aglutynacji z użyciem ludzkich erytrocytów i surowic ptaków. Ptasie surowice w różnych rozcieńczeniach inkubowano z erytrocytami osób o grupach krwi P₁, P₂ oraz A, B i O w różnych kombinacjach (Ryc. 17). Największy odsetek

przypadków aglutynacji obserwowano dla erythrocytów osób o fenotypie P₁ (genotyp P¹P¹) /A oraz P₂ (genotyp P²P²) /A i P²P²/O. Surowice ptaków dziko żyjących oraz papugi



Ryc. 17. Aglutynacja erythrocytów osób o różnych grupach krwi przez surowice ptaków różnych gatunków. Podano genotypy P1PK (P¹P¹, P²P²) oraz fenotypy ABO (A, B i O). Oznaczenia: „+”: aglutynacja; „-”: brak aglutynacji.

WYNIKI

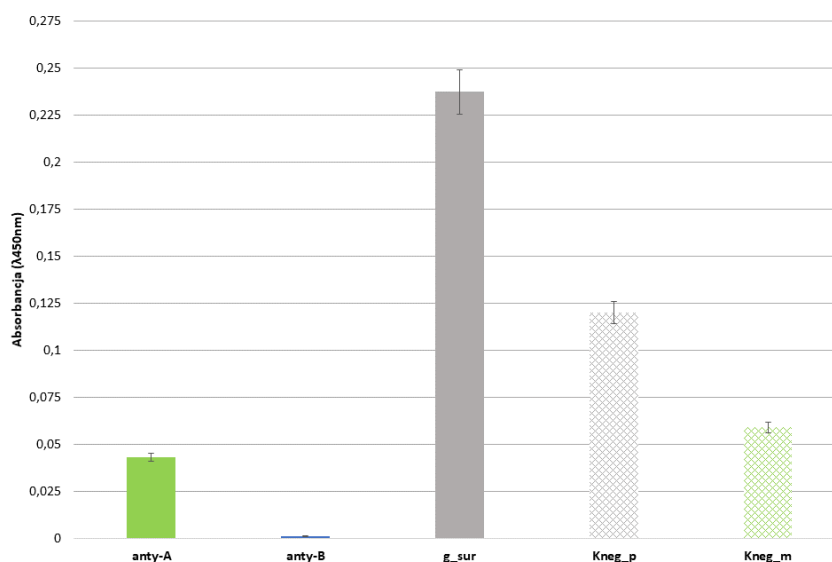
Księżniczki Walii (*Polytelis alexandrae*) nie powodowały aglutynacji ludzkich erytrocytów, natomiast surowice papug *Ara ararauna* (potocznie nazywana zwyczajną) oraz *Ara harlequin* powodowały aglutynację badanych ludzkich erytrocytów, w szczególności o fenotypach P₁A, P₂A oraz P₂O, uprzednio poddanych działaniu papainy. Najmniejszy odsetek aglutynacji obserwowano dla erytrocytów P₁O (Ryc. 17). Aby stwierdzić, czy zawarte w surowicy ptasiej przeciwciała rozpoznają antygeny P₁ lub P^k, zastosowano test hamowania aglutynacji z użyciem owomukoidu jaja gołębiego jako inhibitora, ponieważ białko to zawiera glikoproteiny z glikotopami P₁ (Tabela 16) (François-Gérard, Brocteur and André, 1980; Takahashi *i in.*, 2001). Nie zaobserwowano hamowania aglutynacji, co sugeruje, że przeciwciała te rozpoznają antygeny niezwiązane z układem grupowym P1PK. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy przeciwciała te rozpoznają ludzkie antygeny grupowe AB(H), zastosowano test hamowania aglutynacji z użyciem ludzkiej glikoforyny A otrzymanej z erytrocytów osoby o grupie A. N- i O-glikany takiej glikoforyny A zawierają antygeny A (Fredriksson *i in.*, 2010).

Tabela 16. Test hamowania aglutynacji ludzkich erytrocytów przez gołębią surowicę

ABO	P1PK	P1-owomukoid z jaja gołębiego [µg/ml]											
		200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,195	0,098
A	P ¹ P ¹	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
A	P ² P ²	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
O	P ² P ²	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		BSA [µg/ml]											
		200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,195	0,098
A	P ¹ P ¹	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
A	P ² P ²	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
O	P ² P ²	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		Glikoforyna A (grupa krwi A) [µg/ml]											
		200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,195	0,098
A	P ¹ P ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	P ² P ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
O	P ² P ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Glikoforyna A (grupa krwi O) [µg/ml]											
		50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,195	0,098	0,049	0,025
O	P ² P ²	-	-	+/-	+/-	+	+	+	++	++	++	++	++

Glikoforyna A hamowała aglutynację, co sugeruje, że antygenem rozpoznawanym przez przeciwciała z ptasich surowic może być ludzki antygen grupowy A (Tabela 16). Niestety, nasze laboratorium nie dysponuje glikoforyną A otrzymaną z erytrocytów osoby o grupie B, co uniemożliwiło sprawdzenie, czy ptasie surowice zawierają przeciwciała o swoistości anty-B. Zastosowanie glikoforyny A od osoby o grupie O również hamowało aglutynację. Hamowanie było obserwowane tylko dla

erytrocytów traktowanych nieswoistą proteazą papainą wskazując, że gołębia surowica zawiera przeciwciała rozpoznające ludzkie antygeny A/B/H będące na glikoforynie, nie zaś samo białko. Za pomocą testu ELISA wykazano, że przeciwciała z surowicy gołębia skalnego wiążą się do ludzkiej glikoforyny A otrzymanej z erytrocytów osoby o grupie A (Ryc. 18).



Ryc. 18. Analiza wiązania gołębiej surowicy do ludzkiej glikoforyny A w teście ELISA. Oznaczenia: anty-A, anty-B: przeciwciała do oznaczania grup krwi ABO; g_sur: gołębia surowica; Kneg_p: kontrola negatywna bez dodatku surowicy dla drugorzędowego przeciwciała anty-ptak IgG-HRP; Kneg_m: kontrola negatywna bez dodatku pierwszorzędowych przeciwciała dla drugorzędowego przeciwciała anty-mysz IgG-HRP.

Do wykrywania przeciwciał gołębia użyto poliklonalnego przeciwciała anty-ptasie IgG. Obserwowano stosunkowo duże nieswoiste wiązanie przeciwciał anty-IgG do glikoforyny A (Kneg_p, gdzie nie użyto gołębiej surowicy).

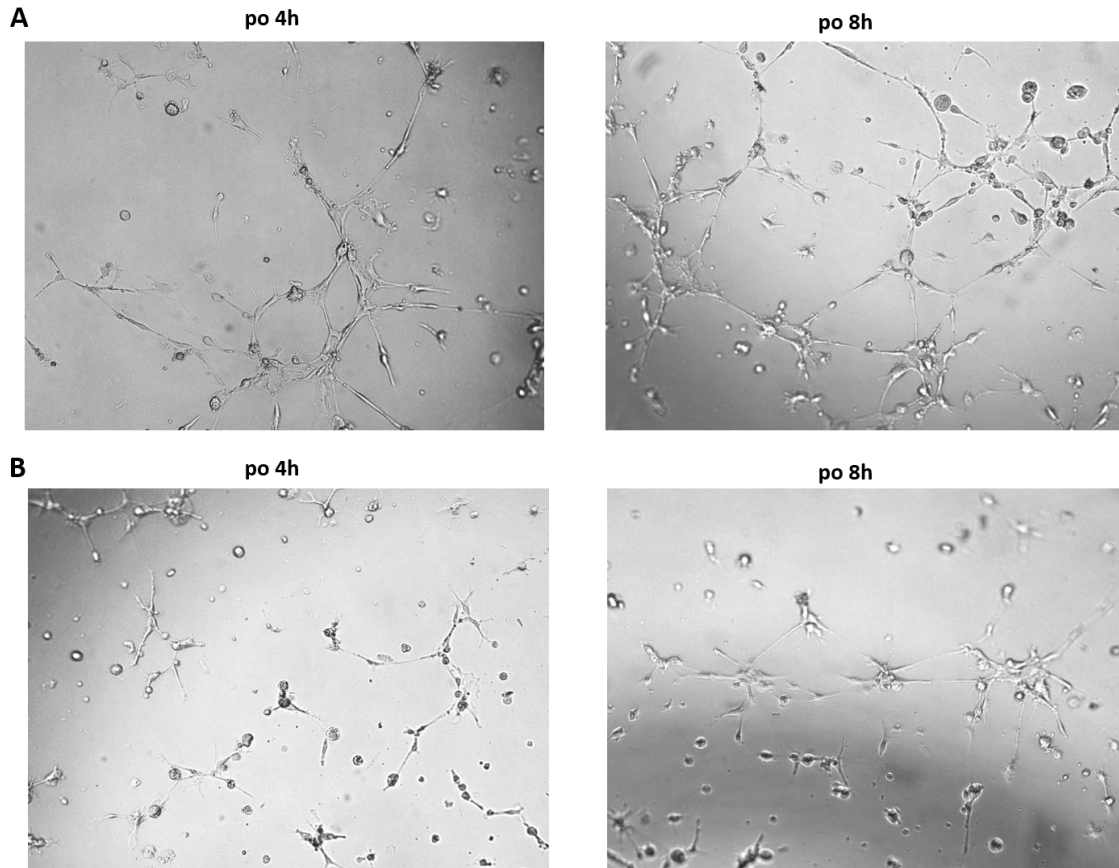
7.1.3. Glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na komórkach śródbłonka gołębia

Aby zbadać obecność glikotopów Gal α 1 \rightarrow 4Gal na komórkach śródbłonka gołębia, wykonano barwienie immunohistochemiczne skrawków tkanek. Wstępną charakterystykę ptasich pierwotnych linii komórek śródbłonkowych pozyskanych z aorty gołębia i kury przygotowano z wykorzystaniem metod użytych w podrozdziale 6.2.1.1 w doświadczeniach z erytrocytami ptaków.

Ze względu na brak swoistych przeciwciał rozpoznających markery powierzchniowe komórek śródbłonkowych u ptaków, do wstępnej charakterystyki fenotypowej tych komórek wykorzystano ich zdolność do tworzenia pseudonaczyń na podłożu Matrigel® (opis w podrozdziale 6.4.6).

Po około 4 h inkubacji komórek śródbłonka kury i gołębia obserwowano załączki pierwszych pseudonaczyń (Ryc. 19). Po 8 h liczba obserwowanych połączeń podwoiła się i pojawiło się charakterystyczne „narastanie” pseudonaczyń, szczególnie dla komórek uzyskanych z tkanki gołębia (Ryc. 19A). Komórki endotelialne kury utworzyły mniej połączeń niż komórki gołębia w tych samych przedziałach czasowych (Ryc. 19B).

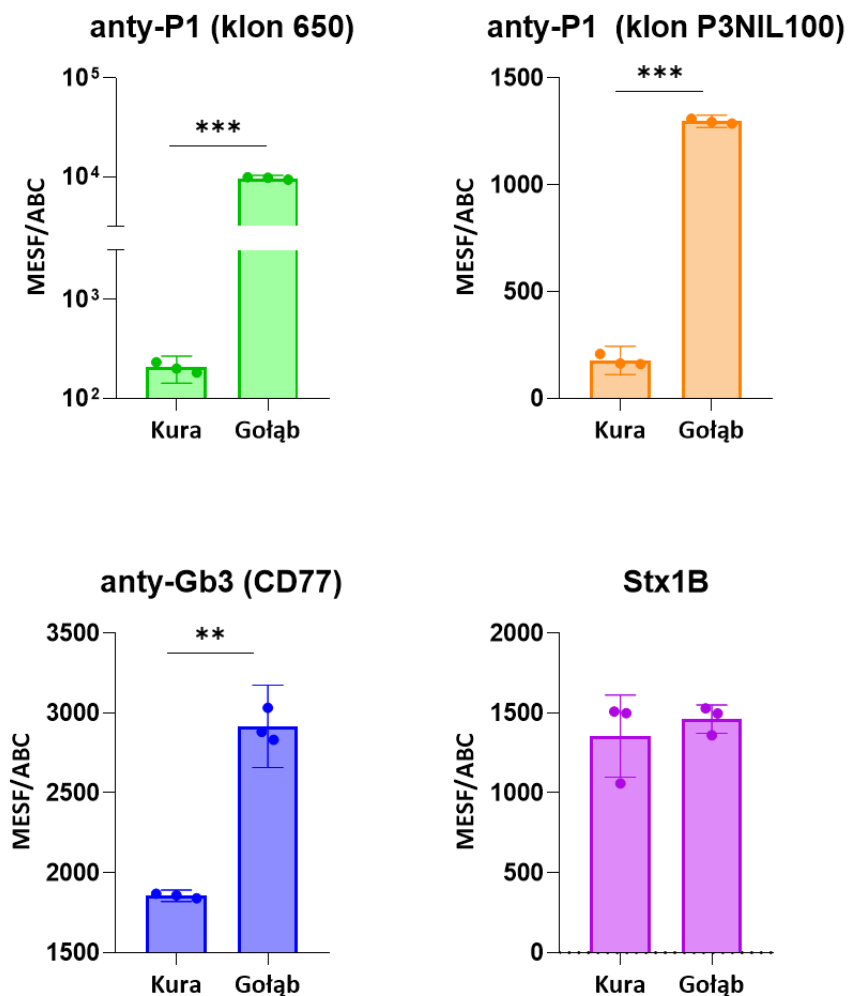
Z uwagi na ograniczony potencjał proliferacyjny komórek pierwotnych przeprowadzono próbę unieśmiertelnienia gołębiej śródbłonkowej linii komórkowej. Do unieśmiertelniania wykorzystano lentiwirusa zawierającego w sobie sekwencje dla gołębiego genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (*TERT*, GenBank: XM_021297821). Gen ten ulega ekspresji w komórkach macierzystych, aktywowanych limfocytach i komórkach szybko dzielących się (Yuan and Xu 2019). Ponowną ekspresję genu *TERT* zaobserwowano w 80-90% nowotworów złośliwych (Pestana *i in.*, 2017; Colebatch, Dobrovic and Cooper, 2019). Gen *TERT* był już wykorzystywany do unieśmiertelniania kurzych predipocytów (Wang *i in.*, 2017). Nie uzyskano jednak do tej pory linii komórkowej pochodzącej od przedstawicieli ptaków współczesnych. W niniejszym projekcie nie udało się uzyskać nieśmiertelnej linii komórkowej. W każdej z wielu podjętych prób liczba kurzych i gołębiich komórek spadała do zera po około 4–6 tygodniach od transdukcji.



Ryc. 19. Tworzenie pseudonaczyń przez komórki śródbłonkowe gołębia (panel A) i kury (panel B).

Aby zbadać obecność glikotopów $\text{Gal}\alpha 1\rightarrow 4\text{Gal}$ na powierzchni komórek śródbłonkowych ptaków, wykonano analizę cytofluorometryczną, która wykazała, że przeciwciała anti-P1 (klony 650 oraz P3NIL100) i anti-CD77 (Gb3) wiążą się do komórek otrzymanych z aorty gołębia, ale nie do komórek otrzymanych z aorty kury, przy czym wiązanie przeciwciała anti-P1 (klon 650) jest silniejsze od wiązania przeciwciała anti-P1 (klon P3NIL100).

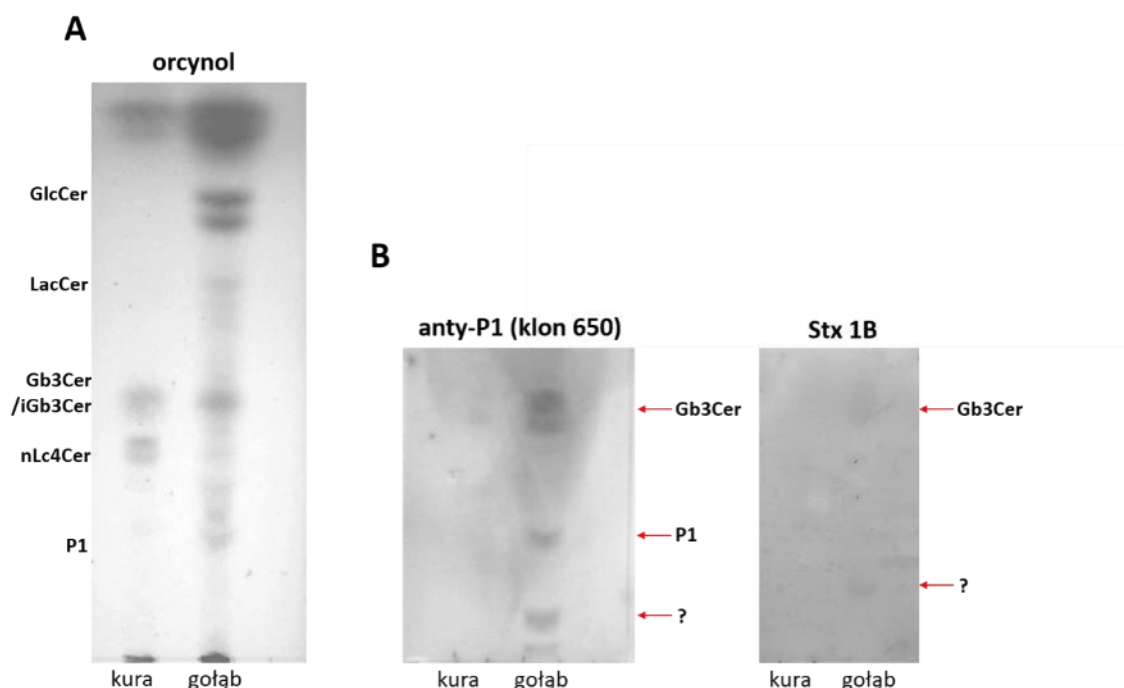
Wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) do komórek śródbłonkowych gołębia było na podobnym poziomie, co wiązanie przeciwciała anti-P1 (klon P3NIL100). Wiązanie Stx1B do komórek śródbłonkowych kury było niskie i podobne do wiązania obserwowanego dla komórek śródbłonkowych gołębia (Ryc. 20).



Ryc. 20. Analiza cytofluorometryczna wiązania przeciwciał anti-P1 (klon 650 i P3NIL100), anti-CD77 oraz podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) do pierwotnych komórek endotelialnych uzyskanych ze śródbłonna aorty gołębia i kury.

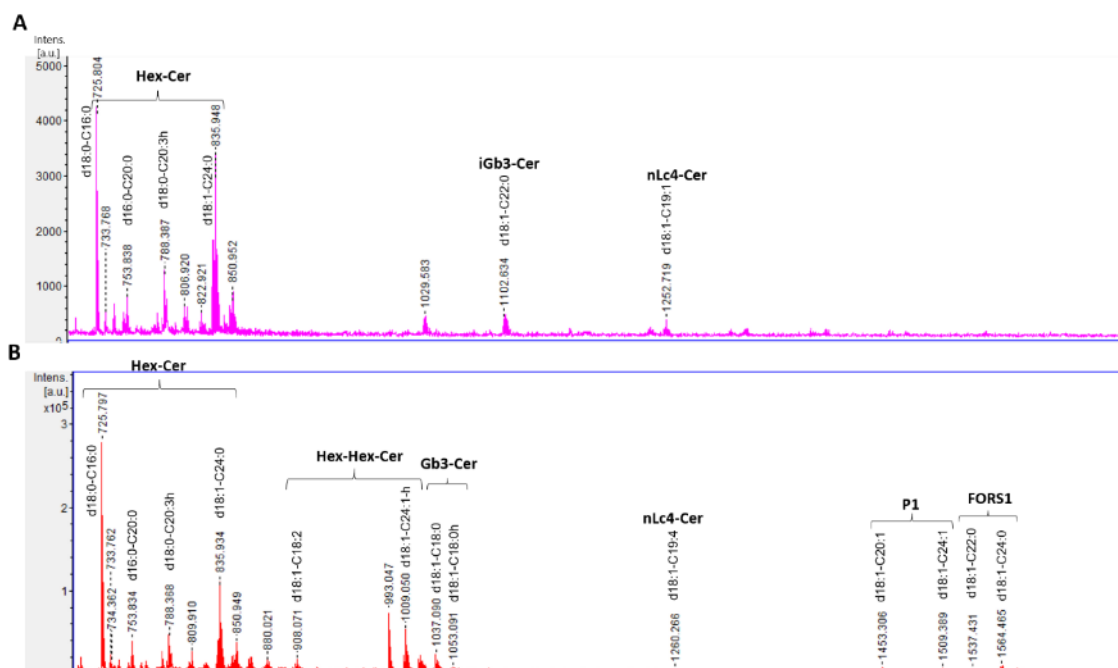
7.1.3.1. Charakterystyka glikosfingolipidów i glikoprotein komórek śródbłonna gołębiej aorty

Analiza HPTLC frakcji glikosfingolipidów neutralnych wyizolowanych z komórek śródbłonkowych gołębia i kury wykazała, że w obu rodzajach komórek głównymi glikosfingolipidami są LacCer i GlcCer (Ryc. 21). Ponadto, w GSL kury wykryto glikosfingolipid migrujący podobnie do Gb3Cer, ale niereagujący z przeciwciałem rozpoznającym Gb3 (Ryc. 21B). Frakcja neutralnych GSL gołębia zawierała glikosfingolipidy o dłuższych łańcuchach cukrowych (nLc4Cer, P1, FORS1). Przeciwciało anti-P1 (klon 650) oraz podjednostka 1B toksyny Shiga wiązały się do Gb3 we frakcji neutralnych GSL wyizolowanych z komórek śródbłonkowych gołębia (Ryc. 21B).



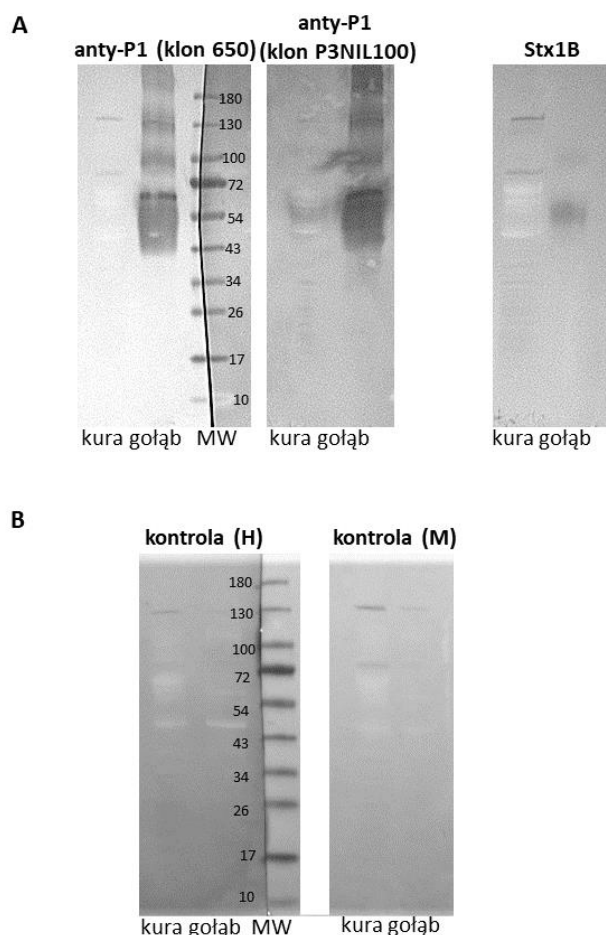
Ryc. 21. HPTLC frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z pierwotnych komórek endotelialnych kury i gołębia. Panel A: barwienie orcynolem; Panel B: detekcja z użyciem przeciwciała anti-P1 (klon 650) oraz podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B). Czerwonymi strzałkami oznaczono prążki odpowiadające opisanym GSL. Znakiem zapytania oznaczono glikosfingolipidy, których nie udało się zidentyfikować.

Spektrometria MALDI-TOF wykazała obecność we frakcji glikosfingolipidów neutralnych z kurzych komórek endotelialnych kilku jonów odpowiadających GlcCer z łańcuchami acylowymi o różnej długości (od 16:0 do 24:0) (Ryc. 22A). Dodatkowo zidentyfikowano jon m/z 1102,6 odpowiadający izoglobotriaocyloceramidowi (iGb3Cer) oraz m/z 1252,7 (paraglobozyd) (nLc4Cer). We frakcji glikosfingolipidów neutralnych z gołębiich komórek endotelialnych również zidentyfikowano jony odpowiadające GlcCer (od 16 do 24 atomów węgla w łańcuchu acylowym ceramidu). Ponadto zidentyfikowano jony m/z 908,1 oraz m/z 1009,1 dla LacCer (18:2 oraz 24:1-h), m/z 1260,3 dla nLc4Cer o niespotykanym łańcuchu węglowym z wieloma nienasyconymi wiązaniami (19:4). Zidentyfikowano również jony dla antygenu P1 (m/z 1453,3 oraz m/z 1509,4, odpowiednio dla łańcuchów acylowych ceramidu o długości: 20:1 oraz 24:1) oraz antygenu Forssman (m/z 1537,4 oraz m/z 1564,5 dla łańcuchów acylowych o długości: 22:00 i 24:0) (Ryc. 22B).



Ryc. 22. Widma masowe MALDI-TOF glikosfingolipidów neutralnych wyizolowanych z pierwotnych komórek endotelialnych kurzych (panel A) oraz gołębia (panel B). Oznaczenia: h – OH, hydroksylowany łańcuch acylowy reszty ceramidu.

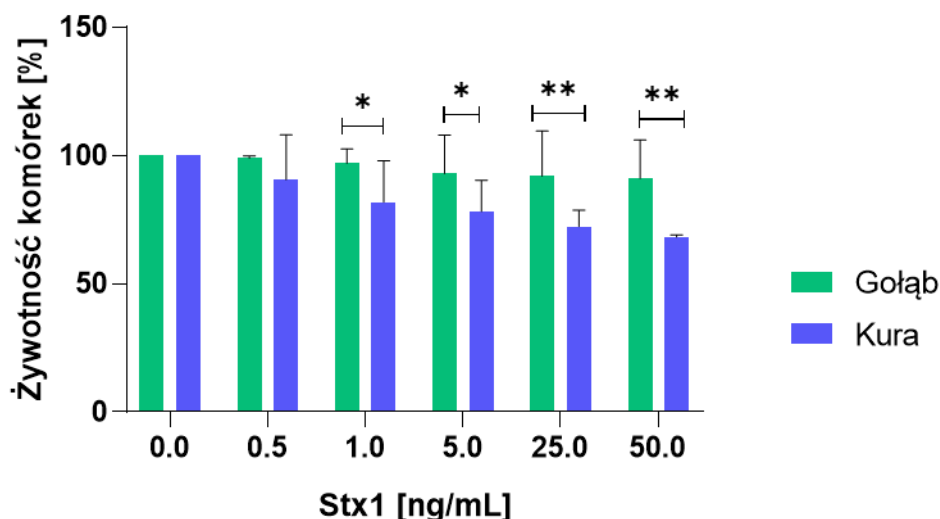
W analizie Western blotting lizatów uzyskanych z komórek gołębia (Ryc. 23) obserwowano swoiste wiązanie przeciwciał anti-P1 (klon 650 i P3NIL100) do białek o masie cząsteczkowej powyżej 43 kDa. Podjednostka 1B toksyny Shiga wiązała się jedynie do białek o masie cząsteczkowej 54 i 100 kDa z komórek gołębia. Nie wykazano swoistego wiązania do komórek otrzymanych ze śródbłonna kury.



Ryc. 23. Analiza metodą Western blotting lizatów białkowych otrzymanych z pierwotnych komórek endotelialnych kury i gołębia. Panel A: Wiązanie przeciwciał anti-P1 (klon 650 i P3NIL100) i podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B); Panel B: Kontrole negatywne bez użycia przeciwciał pierwszorzędowych. Oznaczenia: MW: standard masy (Page Ruler PreStained, 10-180 kDa); Kontrola (M): bez przeciwciała pierwszorzędowego dla anti-P1 (klon 650, mysie); kontrola (H): bez przeciwciała pierwszorzędowego dla anti-P1 (klon P3NIL100, ludzkie).

7.1.3.2. Wrażliwość komórek śródbłonna gołębiej aorty na toksyny Shiga

Aby określić bezpośredni wpływ holotoksyny Stx1 na przeżywalność komórek, wykonano testy cytotoksyczności z użyciem holotoksyny i endotelialnych komórek gołębia i kury. Wykazano, że komórki endotelialne gołębia są stosunkowo niewrażliwe na holotoksynę Stx1 nawet przy zastosowaniu wysokiego stężenia roztworów holotoksyny (50 ng/ml). Obserwowany efekt cytotoksyczny holotoksyny był niewielki (spadek żywotności komórek do 89% przy najwyższym zastosowanym stężeniu holotoksyny). Efekt cytotoksyczny można było natomiast zaobserwować dla komórek endotelialnych kury: po inkubacji z roztworem holotoksyny o stężeniu 50 ng/ml żywotność komórek spadła do 68% (Ryc. 24).



Ryc. 24. Żywotność pierwotnych ptasich komórek endotelialnych (wyrażona w %) po wystawieniu na działanie holotoksyny Shiga 1 (Stx1). Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe. Dane były analizowane z użyciem dwukierunkowego testu ANOVA z wykorzystaniem testu Holma-Sidaka (*post-hoc* test) do porównań wielokrotnych. */** - poziom istotności (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$).

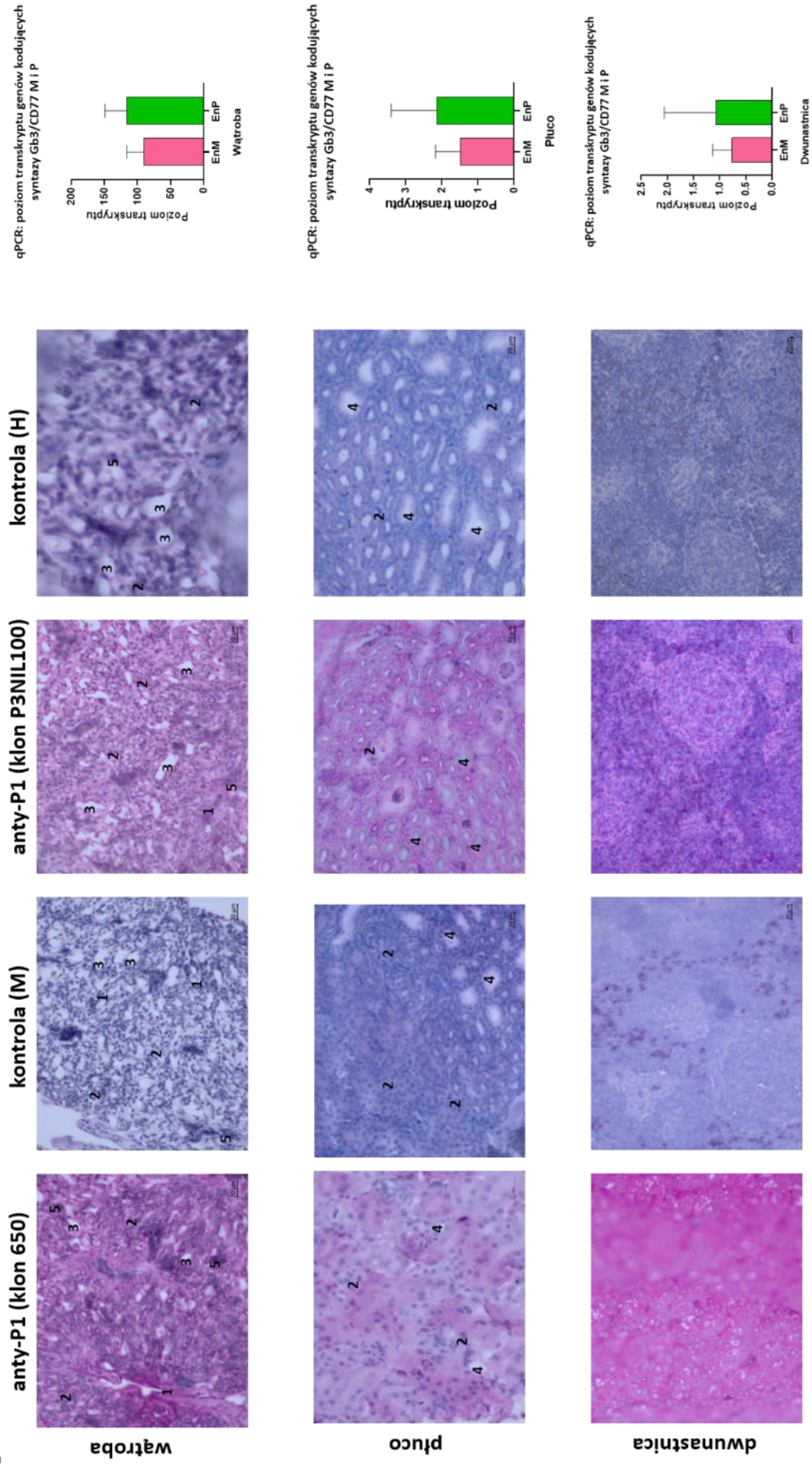
7.1.4. Glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na innych tkankach gołębia

W celu analizy obecności glikotopów P1 na tkankach gołębia i kury pochodzących z różnych narządów, wykonano barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał anti-P1 (klon 650 oraz P3NIL100). Wybrano preparaty uzyskane z trzech organów każdego ptaka: wątroby, dwunastnicy oraz płuc. Preparaty uzyskane z tkanek gołębia swoiście wiązały obydwa klony przeciwciał anti-P1 (Ryc. 25A). Glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal zidentyfikowano w błonie mięśniowej (*muscularis externa*) dwunastnicy; śródbłonku oskrzelowym i śródmiąższu u nasady przegrody płuc, gdzie obserwowano również dużą liczbę jądrzastych erytrocytów i makrofagów; w wątrobie, obok hepatocytów, erytrocytów, mikroguzków komórek Kupffera oraz sinusoid skierowanych w stronę żyły głównej. Zaobserwowano również mikropęcherzykową wakuolację tłuszczową (przemieszczenie cytoplazmy hepatocytów ze względu na obecność wakuoli lipidowych różnej wielkości; jądra hepatocytów są przesunięte do sinusoidalnej granicy; zjawisko uznawane za normalne dla piskląt, występujące również u osobników będących na diecie wysokotłuszczowej). Nie zaobserwowano wiązania w kontrolach negatywnych.

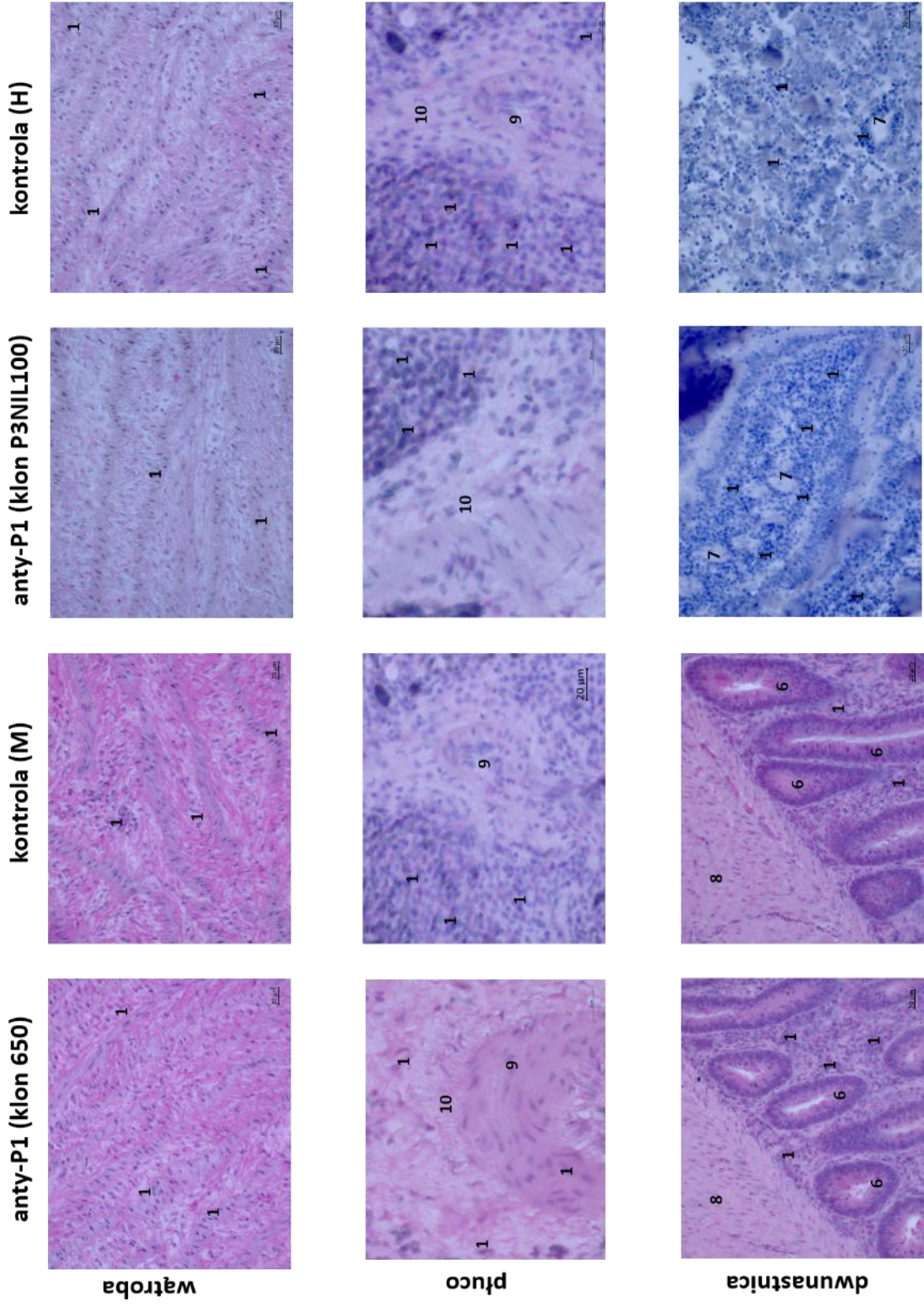
W preparatach uzyskanych z tkanek kury nie stwierdzono obecności glikotopów Gal α 1 \rightarrow 4Gal. Obserwowane wiązania były nieswoiste i pokrywały się z wynikami kontroli negatywnych (Ryc. 25B).

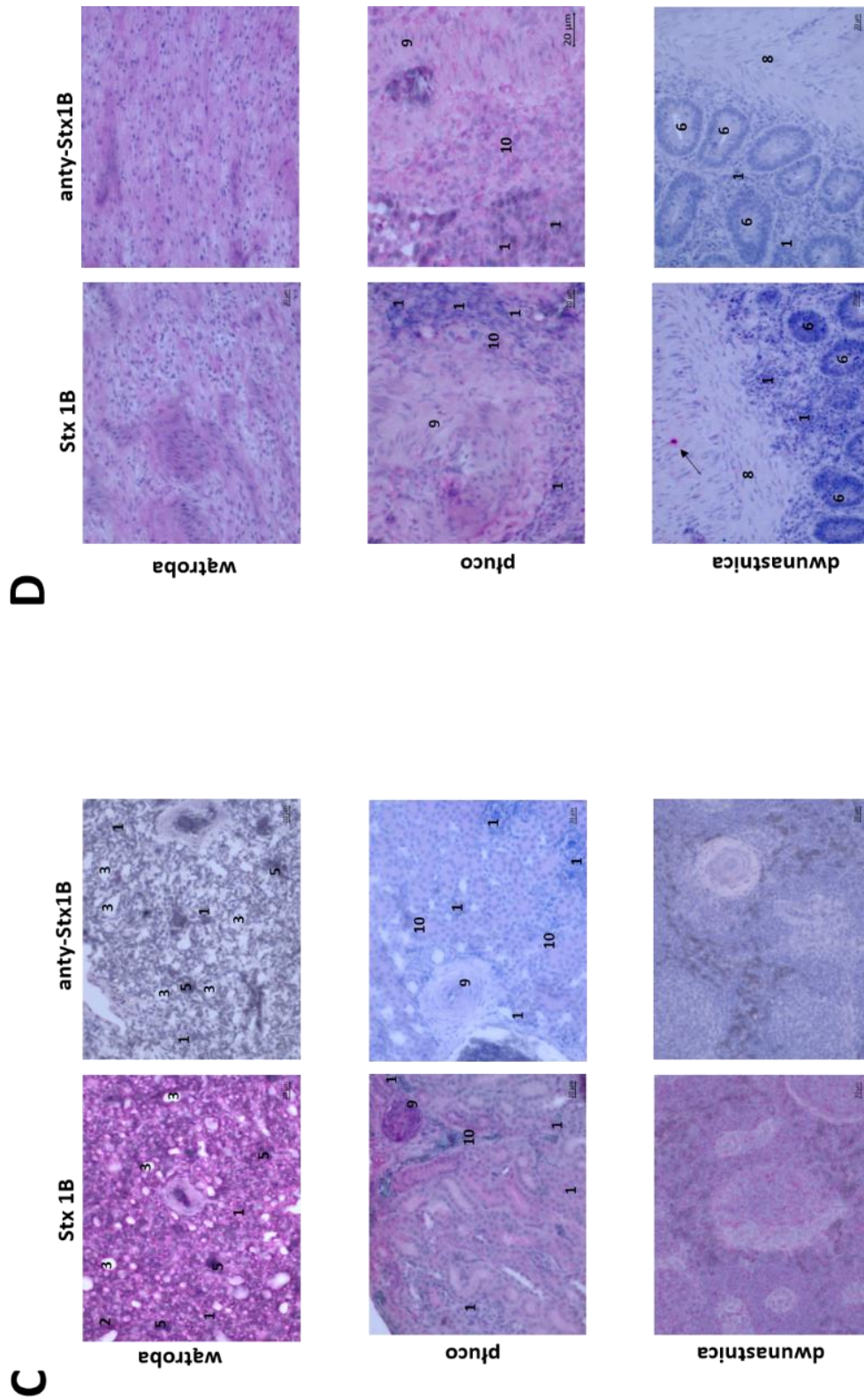
Podobne wyniki uzyskano dla podjednostki 1B toksyny Shiga (Ryc. 25C, D). Swoiste wiązanie obserwowano jedynie dla tkanek gołębia, w preparatach otrzymanych z tkanek kury wiązanie było nieswoiste (Ryc. 25D). Jedynie dla preparatu otrzymanego z dwunastnicy zaobserwowano pojedyncze wiązanie podjednostki toksyny w obrębie blaszki mięśniowej błony śluzowej (zaznaczone strzałką na Ryc. 25D). Jest to prawdopodobnie artefakt.

A



B





Ryc. 25. Barwienie immunohistochemiczne hematoksyliną i detekcja antygenów P1 i P^k (Panel A i B) oraz wiązania podjednostki 1B toksyny Stx (Panel C i D) na skrawkach pochodzących z tkanek gołębia (Panel A i C) oraz kury (Panel B i D). Oznaczenia: 1: skupiska komórek jednojądrzastych (np. erytrocytów); 2: bełeczki wątrobowe z sinusoidami; 3: wakuole tłuszczowe; 4: kanalik powietrzny między ścianami naczyń włosowatych; 5: przegroda międzypłacikowa; 6: krypta Lieberkühna; 7: część kosmka krypty dwunastnicy; 8: blaszka mięśniowa błony śluzowej; 9: gruczoł Bowmana; 10: skupisko komórek gruczołowych śluzowych.

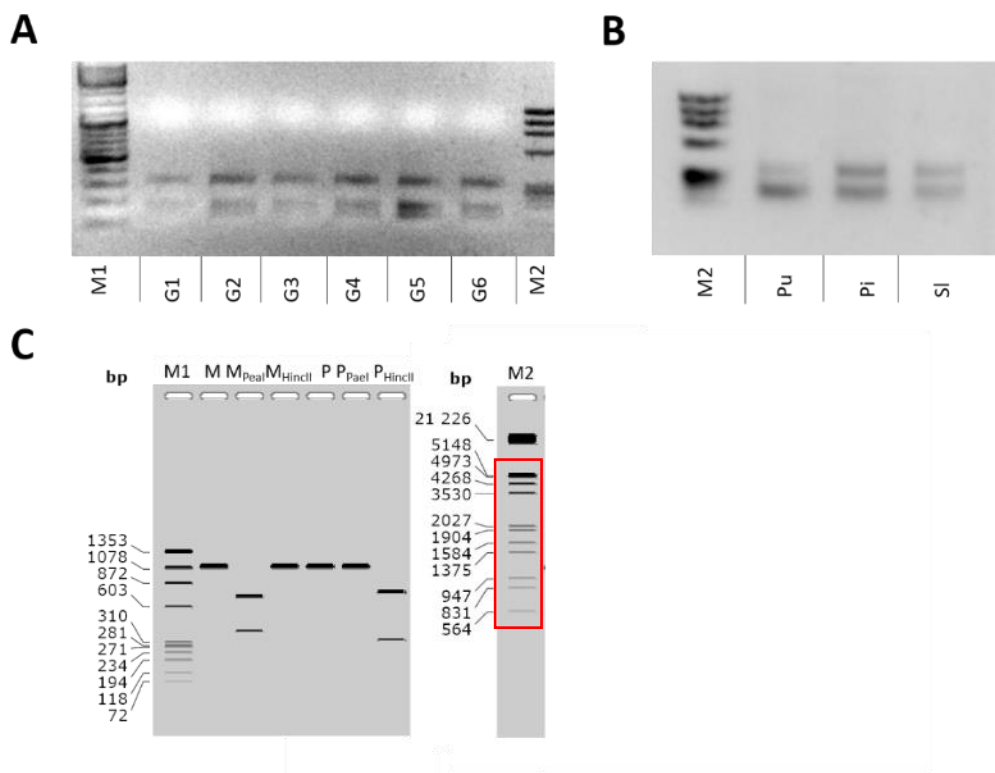
7.2. Charakterystyka swoistości syntazy Gb3/CD77 u gołębia

7.2.1. Dwa geny kodujące syntazy Gb3/CD77 u gołębia

W celu zbadania swoistości syntazy Gb3/CD77 u gołębia, podjęto próbę sklonowania genu kodującego ten enzym. Wykorzystano startery opisane przez Suzuki i współpr. oraz genomowe DNA wyizolowane z wątroby z gołębia pocztowego *C. livia*. Uzyskano klony o dwóch sekwencjach: jeden z nich został zidentyfikowany jako syntaza Gb3/CD77 gołębia, a jego sekwencja została opisana wcześniej przez Suzuki i współpr. (Suzuki i Yamamoto, 2010) (GenBank: NM_001315524.1). Gen o tej sekwencji został nazwany genem P. Drugim, którego sekwencja nukleotydowa wykazywała homologię 93,3% wobec sekwencji genu P został nazwany genem M (Ryc. S3). Homologia jego sekwencji aminokwasowej wobec genu P wynosiła 90,5%. Nazwy genów pochodzą od ras gołębi, u których je znaleziono: pocztowego i mewki.

W genie M obecna jest mutacja punktowa c.631C>G, której obecność w genie kodującym ludzką syntazę Gb3/CD77 powoduje rozszerzenie swoistości akceptorowej enzymu, w wyniku czego produkcje on również antygen NOR (podrozdział 4.1.4).

Porównanie sekwencji nukleotydowych genów M i P oraz sekwencji aminokwasowych enzymów M i P zamieszczono na Ryc. S3 i Ryc. S4A w Suplemencie. Aby sprawdzić czy geny te nie są allelicznymi odmianami tego samego genu, wykonano trawienie enzymami restrykcyjnymi PaeI i HincII, które rozpoznają sekwencje obecne odpowiednio w genach kodujących enzym M i enzym P. Wszystkie próbki DNA uzyskane z krwi gołębi oraz innych analizowanych gatunków ptaków współczesnych (m.in. puszczyk, słonka) były trawione przez obie te restryktazy (Ryc. 26).



Ryc. 26. Trawienie różnicujące M/P dla różnych gatunków ptaków: gołębi (Panel A); puszczyka, pingwina i słonki (Panel B); symulacja trawienia sekwencji gołębiich genów *A4GALT* wykonana w programie SnapGene. Oznaczenia: M1: marker masy Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII); M2: marker masy Lambda DNA/HindIII; G1-G6: próbki od różnych gołębi pocztowych; Pu: puszczyk; Pi: pingwin; Sl: słonka. Na czerwono zaznaczono fragment markera M2 widoczny na prezentowanych żelach.

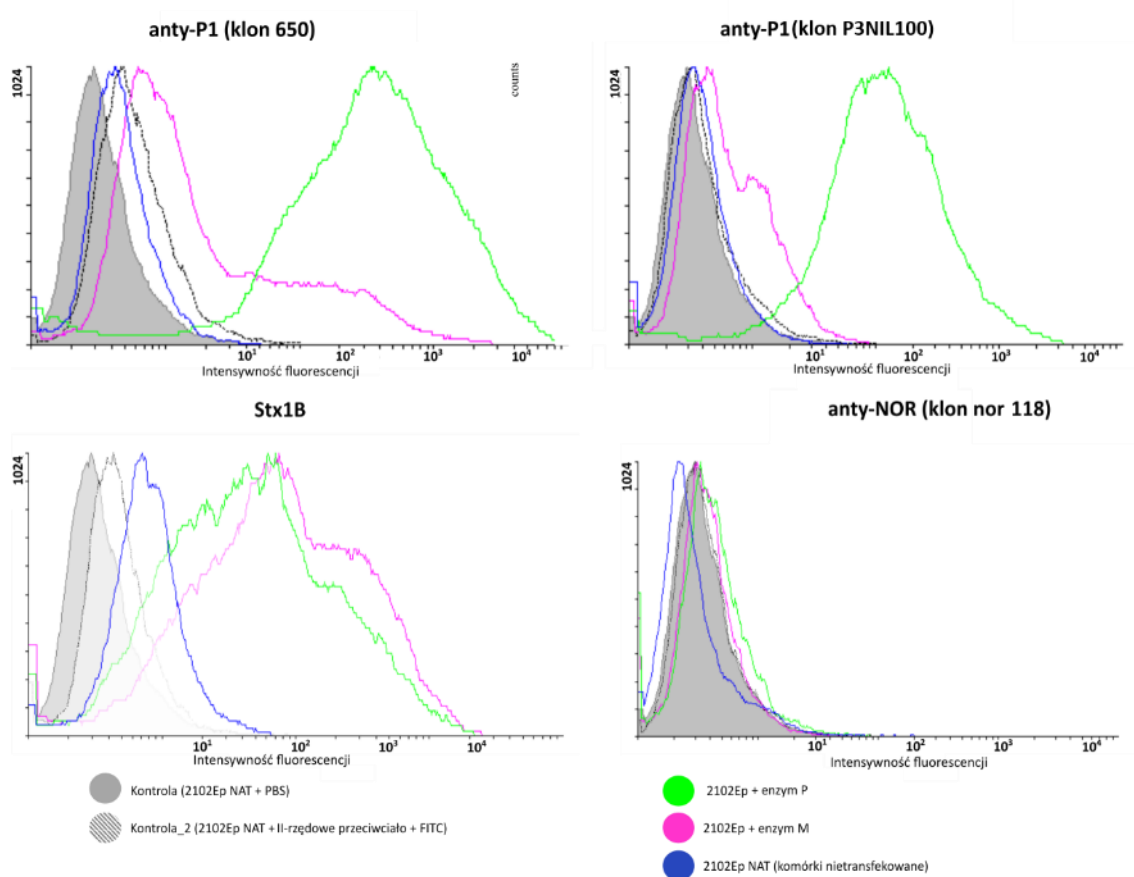
7.2.2. Otrzymanie gołębiich syntaz Gb3/CD77 w komórkach 2102Ep

W celu wykonania charakterystyki obydwu enzymów i zbadania ich swoistości substratowej, oba geny sklonowano do wektora pCAG i użyto do przejściowej transfekcji komórek linii ludzkiego potworniakoraka jądra 2102Ep (Liew *i in.*, 2008; Suchanowska *i in.*, 2012).

Do amplifikacji ptasiego genu *A4GALT* użyto uprzednio opisanych starterów (Suzuki i Yamamoto, 2010) oraz genomowego DNA gołębia (opis w podrozdziale 6.3.1).

Analiza wiązania przeciwciał anty-P1 (klon 650 oraz P3NIL100), anty-NOR oraz podjednostki 1B toksyny Shiga z użyciem cytofluorometrii przepływowej wykazała, że komórki transfekowane wektorem kodującym enzym P charakteryzowały się podwyższonym poziomem produkcji glikotopów Gal α 1 \rightarrow 4Gal w porównaniu z komórkami transfekowanymi wektorem kodującym enzym M (Ryc. 27). Przeciwciało anty-P1 (klon 650) wiązało się również do nietransfekowanych komórek 2102Ep; działa

się tak ze względu na obecność endogennej (ludzkiej) syntazy Gb3/CD77 (Suchanowska *i in.*, 2012). Wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) do komórek transfekowanych wektorami kodującym enzym M lub P było wyższe niż do komórek nietransfekowanych. Komórki nietransfekowane ze względu na obecność endogennego Gb3 również wykazywały wiązanie podjednostki Stx1B. Nie obserwowano wiązania dla przeciwciała anty-NOR do komórek transfekowanych wektorami kodującym enzym M lub P.

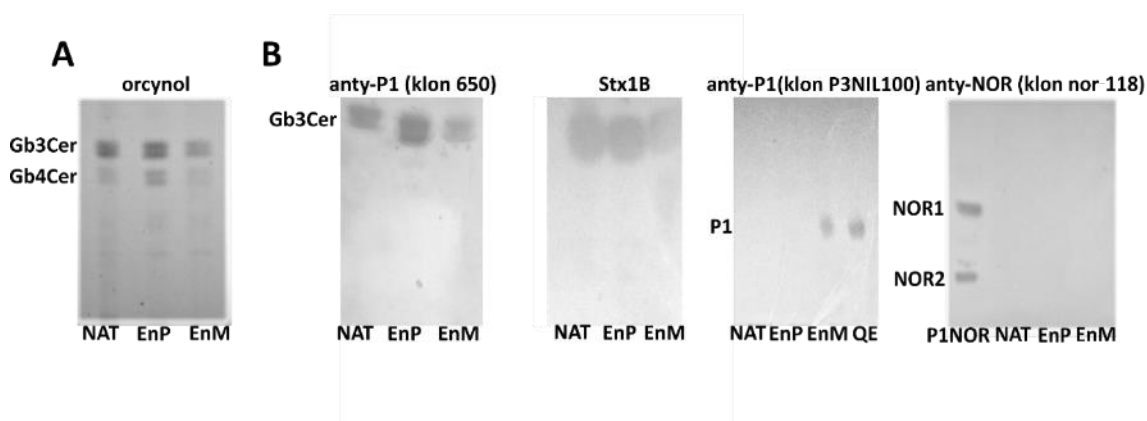


Ryc. 27. Analiza cytofluorometryczna komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M lub P z wykorzystaniem przeciwciał anty-P1 (klon 650 i P3NIL100), anty-NOR (klon nor118) oraz podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B).

7.2.2.1. Charakterystyka glikosfingolipidów i glikoprotein z komórek 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi enzymy M i P

Analiza HPTLC wykazała, że głównymi obojętnymi glikosfingolipidami są dwie formy Gb3Cer i Gb4Cer zawierające hydroksylowane i niehydroksylowane reszty kwasów tłuszczowych (Ryc. 28A). Przeciwciało anty-P1 (klon 650) wiązało się do prążka

odpowiadającego Gb3Cer, podczas gdy przeciwciało anti-P1 (klon P3NIL100) wiązało się do prążka odpowiadającego antygenowi P1, ale tylko we frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z komórek transfekowanych wektorem kodującym enzym M (Ryc. 28B). Nie zaobserwowano wiązania przeciwciała anti-NOR (Ryc. 28B). Podjednostka 1B toksyny Shiga rozpoznawała tylko Gb3Cer, podobnie jak przeciwciało anti-P1 (klon 650).

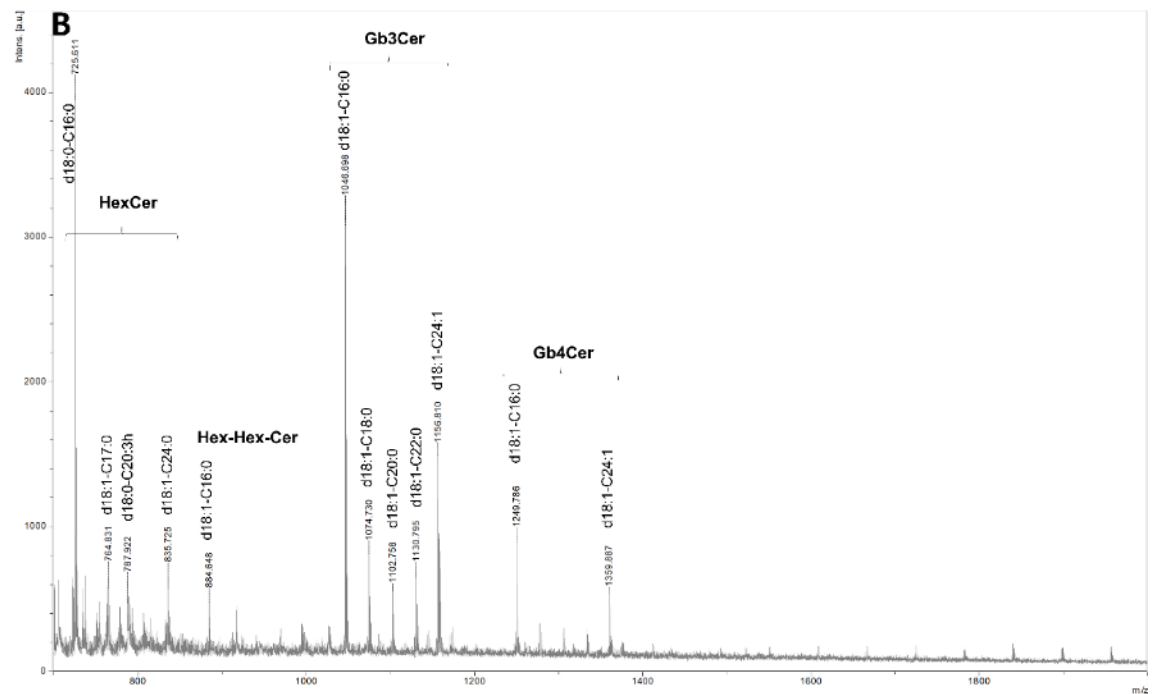
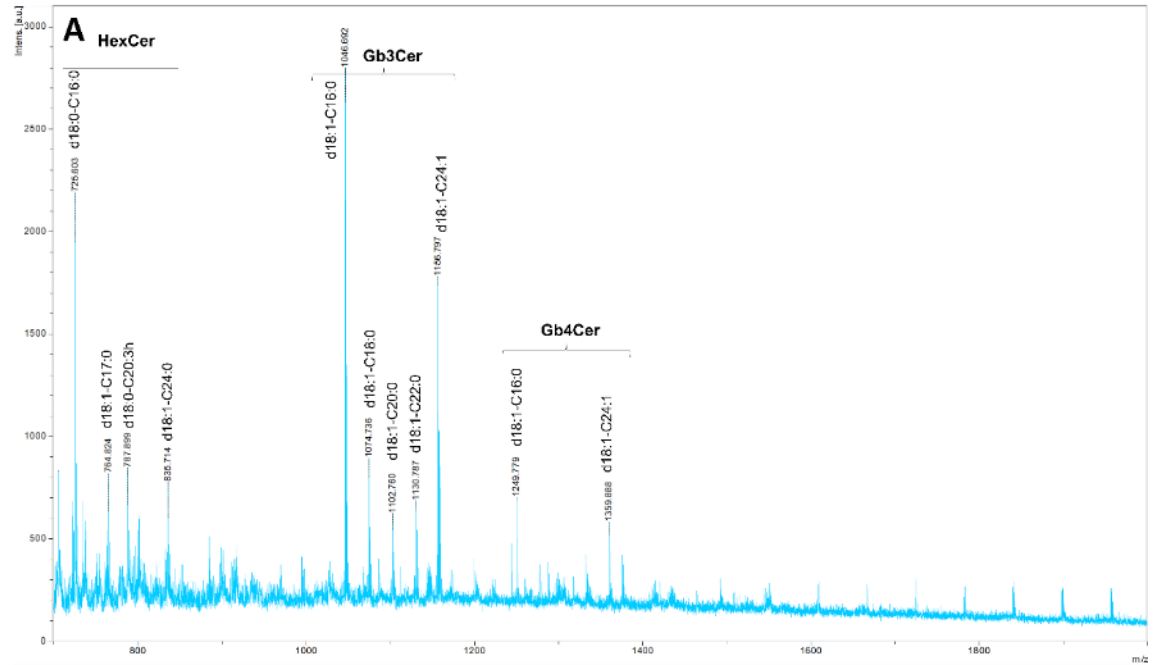


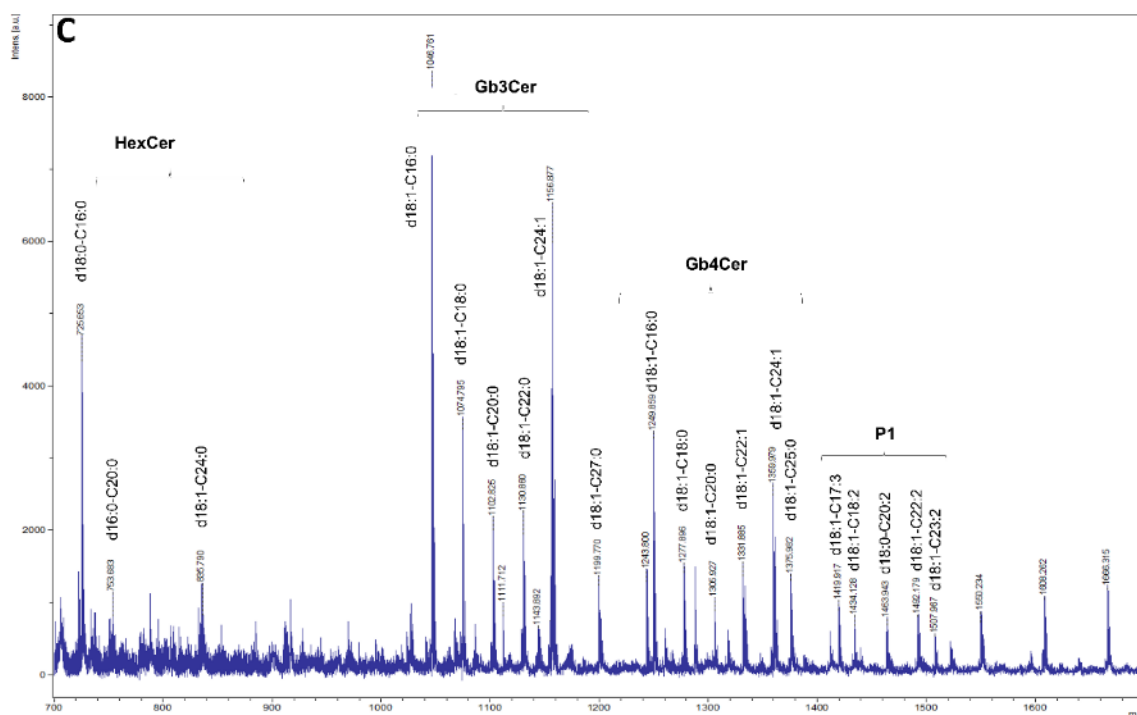
Ryc. 28. Analiza HPTLC frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z komórek linii 2102Ep. Panel A: barwienie orcynolem; Panel B: detekcja z użyciem przeciwciał anti-P1 (klon 650 i P3NIL100), anti-NOR oraz podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B). Oznaczenia: NAT: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z nietransfekowanych komórek linii 2102Ep; EnM: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym enzym M; EnP: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym enzym P; P1NOR: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z erytrocytów osoby o fenotypie P₁NOR; QE: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym ludzką syntazę Gb3/CD77 z podstawieniem p.Q211E (jako pozytywna kontrola dla przeciwciała anti-P1 (klon P3NIL100)).

Spektrometria MALDI-TOF wykazała, że głównymi składnikami neutralnych frakcji GSL wyizolowanych z nietransfekowanych komórek linii 2102Ep były: GlcCer, Gb3Cer i Gb4Cer z dominującymi jonami przy m/z 725,6 (GlcCer), m/z 1046,7 i m/z 1156,8 (Gb3Cer), oraz m/z 1249,8 i 1359,9 (Gb4Cer). Prawie identyczne widma masowe uzyskano dla GSL z komórek transfekowanych wektorem kodującym enzym P; dodatkowo zidentyfikowano w nich jon m/z 884,6 dla LacCer (Hex-Hex-Cer) (Ryc. 29A i B). Komórki produkujące enzym M również zawierały te same jony: GlcCer, Gb3Cer i Gb4Cer. Ponadto zidentyfikowano jony w zakresie od m/z 1419,9 (izoforma ceramidu C17:3) do 1507,96 (izoforma ceramidu C23:2), które mogą odpowiadać ludzkiemu antygenowi P1/NOR (Ryc. 29C). Z uwagi na brak reakcji z przeciwciałem anti-NOR w testach immunologicznych HPTLC, założono, że wymienione jony pochodzą od homologa antygeny P1. Dla prawie każdego glikosfingolipidu zaobserwowano od 3 do 5 jonów odpowiadających izoformom o różnej długości łańcucha acylowego. Wśród jonów

WYNIKI

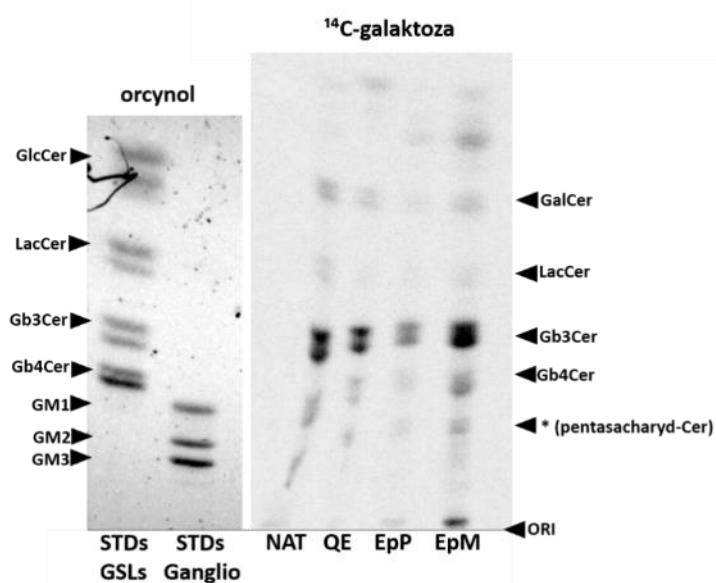
zidentyfikowanych dla komórek produkujących enzym M, szczególnie dla glikosfingolipidu P1, zidentyfikowano kilka rzadkich i nietypowych długości i/lub modyfikacji kwasów tłuszczowych (wielonienasycone łańcuchy węglowodorowe).





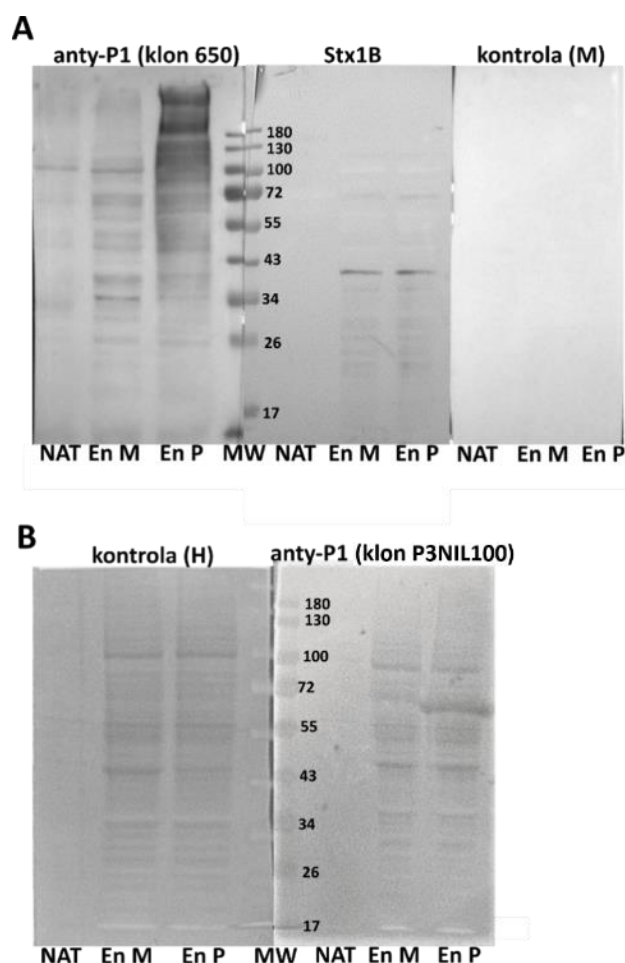
Ryc. 29. Widma masowe MALDI-TOF frakcji glikosfingolipidów neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep nietransfekowanych lub transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M lub P. Panel A: widmo masowe frakcji neutralnych GSL wyizolowanych z nietransfekowanych komórek linii 2102Ep; Panel B: widmo masowe frakcji neutralnych GSL wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M; Panel C: widmo masowe frakcji neutralnych GSL wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 P.

W celu potwierdzenia wyników otrzymanych za pomocą barwienia orcynolem, komórki linii 2102Ep transfekowane wektorami kodującymi ludzką lub gołębią syntazę Gb3/CD77 (enzym M lub P) wyznakowano metabolicznie ^{14}C -galaktozą (Ryc. 30). We wszystkich badanych próbkach głównym GSL był Gb3Cer, z dodatkowymi prążkami odpowiadającymi GalCer, LacCer, Gb4Cer i niezidentyfikowany glikosfingolipid pentasacharydowy. We wszystkich próbkach obserwowano podobny skład glikosfingolipidów. Ponadto we frakcjach glikosfingolipidów neutralnych pochodzących z komórek transfekowanych syntazą Gb3/CD77 M i P zidentyfikowano prążki szybko migrujące, które mogą odpowiadać galaktozylo-alkiloacylo- i galaktozylo-diacylglicerolom (Nagai, Takahashi i Niimura, 2016).



Ryc. 30. Analiza HPTLC glikosfingolipidów wyizolowanych z komórek linii 2102Ep i transfekowanych wektorami kodującymi enzym M lub P, które były metabolicznie znakowane ^{14}C -galaktozą. Oznaczenia: STDs GSL: standard mas dla frakcji glikosfingolipidów neutralnych (dwa prążki dla każdego GSL odpowiadające hydroksylowanej i niehydroksylowanej formie łańcucha acylowego w ceramidzie); STDs Ganglio: standardy dla glikosfingolipidów kwaśnych (gangliozydów); NAT: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z nietransfekowanych komórek linii 2102Ep; QE: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym ludzką syntazę Gb3/CD77 z podstawieniem p.Q211E; EpP: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym enzym P; EpM: frakcja GSL neutralnych wyizolowanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym enzym M; ORI – punkt startowy rozdziału GSL na płytce do HPTLC.

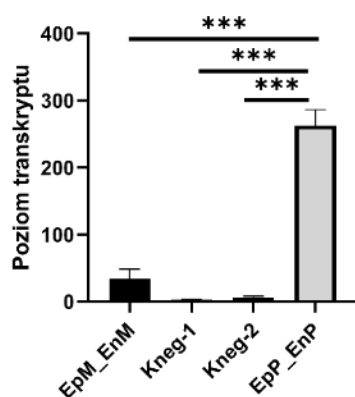
Analiza Western blotting wykazała, że przeciwciało anty-P1 (klon 650) wiąże się silniej do lizatów komórek transfekowanych wektorem kodującym syntazę Gb3/CD77 P, niż do lizatów komórek transfekowanych syntazą Gb3/CD77 M. Jest to wyraźnie widoczne w przypadku prążków odpowiadających białkom o masie cząsteczkowej 100 kDa i wyższej. Wiązanie przeciwciała anty-P1 (klon P3NIL100) do lizatów otrzymanych z obu rodzajów komórek było podobne i nieswoiste. Podjednostka 1B toksyny Shiga wiązała się w lizatach komórek transfekowanych wektorami kodującymi enzymy M lub P przede wszystkim do białka o masie cząsteczkowej 40 kDa (Ryc. 31A). Nie obserwowano swoistej reakcji z przeciwciałami lub podjednostką toksyny dla nietransfekowanych komórek.



Ryc. 31. Analiza metodą Western blottingu lizatów otrzymanych z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M lub P. Panel A: Wiązanie przeciwciała anty-P1 (klon 650) i podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B) do lizatów komórek 2102Ep oraz kontrola bez użycia przeciwciała pierwszorzędowego; Panel B: Wiązanie przeciwciała anty-P1 (klon P3NIL100) do lizatów komórek 2102Ep oraz kontrola negatywna bez użycia przeciwciała pierwszorzędowego. Oznaczenia: NAT: lizat z nietransfekowanych komórek linii 2102Ep; En M: lizat z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym syntazę Gb3/CD77 M; En P: lizat z komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorem kodującym syntazę Gb3/CD77 P; MW: standard masy (Page Ruler PreStained, 10-180 kDa); Kontrola (M): bez przeciwciała pierwszorzędowego dla anty-P1 (klon 650, mysie); kontrola (H): bez przeciwciała pierwszorzędowego dla anty-P1 (klon P3NIL100, ludzkie).

7.2.2.2. Analiza poziomu transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 w transfekowanych komórkach linii 2102Ep

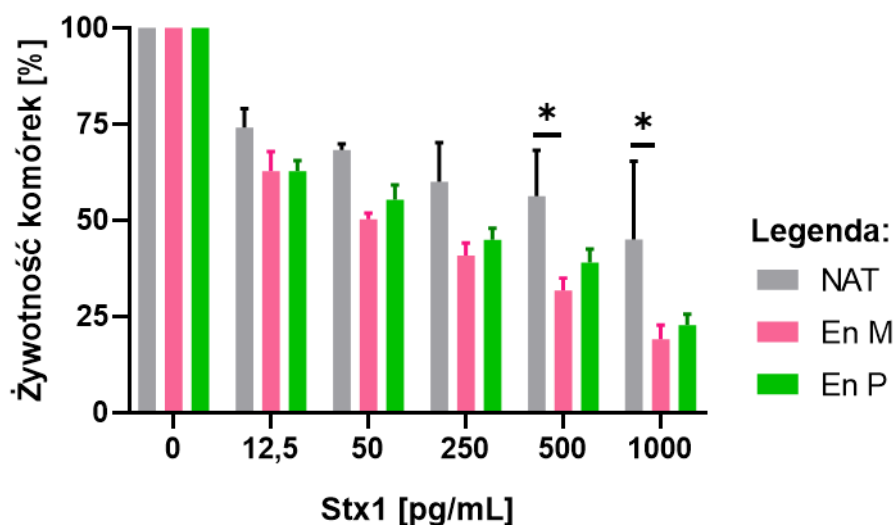
Aby wykluczyć obecność obu badanych genów w jednym klonie (co mogłoby prowadzić do błędnej interpretacji wyników uzyskanych dla swoistości enzymów), przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w komórkach linii 2102Ep. Względne poziomy transkryptów wynosiły $RQ_M = 25$ i $RQ_P = 270$ odpowiednio dla enzymów M i P (Ryc. 32). Nie obserwowano nieswoistego krzyżowego wiązania sond.



Ryc. 32. Ilościowa analiza transkryptów genów kodujących syntazę Gb3/CD77 M i P w komórkach linii 2102Ep. Oznaczenia: EpM: komórki linii 2102Ep transfekowane wektorem kodującym enzym M; EpP: komórki linii 2102Ep transfekowane wektorem kodującym enzym P; EnM: gen kodujący enzym M; EnP: gen kodujący enzym P; Kneg-1: kontrola krzyżowej reaktywności sond: komórki linii 2102Ep produkujące enzym M w reakcji z sondą rozpoznającą gen dla enzymu P; Kneg-2: kontrola krzyżowej reaktywności sond: komórki linii 2102Ep produkujące enzym P w reakcji z sondą rozpoznającą gen dla enzymu M. Dane były analizowane z użyciem testu jednokierunkowej ANOVY z poprawką Bonferroniego (test *post-hoc*); *** - poziom istotności (***) - $p < 0,0001$).

7.2.2.3. Wrażliwość komórek linii 2012Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazy Gb3/CD77 M i P na toksyny Shiga

Aby ocenić, jak nadprodukcja syntaz Gb3/CD77 M i P wpływa na wrażliwość komórek na holotoksynę Stx1, wykonano testy cytotoksyczności (Ryc. 33). Komórki transfekowane wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M i P wykazały odpowiednio około 2- i 1,5-krotnie wyższą wrażliwość na holotoksynę Stx1 w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi, ale wyniki uzyskane dla większości prób były nieistotne statystycznie. Jedynie dla dwóch najwyższych stężeń holotoksyny Stx1 (1000 i 500 pg/ml) obserwowano statystycznie istotne różnice między komórkami nietransfekowanymi i komórkami produkującymi enzym M.

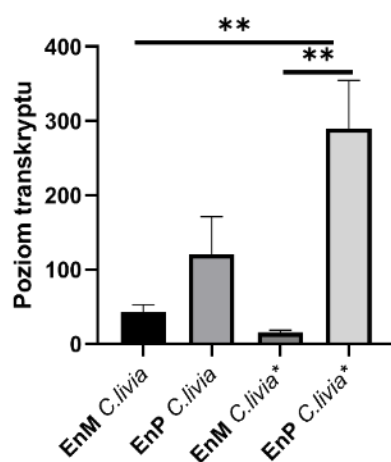


Ryc. 33. Żywotność komórek linii 2102Ep (wyrażona w %) po wystawieniu na działanie holotoksyny Shiga 1 (Stx1). Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe. Dane były analizowane z użyciem dwukierunkowego testu ANOVA z wykorzystaniem testu Holma-Sidaka (*post-hoc* test) do porównań wielokrotnych.

7.2.3. Poziomy transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w różnych tkankach i komórkach gołębi

7.2.3.1. Analiza poziomów transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej gołębi

Ilościowa analiza ekspresji genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P wykazała istotne różnice między dwiema rasami gołębi. Względny poziom ekspresji (RQ) syntazy Gb3/CD77 M w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej gołębia ozdobnego (*C. livia**) wyniósł $RQ_M = 300$, natomiast syntazy Gb3/CD77 P $RQ_P = 15$. U gołębia pocztowego (*C. livia*) poziomy ekspresji M i P wynosiły odpowiednio $RQ_M = 43$ i $RQ_P = 120$ (Ryc. 34). Zaobserwowano również różnice u przedstawicieli ras: stosunek poziomu transkryptu genu kodującego enzym M do poziomu transkryptu genu kodującego enzym P u gołębia pocztowego wyniósł około 1:3, podczas gdy u gołębia ozdobnego 1:20. W jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej kury nie stwierdzono obecności transkryptów genów M ani P.



Ryc. 34. Ilościowa analiza ekspresji genów kodujących enzym M i enzym P w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej gołębia pocztowego i ozdobnego. Oznaczenia: EnM: gen kodujący enzym M; EnP: gen kodujący enzym P; *C. livia*: gołąb pocztowy; *C. livia**: gołąb ozdobny. Dane były analizowane z użyciem testu jednokierunkowej ANOVY z poprawką Bonferroniego (test *post-hoc*); **/** - poziom istotności (** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,0001$).

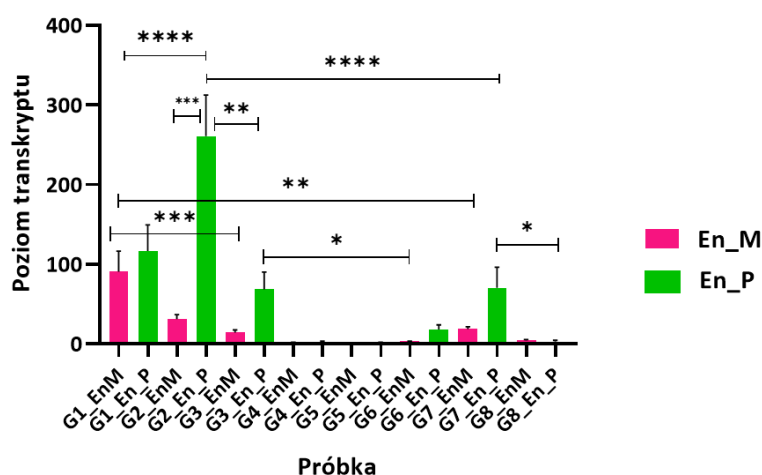
7.2.3.2. Poziomy transkryptów genów kodujących syntazy Gb3/CD77 M i P w różnych tkankach gołębi

Aby określić poziom transkryptów genów syntazy Gb3/CD77 w tkankach gołębia i kury, wykonano analizę ekspresji genów w tkankach: wątroby, śledziony, nerki, płuca, dwunastnicy, jelita krętego, aorty i mózgu (Tabela 17). W tkankach kury nie obserwowano wiązania sond dla enzymu M i P, a jedynie wiązanie sondy dla genu referencyjnego (kurzy *GAPDH*). Wyniki te posłużyły jako kalibrator dla określenia poziomu ekspresji genów kodujących Gb3/CD77 M i P u gołębia. Wysoki poziom transkryptu ($RQ > 250$) dla genu kodującego enzym P obserwowano dla próbki otrzymanej ze śledziony. W czterech analizowanych tkankach względny poziom transkryptu genu P był niższy od 100 (wątroba, nerka, jelito kręte i aorta). Brak transkryptu dla genów kodujących enzymy M i P stwierdzono dla próbek pochodzących z płuca (G4), dwunastnicy (G5), jelita krętego (G6) (tutaj tylko dla genu kodującego enzym M) oraz mózgu (G8). Ponadto obserwowano różnice w stosunku względnych poziomów transkryptów dla M i P pomiędzy tkankami. W próbce pochodzącej z wątroby stosunek RQ_M do RQ_P wyniósł 1:1,3, natomiast dla śledziony 1:11. W próbkach uzyskanych z gołębiej nerki i aorty stosunek RQ_M do RQ_P był

na zbliżonym poziomie i wyniósł 1:7. W próbce pochodzącej z gołębiego jelita krętego obserwowano niski poziom transkryptu jedynie dla genu kodującego enzym P, $RQ_p = 10$ (Ryc. 35)

Tabela 17. Tkanki gołębia (G) i kury (K) użyte w detekcji immunohistochemicznej oraz w qPCR

K1	G1	Wątroba	G5	K5	Dwunastnica
K2	G2	Śledziona	G6	K6	Jelito kręte
K3	G3	Nerka	G7	K7	Aorta
K4	G4	Płuco	G8	K8	Mózg



Ryc. 35. Ilościowa analiza ekspresji genów kodujących enzym M i enzym P w różnych tkankach u gołębia pocztowego. Oznaczenia: EnM: gen kodujący enzym M; EnP: gen kodujący enzym P; G1 – G8: oznaczenia tkanek, zestawienie podane w Tabeli 16. Dane były analizowane z użyciem testu jednokierunkowej ANOVY z poprawką Bonferroniego (test *post-hoc*); **/** - poziom istotności (** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,0001$; **** - $p < 0,00001$).

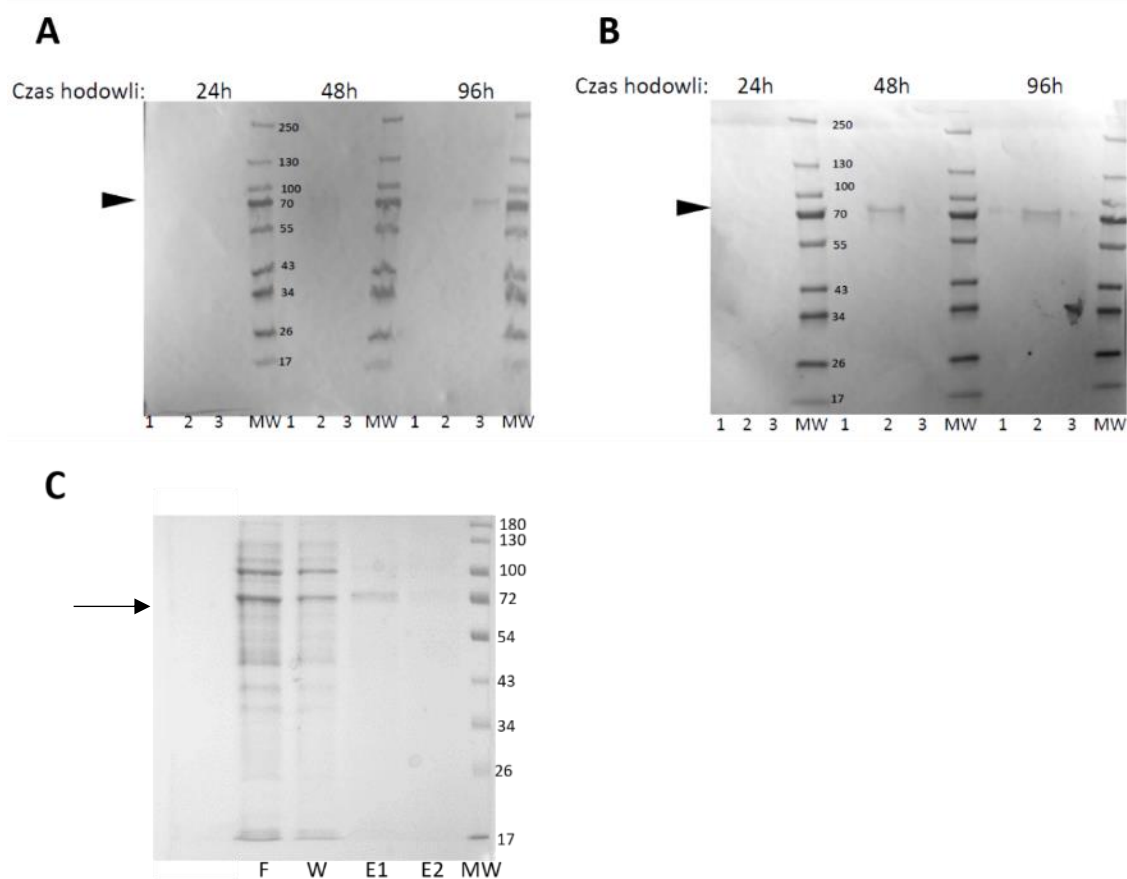
7.2.4. Otrzymanie rozpuszczalnych form syntaz Gb3/CD77 w komórkach Expi293F

W celu analizy aktywności syntaz Gb3/CD77 M i P, komórki linii Expi293F transfekowano wektorami EBA-181bio kodującymi syntazy Gb3/CD77 M i P pozbawione fragmentów przezbłonowych (opis w podrozdziale 6.3.5). Upřednio, transfekcja komórek Expi293F wektorami kodującymi ludzką syntazę Gb3/CD77 oraz jej muteinę p.Q211E pozwoliła na uzyskanie rozpuszczalnych fragmentów tych enzymów (Mikołajczyk i wsp, nieopublikowane). Niestety, w przypadku gołębiech enzymów, stężenia otrzymanych

białek były bardzo niskie, prawdopodobnie z uwagi na ich niestabilność lub degradację. W celu zwiększenia wydajności produkcji oraz stabilności i rozpuszczalności docelowych białek, zaprojektowano nowy konstrukt (EBA-181bio, Ryc. S2), w którym na 5'-końcu sekwencji nukleotydowej kodującej rozpuszczalną formę enzymu M i P dodano sekwencję kodującą fragment Fc ludzkiego przeciwciała IgG1. Ponadto optymalizacji poddano każdy z elementów, w tym przede wszystkim stosunek ilości czynnika transfekcyjnego (EXPIfectamine™) do ilości plazmidowego DNA, temperaturę i czas hodowli oraz jej gęstość w dniu transfekcji. Najlepsze wyniki uzyskano dla hodowli 4-dniowej prowadzonej w 32 °C, 8% CO₂, przy stosunku EXPIfectamine™: DNA (3:1) i gęstości początkowej hodowli 2,5 x 10⁶ komórek/ml hodowli. Jednak w trakcie oczyszczania ilość białka gwałtownie spadała, w szczególności w przypadku enzymu M, który był niewykrywalny po zakończeniu oczyszczania.

Analizy bioinformatyczne (Ryc. S6) wskazywały na obecność reszt lizyn podlegających ubikwitynacji, dlatego wykonano ponowną optymalizację hodowli z użyciem MG-132, który jest inhibitorem proteasomu. Próbkę nadsącza analizowano za pomocą metody Western blotting (Ryc. 36). Wykazano, że w hodowlach z dodatkiem MG-132 ilość białka była wyższa. Ponadto czas dodania inhibitora wpływał na wydajność ekspresji: dla syntazy Gb3/CD77 P najlepszy wynik uzyskano, gdy MG-132 dodawano 24 h po transfekcji (Ryc. 36B). W przypadku enzymu M, najlepszy rezultat uzyskano dla dodatku MG-132 po 72 h (Ryc. 36A, ścieżka „2”). Dane te wskazują, że ekspresja rekombinowanych gołębiczym enzymów w systemie ekspresyjny Expi293F wymaga dodatku inhibitora proteasomu (Stockklausner *i in.*, 2015; Otani *i in.*, 2020; Appanna *i in.*, 2021).

Uzyskane w komórkach Expi293F rozpuszczalne enzymy M i P oczyszczano na złożu z immobilizowanym białkiem A (opis w podrozdziale 6.5.6), które wykazuje duże powinowactwo do białka fuzyjnego (Fc hIgG1). Średnia wydajność produkcji białka wynosiła od 100 µg/ml (dla enzymu M) do 400 µg/ml (dla enzymu P). Czystość otrzymanych białek oceniono na ok. 85 - 90% (Ryc. 37C).

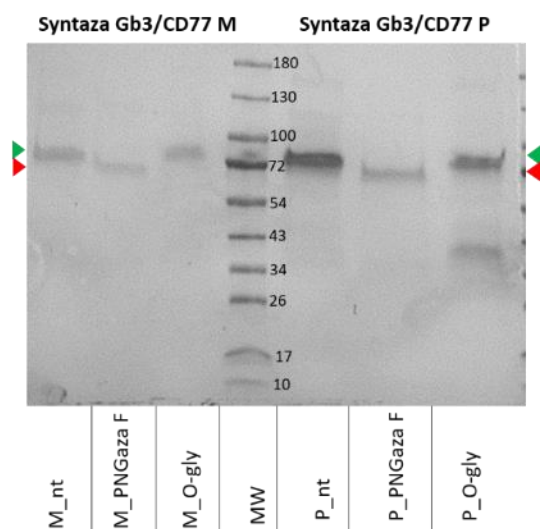


Ryc. 36. Analiza Western blotting nadsąca z hodowli komórek linii EXP1293F transfekowanych wektorami kodującymi rozpuszczalne formy syntazy Gb3/CD77 M (Panel A) lub Gb3/CD77 P (Panel B) wraz z Fc hlgG1 oraz analiza SDS-PAGE frakcji zebranych z różnych etapów oczyszczania syntazy Gb3/CD77 P na złożu Protein A Sepharose. Oznaczenia: 1: hodowla EXP1293F bez MG-132; 2: hodowla EXP1293F z MG-132 dodanym po 24 h; 3: hodowla EXP1293F z MG-132 dodanym po 72 h; F: frakcja niezwiązana do złoża (flow through); W: frakcja białek nieswoicie związanych do złoża (wash); E1, E2: frakcje elucyjne. Strzałką zaznaczono prążek pochodzący od enzymu.

7.2.4.1. Analiza N-glikanów w rozpuszczalnych domenach syntaz Gb3/CD77

Analiza bioinformatyczna miejsc glikozylacji rozpuszczalnych form enzymów wskazywała na obecność 3 miejsc N-glikozylacji w obu analizowanych białkach (z czego jeden sekwon we fragmencie Fc) i brak O-glikozylacji (Ryc. S5). W celu zbadania obecności glikanów na powierzchni ptasich białek próbki enzymów poddano trawieniu PNGazą F i O-glikanazą. Wykazano, że poddanie syntazy Gb3/CDD77 M działaniu PNGazy F spowodowało obniżenie masy cząsteczkowej o ok. 9,4 kDa (Ryc. 37), co odpowiada w przybliżeniu czterem N-glikanom o strukturze kompleksowej/hybrydowej. Poddanie syntazy Gb3/CD77 P działaniu PNGazy F spowodowało obniżenie masy cząsteczkowej o ok. 10,3 kDa, co odpowiada również czterem N-glikanom (za średnią masę jednego

N-glikanu przyjęto 2,5 kDa (Li *i in.*, 2021)). Ponieważ jedno miejsce N-glikozylacji wchodzi w skład białka fuzyjnego, różnice w masie zidentyfikowanych miejsc glikozylacji dla enzymów M i P mogą być związane z rodzajem i złożonością przyłączonych do nich N-glikanów. W preparatach poddanych działaniu O-glikanazy nie zaobserwowano różnic w masie w porównaniu do enzymów nietrawionych.



Ryc. 37. Analiza Western blotting syntaz Gb3/CD77 M i P wyprodukowanych w komórkach Expi293 i poddanych działaniu PNGazy F i O-glikanazy. Oznaczenia: M_nt: syntaza Gb3/CD77 M, nietrawiony preparat; M_PNGaza F: syntaza Gb3/CD77 M po trawieniu PNGazą F; M_Ogly: syntaza Gb3/CD77 M po trawieniu O-glikanazą; P_nt: syntaza Gb3/CD77 P, nietrawiony preparat; P_PNGaza F: syntaza Gb3/CD77 P po trawieniu PNGazą F; P_Ogly: syntaza Gb3/CD77 P po trawieniu O-glikanazą; MW: standard masy (Page Ruler PreStained, 10-180 kDa). Zielonymi strzałkami zaznaczono preparaty nietrawione, na czerwono – trawione.

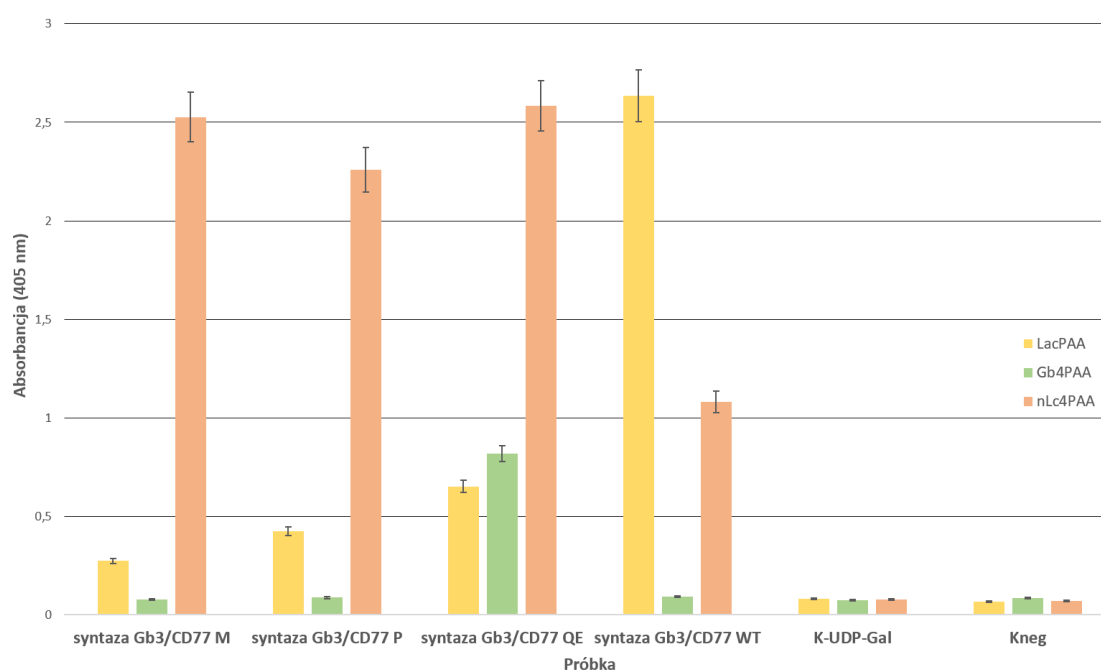
7.2.4.2. Analiza swoistości syntaz Gb3/CD77 M i P

W celu określenia aktywności enzymatycznej syntaz Gb3/CD77 M i P, wykonano test ELISA z użyciem koniugatów oligosacharydów z poliakrylamidem jako substratów reakcji enzymatycznej. Do detekcji użyto przeciwciał anty-P1 oraz anty-NOR (Tabela 5). Jako kontroli pozytywnej użyto rozpuszczalnych form ludzkiej syntazy Gb3/CD77 otrzymanych również w komórkach linii EXPI293F: WT (dla powszechnie występującego enzymu) oraz QE (dla wariantu z podstawieniem p.Q211E).

Aktywność ludzkiej syntazy Gb3/CD77 WT była najwyższa wobec LacPAA i ok. 3 razy niższa wobec nLcPAA, podczas gdy muteina tego enzymu była aktywna przede wszystkim wobec nLcPAA, i ok. 3-krotnie mniej aktywna wobec LacPAA. Muteina jako

WYNIKI

jedyna wykazała aktywność wobec Gb4PAA, czyli była jedynym wśród testowanych enzymów, który był zdolny do syntezy antygeny NOR. Największą aktywność wobec LacPAA wykazywała ludzka syntaza Gb3/CD77 WT, dużo niższą ludzki wariant QE oraz enzym P, a najniższą enzym M. Enzymy M i P wykazały wysoką aktywność wobec nLc4PAA (prekursor P1), a aktywność wobec LacPAA (prekursor Gb3) była 5 lub 10 razy mniejsza (odpowiednio dla enzymu P i M) od ludzkiego enzymu WT. Enzymy M i P nie wykazały aktywności wobec Gb4PAA, który jest prekursorem antygeny NOR (Ryc. 38).



Ryc. 38. Aktywność enzymatyczna oczyszczonych ludzkich i gołębic syntaz Gb3/CD77 wobec syntetycznych prekursorów oznaczona za pomocą testu ELISA. Oznaczenia: K-UDP-Gal: kontrola negatywna, bez dodatku nośnika cukru UDP-Gal; Kneg: kontrola bez mieszaniny reakcyjnej. Wartości prezentowane dla enzymów stanowią wartości po odjęciu wszystkich zastosowanych kontroli negatywnych.

8. DYSKUSJA

8.1. Antygeny układu grupowego krwi P1PK u ptaków

Unikalność ludzkiej syntazy Gb3/CD77 polega na jej zdolności do syntezy produktów o kilku różnych strukturach: w wyniku dodania reszt galaktozy do terminalnych galaktoz w dwóch różnych akceptorach glikosfingolipidowych powstają glikosfingolipidy Gb3 (antygen P^k) i P1, a enzym z podstawieniem p.Q211E przenosi resztę galaktozy również na terminalną *N*-acetylogalaktozaminę, tworząc antygeny NOR1 i NOR2. Glikosfingolipidy P^k, P1 i NOR należą do ludzkiego układu grupowego krwi P1PK (ISBT 003). Ponadto, jak wykazano ostatnio (Szymczak-Kulus *i in.*, 2021), syntaza Gb3/CD77 może przyłączać terminalną galaktozę także do *N*-glikanów, tworząc glikotopy P1 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc). W związku z tym ten sam enzym może syntezować cztery różne glikosfingolipidy (Gb3, P1, NOR1 i NOR2) oraz α -galaktozylowany *N*-glikan, co można opisać zasadą „jeden enzym, pięć antygenów, cztery fenotypy” (Suchanowska *i in.*, 2012; Kaczmarek *i in.*, 2014, 2018).

O ile ludzka syntaza Gb3/CD77 była przedmiotem licznych badań (w tym prowadzonych w naszym Laboratorium), to jedynym przebadanym homologiem tego enzymu z gatunku innego niż człowiek jest syntaza Gb3/CD77 gołębia (*C. livia*). Wykazano, że enzym ten, w przeciwieństwie do ludzkiej syntazy Gb3/CD77, przenosi galaktozę przede wszystkim na akceptory glikoproteinowe, a jego aktywność wobec GSL jest niewielka (Suzuki, Nawa i Yamamoto, 2011; Morimoto *i in.*, 2020). Obecność struktur Gal α 1 \rightarrow 4Gal stwierdzono jedynie u ptaków współczesnych (*Neoaves*), podczas gdy ptaki należące do bezgrzebieniowców (*Galloansers* i *Paleognathae*) ich nie mają (Suzuki, Laskowski, i Lee, 2004; Suzuki, Laskowski i Lee, 2006). Wszystkie publikacje dotyczące ekspresji Gal α 1 \rightarrow 4Gal u różnych gatunków ptaków zostały przygotowane w oparciu o badania nad glikoproteinami białka jaja, wątroby oraz limfocytów (Suzuki *i in.*, 2003). Nie badano natomiast obecności tych struktur na powierzchni ptasich erytrocytów, które są stosunkowo łatwo dostępne. Dlatego w niniejszej pracy erytrocyty 40 osobników należących do 12 gatunków ptaków zostały przebadane za pomocą cytofluorometrii przepływowej, Western blottingu, HPTLC i spektrometrii masowej. W cytofluorometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał anty-P1, najwyższe wiązanie przeciwciał do erytrocytów zaobserwowano u gatunków żyjących na obszarach

zurbanizowanych (gołębie, wrony) lub hodowanych jako zwierzęta domowe (papugi) (Ryc. 13A). Najniższe wiązanie miało miejsce u przedstawiciela ptaków drapieżnych (sokoła) oraz siewkowych (słonka). Wykryto znaczące różnice międzygatunkowe i międzyosobnicze w wiązaniu przeciwciał, przy czym różnice te były największe u przedstawicieli gołębiowych i papugowych. Erytrocyty sokoła wykazały najwyższe wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga, podczas gdy wiązanie tej toksyny do erytrocytów innych gatunków było niskie (Ryc. 13C). Nie obserwowano wiązania przeciwciała anty-P1 ani podjednostki toksyny Shiga 1B do erytrocytów przedstawicieli bezgrzebieniowców (drób hodowlany, bażant).

Analiza frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z erytrocytów przedstawicieli ptaków współczesnych (gołąb pocztowy i ozdobny) i bezgrzebieniowców (kura, gęś) wykazała, że jedynie u gołębia ozdobnego obecne są glikosfingolipidy z terminalną strukturą Gal α 1 \rightarrow 4Gal: były to Gb3Cer i P1. Podjednostka 1B toksyny Shiga wiązała się do Gb3 we frakcji neutralnych GSL z erytrocytów gołębia.

Potwierdziły to widma masowe, które wykazały, że glikosfingolipidy neutralne wyizolowane z erytrocytów kury i gołębia zawierają kilka izoform glukozyloceramidu. W GSL z erytrocytów gołębia wykryto laktozyloceramid, a także glikosfingolipidy o dłuższych łańcuchach cukrowych, w tym rozpoznawane przez przeciwciało anty-P1, których struktur nie udało się ustalić.

Oligosacharydy z terminalną strukturą Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc zostały uprzednio wykryte na białkach jaj, ale białka błon erytrocytów nie były dotąd badane. W niniejszej pracy wykazano, że glikotopy takie są obecne w białkach błon erytrocytów gołębia, ale nie znaleziono ich u kury. Obecność terminalnych struktur Gal α 1 \rightarrow 4Gal na glikoproteinach erytrocytów gatunków należących do ptaków współczesnych (ale nie do bezgrzebieniowców) potwierdza wcześniejsze doniesienia o utracie zdolności do syntezy reszt Gal α 1 \rightarrow 4Gal przez przodka bezgrzebieniowców w momencie dywergencji od parwklasy ptaków współczesnych (Suzuki, Laskowski, i Lee, 2004).

Przedstawione wyżej wyniki wskazywały na możliwość istnienia alloprzeciwciał rozpoznających antygeny grupowe P1PK, podobnie, jak ma to miejsce u człowieka. Alloprzeciwciała anty-P1P^k, które rozpoznają antygeny P1 i P^k, występują przede wszystkim u osób o fenotypie p (Daniels 2013). Mogą występować również u osób o fenotypie P₂ (genotyp P₂P₂); zwłaszcza u hodowców gołębi, co wiąże się

prawdopodobnie z immunizacją przez białka gołębia zawierające glikotopy P1 (Effler, Roland i Redding, 1976; Radermecker *i in.*, 1980). Przeciwciała anty-P1P^k mogą powodować samoistne poronienia, zwłaszcza u matek z fenotypem p, ponieważ duża ilość tych antygenów występuje w łożysku (Kaczmarek *i in.*, 2014).

Do tej pory zagadnienie zróżnicowania antygenów układów grupowych krwi było badane u kur (Dietert *i in.*, 1992; Taylor, Medarova i Briles, 2016), ale nigdy u przedstawicieli gatunków należących do parvklasy ptaków współczesnych. Gdyby takie alloprzeciwciała istniały, najprostszą metodą ich wykrycia byłaby aglutynacja ludzkich erytrocytów o fenotypie P₁ (ale nie P₂). Wykazano, że ilość antygenów P1PK na powierzchni ludzkich erytrocytów może wynosić od 5000 do 25 000 jednostek wiążących przeciwciała w przypadku genotypu P¹P¹ oraz 100 do 15 000 wiążących przeciwciała w przypadku genotypu P¹P²; na erytrocytach osób o genotypie P²P² nie wykryto antygenów P1 (Kaczmarek *i in.*, 2018). Aglutynację ludzkich erytrocytów przez surowice ptaków obserwowano jednak niezależnie od fenotypu P₁ i P₂, i tylko w przypadku surowic ptaków należących do *Neoaves*, które żyją blisko człowieka (gołąb pocztowy, badane gatunki Ary). Aglutynacja ta nie była hamowana przez owomukoid gołębia, który jest bogaty w glikotopy P1, co sugeruje, że ptasie przeciwciała nie rozpoznają antygenów grupowych P1PK. Hamowanie aglutynacji stwierdzono jedynie w przypadku preparatów ludzkiej glikoforyny A, które zawierają ludzkie antygeny grupowe A/B/H (Podbielska *i in.*, 2004; Fredriksson *i in.*, 2010). W teście ELISA wykazano wiązanie przeciwciał z ptasich surowic do glikoforyn otrzymanych od osób o grupach A i O (glikoforyna A od osoby B nie była dostępna). Ze względu na to, że aglutynację stwierdzono również w przypadku erytrocytów traktowanych papainą, która usuwa cały N-końcowy fragment glikoforyny A, można wnioskować, że przeciwciała z surowic ptaków nie rozpoznają białkowego fragmentu glikoforyny A, ale jej fragmenty (prawdopodobnie oligosacharydy) obecne na N- i O-glikanach. Te same cukrowe antygeny są obecne na glikolipidach powierzchniowych ludzkich erytrocytów, a ich dostępność dla przeciwciała zwiększa się po traktowaniu papainą. Można więc wyciągnąć wniosek, że przeciwciała obecne w ptasich surowicach (w tym u przedstawiciela bezgrzebieniowców) rozpoznają ludzkie antygeny A/B/H, ale nie glikotopy P1 i antygeny P1 i P^k. Można tu zadać pytanie: dlaczego najwyższe miana aglutynacji obserwowano u ptaków żyjących blisko człowieka? Wydaje się, że najbardziej prawdopodobną przyczyną jest uwspólnianie mikrobioty między

człowiekiem i ptakami; wiadomo, że bakterie mikrobioty odgrywają ważną rolę w immunizacji wobec antygenów A/B/H (Mäkivuokko *i in.*, 2012; Cabezas-Cruz *i in.*, 2017; Wu *i in.*, 2018). Ponieważ u ptaków nie zidentyfikowano genów homologicznych do ludzkiej transferazy ABO oraz ludzkich antygenów grupowych A/B/H, immunizacja bakteriami ludzkiej mikrobioty jest prawdopodobna.

Badania nad aktywnością enzymatyczną gołębiej syntazy Gb3/CD77 i rodzajem rozpoznawanych przez nią akceptorów były dotąd niemożliwe ze względu na brak linii komórkowej pochodzącej z gołębia lub innego gatunku należącego do *Neoves*, w której miałyby miejsce wysoka ekspresja tego enzymu. W związku z tym podjęto próbę otrzymania linii komórek śródbłonkowych pochodzących z aorty gołębia (jako przedstawiciela ptaków współczesnych) oraz kury (jako przedstawiciela bezgrzebieniowców). Wykazano, że oba rodzaje komórek tworzą pseudonaczynia, co potwierdza ich śródbłonkowe pochodzenie. Uzyskanie takich komórek było niezbędnym krokiem do badań nad rolą ptasiego śródbłonka w zakażeniach STEC, ale procedura unieśmiertelniania zakończyła się niepowodzeniem (maksymalny czas przeżycia komórek w hodowli wynosił 6 tygodni). Tym niemniej, analiza cytofluorometryczna wykazała, że jedynie komórki gołębia są swoiście rozpoznawane przez przeciwciała anti-P1. Wiązanie podjednostki toksyny Stx1B było niewiele wyższe od kontroli negatywnej, co może oznaczać, że glikotop Gal α 1 \rightarrow 4 jest niedostępny dla toksyn, mimo że występuje on na powierzchni tych komórek. Zgodnie z przewidywaniami, u kury nie stwierdzono swoistego wiązania przeciwciał anti-P1, a obserwowane wiązanie Stx1B było niewiele wyższe od kontroli negatywnej.

We frakcji neutralnych GSL z komórek kury zidentyfikowano za pomocą spektrometrii masowej jony dla GlcCer, nLc4Cer oraz dla iGb3Cer. W komórkach gołębia zidentyfikowano GlcCer, Gb3Cer, nLc4Cer oraz jony odpowiadające antygenom P1 i Forssman.

W lizatach komórek gołębia badanych za pomocą Western blottingu przeciwciała anti-P1 (klon 650 i P3NIL100) wiązały się do białek o masie powyżej 43 kDa, natomiast podjednostki Stx1B do białek o masie 54 i 100 kDa. Nie stwierdzono swoistego wiązania do komórek kury.

W barwieniu immunohistochemicznym tkanek gołębia i kury swoiste wiązanie przeciwciał anti-P1 i podjednostki 1B toksyny Shiga obserwowano tylko w tkankach

gołębich, przy czym poziom wiązania przeciwciał i Stx1B był porównywalny w trzech badanych tkankach. W przypadku tkanek kury obserwowano nieswoiste wiązanie.

8.2. Charakterystyka aktywności i swoistości syntaz Gb3/CD77 u gołębi

W wyniku klonowania syntazy Gb3/CD77 gołębia otrzymano dwa klony o wysokim podobieństwie sekwencji nukleotydowej, które nazwano M i P (opis w rozdziale 6.3). Gen P był uprzednio badany (Suzuki i Yamamoto, 2010), ale gen M nie był wcześniej opisany. Wykazano, że geny te nie są allelicznymi odmianami tego samego genu.

Aby określić aktywność i swoistość substratową każdej z gołębich syntaz Gb3/CD77, wykonano przejściową transfekcję ludzkiej linii komórkowej 2102Ep wektorami kodującymi enzym M lub P. Ze względu na obecność mutacji punktowej c.631C>G w sekwencji enzymu M, która u ludzi skutkuje rozszerzeniem swoistości akceptorowej syntazy Gb3/CD77 i produkcją antygenu NOR, zdecydowano się na wybór linii komórkowej z dużą ekspresją glikosfingolipidu Gb4, który jest prekursorem antygenu NOR. Analiza cytofluorometryczna wykazała, że komórki transfekowane wektorem kodującym enzym P silnie wiążą przeciwciała anty-P1 (w szczególności klon 650). W przypadku komórek transfekowanych wektorem kodującym enzym M wiązanie przeciwciał było słabsze, zwłaszcza w przypadku anty-P1 (klon P3NIL100). Wiązanie podjednostki Stx1B do komórek transfekowanych wektorami kodującymi enzymy M i P było na podobnym poziomie. Nie wykryto wiązania przeciwciała anty-NOR do komórek transfekowanych wektorem kodującym enzymy M i P, co sugeruje, że enzymy te nie mogą przyłączać reszty galaktozy do terminalnej *N*-acetylogalaktozaminy, pomimo obecności w enzymie M mutacji p.Q211E w pozycji homologicznej do pozycji 211 w ludzkiej syntazie Gb3/CD77. Otrzymany w komórkach Expi293 rozpuszczalny fragment enzymu M również nie syntezował antygenu NOR. Brak syntezy antygenu NOR przez enzym M jest prawdopodobnie spowodowany innymi różnicami w sekwencji aminokwasowej w porównaniu z ludzkim enzymem.

Analiza frakcji glikosfingolipidów neutralnych z nietransfekowanych komórek 2102Ep i komórek transfekowanych wektorami kodującymi enzym M lub P za pomocą HPTLC i spektrometrii masowej wykazała, że nietransfekowane komórki oraz komórki transfekowane wektorem kodującym syntazę Gb3/CD77 P miały identyczny skład GSL;

zidentyfikowano jony dla LacCer, Gb3Cer lub Gb4Cer. Widma uzyskane dla frakcji neutralnych GSL z komórek produkujących enzym M zawierały dodatkowe jony odpowiadające ludzkiemu antygenowi P1 z niespotykanymi u ssaków resztami acylowymi (kwasy tłuszczowe wielonienasycone). Dane te potwierdzają przypuszczenie, że enzym M (ale nie enzym P) może syntezować GSL. Wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga do komórek transfekowanych plazmidami kodującymi enzymy M jak i P było jednak na podobnym poziomie. Dane te wskazują, że oba enzymy (M i P) mogą syntezować glikoproteiny o terminalnej strukturze Gal α 1 \rightarrow 4Gal, ale nie wszystkie takie struktury wiążą podjednostkę toksyny Stx.

Podsumowując, komórki linii 2102Ep transfekowane wektorami kodującymi enzymy M i P wytwarzają glikotopy Gal α 1 \rightarrow 4Gal na glikoproteinach, przy czym komórki produkujące enzym P produkują ich więcej niż komórki produkujące enzym M. W przeciwieństwie do enzymu P, syntaza Gb3/CD77 M może przenosić reszty galaktozy na dwa rodzaje akceptorów: glikoproteiny i glikosfingolipidy, chociaż jej aktywność jest niższa w porównaniu z enzymem P (Tabela 18, Tabela 19).

Aby określić względny poziom transkryptów dla enzymów M i P, przeprowadzono badanie qPCR na RNA z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej gołębi różnych ras. W zależności od rasy gołębia, stosunek poziomów transkryptu P do M wynosił odpowiednio od 3:1 (gołębie pocztowe) do 20:1 (gołębie ozdobne). Tak niski względny poziom transkryptu dla genu kodującego enzym M u gołębia ozdobnego, w którego erytrocytach znaleziono glikosfingolipidy z terminalną strukturą Gal α 1 \rightarrow 4Gal (Gb3Cer i P1) jest trudny do wyjaśnienia, skoro w eksperymentach z komórkami 2102Ep wykazano, że enzym M syntezuje glikosfingolipidy. Istnieje możliwość, że w syntezie glikosfingolipidów z terminalną resztą Gal α 1 \rightarrow 4Gal bierze udział inny paralog, którego aktywności enzymatycznej i swoistości nie znamy. Analiza bioinformatyczna wykazała, że większość ptaków z kladu ptaków współczesnych ma 5-7 genów kodujących paralogi syntazy Gb3/CD77 (Shapiro et al. 2013; Suzuki 2019).

U kury potwierdzono brak transkryptu dla obydwu genów we wszystkich badanych tkankach (histogramy dla analizowanych próbek były na poziomie kontroli negatywnej, bez dodatku matrycy).

Gołębia syntaza Gb3/CD77 P została już wcześniej scharakteryzowana przez Suzuki i wspópr. (Suzuki and Yamamoto 2010). Eksperymenty przeprowadzone na linii EXPI293T

produkującej gołębi enzym z wykorzystaniem metod cytofluorometrii przepływowej, qPCR oraz Western blottingu wykazały, że badany enzym jest swoisty jedynie wobec glikoprotein, a analiza cytofluorometryczna nie wykazała obecności Gb3 na powierzchni komórek EXPI293T transfekowanych gołębią syntazą Gb3/CD77 (Suzuki and Yamamoto 2010). W 2020 roku ten sam zespół (Morimoto *i in.*, 2020) bardziej dokładnie scharakteryzował ten enzym, stosując znakowanie metaboliczne komórek HeLa ¹⁴C-galaktozą oraz testy cytotoksyczności. Autorzy wysunęli wtedy wniosek, że enzym jest w stanie przenosić reszty Gal również na akceptory glikosfingolipidowe (Morimoto *i in.*, 2020).

Metaboliczne znakowanie ¹⁴C-galaktozą opisane w niniejszej pracy nie wykazało jednak żadnych dodatkowych GSL w komórkach transfekowanych wektorami kodującymi enzym M i P. Ponadto, GSL pochodzące z komórek transfekowanych wektorami kodującymi enzymy M i P zawierały szybko migrujące prążki, które prawdopodobnie reprezentowały galaktozylo-alkiloacylo i galaktozylo-diacyloglicerol. Upřednio wykazano, że ceramid i diglicerydy zawierające hydroksy- i niehydroksy kwasy tłuszczowe mogą być galaktozylowane przez galaktozylotransferazy w zależności od ich lokalnej dostępności (Nagai, Takahashi i Niimura, 2016)

Morimoto i współpr. nie wykonali testów immunochemicznych z użyciem przeciwciał anty-P1, a wnioski na temat struktury GSL z komórek transfekowanych gołębi enzymem wyciągnęli na podstawie ruchliwości prążków w HPTLC. Porównanie z komórkami nieprodukującymi tego enzymu mogłoby wykazać, że prążek obserwowany po znakowaniu metabolicznym ¹⁴C-Gal jest produktem tego konkretnego enzymu, i mogłoby stanowić dowód na dwojaką naturę swoistości akceptorowej syntazy Gb3/CD77 P. Badania opisane w niniejszej pracy nie wykazały jednoznacznych dowodów na to, że enzym P może syntezować glikosfingolipidy (Tabela 18). W szczególności, wyniki analizy HPTLC i MALDI-TOF sugerują, że komórki produkujące syntazę Gb3/CD77 P nie wytwarzają żadnych dodatkowych GSL w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi. W związku z tym istnieje możliwość, że paralog P syntazy Gb3/CD77 z gołębia jest enzymem swoistym jedynie wobec glikoprotein, jednak potwierdzenie tej tezy będzie można uzyskać za pomocą transfekcji komórek linii, które nie produkują neutralnych GSL (np. CHO) z użyciem wektora kodującego ten enzym. Warto zaznaczyć, że analiza HPTLC z wykorzystaniem ¹⁴C-galaktozy opisana przez Morimoto i współpr. (Morimoto *i in.*, 2020)

została wykonana bez podziału na frakcje neutralnych i kwaśnych glikosfingolipidów (gangliozydów): autorzy wykonali analizę HPTLC po ekstrakcji i saponifikacji. Struktura glikosfingolipidu, któremu odpowiadał wyznaczony przez zespół prążek mający świadczyć o zdolności gołębiej syntazy Gb3/CD77 P do przenoszenia reszt galaktozy na GSL nie została określona. Nie przedstawiono też żadnych dodatkowych analiz mogących pomóc we wstępnej identyfikacji wskazanego glikosfingolipidu. Do tej pory ukazało się kilka doniesień, które skłaniają do ostrożnej interpretacji wyników znakowania metabolicznego (Sandhoff

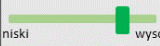





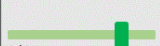
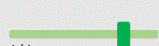
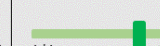






i Kolter, 2003; Schwarzmann, Arenz i Sandhoff, 2014; Wandall i in., 2021). Znakowanie metaboliczne jest jedną z najczulszych metod identyfikacji; Crespo i współpracownicy (Maria Crespo, Ramón Zurita i Luis Daniotti, 2002) wykazali, że znakowanie metaboliczne [³H]-Gal komórek CHO-K1 traktowanych inhibitorem syntezy glikosfingolipidów nadal pozwala na wykrycie resztkowych ilości GM3 czy GA2, których nie obserwuje się w innych, powszechnie stosowanych metodach analiz GSL.

Grupa Morimoto i współpracownicy w 2020 r. opisała jeszcze jeden gen *A4GALT* z gołębia, który nazwała *A4GALT1*. Zdaniem autorów, jest on swoisty jedynie wobec glikosfingolipidów. Autorzy nie przedstawili jednak żadnych danych eksperymentalnych potwierdzających tę tezę. Na podstawie informacji zawartej w pracy z 2019 (Suzuki, 2019) ok. 70% homologii sekwencji nukleotydowej *A4GALT1* do *A4GALT2* należy raczej wykluczyć, że *A4GALT1* opisany przez Morimoto i współpracownicy. gen kodujący enzym M opisany w niniejszej pracy to te same geny. Na podstawie wstępnie przeprowadzonej analizy bioinformatycznej można przypuszczać, że chodzi o gen oznaczony w Tabeli 3 (wstęp rozdział) jako *A4GALT7*.

Tabela 18. Porównanie analizy swoistości gołębiej syntazy Gb3/CD77 opisanych w piśmiennictwie i analizowanych w niniejszej pracy

GenBank nr	Gołębia syntaza Gb3/CD77			
	Bereźnicka i in. (2102Ep)		Morimoto i in. (HeLa)	
	Nazwa	Swoistość	Nazwa	Swoistość
MN545843.1	Syntaza Gb3/CD77 M	GP + GSL	-	
NM_001315524.1	Syntaza Gb3/CD77 P	GP	A4GALT2	GP >>> GSL
	-		A4GALT1	GSL

Tabela 19. Porównanie dystrybucji antygenów P1/P^k i aktywności enzymatycznej gołębich syntaz Gb3/CD77 M i P opisanych w niniejszej pracy

Proporcje antygenów ludzkiego układu grupowego krwi P1PK u gołębi						
Osobnik	qPCR (RQ _p :RQ _M)	Tkanki/komórki/lizat białkowy			GSL	
		a-P1 (klon 650)	a-P1 (klon P3NIL100)	Stx1B	TLC	MALDI-TOF
Gołąb pocztowy (PBMC/RBC)	3:1				brak	brak
Gołąb pocztowy wątroba	1.5:1				-	-
Gołąb pocztowy płuco	1.5:1				-	-
Gołąb pocztowy dwunastnica	1.7:1				-	-
Gołąb ozdobny (mewka) (PBMC/RBC)	20:1				Gb3, P1	Gb3, P1

Niedawno Mikołajczyk i współpr. wykazali, że glikozylacja ma duży wpływ na aktywność ludzkiej syntazy Gb3/CD77 (Mikołajczyk *i in.*, 2021). Enzym ten ma miejsca glikozylacji (N₁₂₁ i N₂₀₃). Obecność N-glikanu w pozycji N₁₂₁ nie ma wpływu na aktywność, ale utrata N-glikanu w pozycji N₂₀₃ wiązała się ze zmniejszeniem lub całkowitą utratą aktywność przez enzym. Aby sprawdzić czy, ptasie homologu są glikozylowane podobnie jak ludzki enzym, preparaty enzymów M i P otrzymane w komórkach EXPI293 poddano trawieniu PNGazą F oraz O-glikanazą. Trawienie PNGazą F spowodowało obniżenie masy cząsteczkowej o około 10 kDa. Taki wynik świadczy o tym, że podobnie jak ludzki homolog ptasie enzymy również są N-glikozylowane co najmniej w dwóch miejscach. Dokładne określenie struktur tych N-glikanów będzie możliwe za pomocą spektrometrii mas po oczyszczeniu obu enzymów. Nie stwierdzono różnic w masie cząsteczkowej po trawieniu O-glikanazą, co sugeruje, że enzymy M i P nie są O-glikozylowane.

8.3. Antygeny układu grupowego krwi P1PK i toksyny Shiga

Główny receptor dla toksyn, Gb3 znajduje się głównie na powierzchni ludzkiego śródbłonna naczyniowego, dlatego też odgrywa on ważną rolę w przebiegu zakażenia enterokrwotocznymi szczepami *E. coli* produkującymi toksyny Shiga. Wykazano, że toksyny Shiga, oprócz inaktywacji rybosomów, mogą zmieniać fenotyp komórek

śródbłonkowych, wpływając na regulację transkrypcji niektórych genów. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za te zmiany pozostają nieznane (Petruzzello-Pellegrini, Moslemi-Naeini i Marsden, 2013; Mercatelli, Bortolotti i Giorgi, 2020).

Aby sprawdzić, jaka jest wrażliwość śródbłonkowych komórek ptasiej aorty na toksynę Shiga, wykonano testy cytotoksyczności z użyciem holotoksyny Stx1. Dwudziestogodzinna inkubacja z toksyną wywarła niewielki efekt cytotoksyczny na gołębie komórki śródbłonkowe pozyskane z aorty, mimo zastosowania ok. 100X wyższego stężenia niż dla komórek transfekowanych gołębimi enzymami, oraz ok. 1000X wyższego stężenia niż dla komórek transdukowanych ludzką syntazą Gb3/CD77 (Szymczak-Kulus *i in.*, 2021). Uprzednio wykazano, że równie wysoką odporność na działanie toksyn obserwowano u myszy z wyłączoną syntazą Gb3/CD77 (Okuda *i in.*, 2006). Niespodziewanie, efekt cytotoksyczny obserwowano dla komórek śródbłonkowych kury. Wyniki testu cytotoksyczności z wykorzystaniem holotoksyny Stx1, gdzie mimo zastosowania dużego stężenia holotoksyny gołębie komórki śródbłonkowe wykazują niską, a kurze wysoką wrażliwość (spadek żywotności do ok. 70%) na toksynę jest zaskakujący. Wykazano, że komórki bezgrzebieniowców nie mają na powierzchni receptorów dla toksyn Shiga (Suzuki, Laskowski, i Lee, 2004) w związku z czym obserwowany efekt cytotoksyczny może być wynikiem mechanizmów niezależnych od Gb3. Na przykład cząsteczki toksyn mogłyby być przenoszone w mikropęcherzykach wytworzonych przez komórki gospodarza pozwalając toksynie na ominięcie jego układu odpornościowego czy makropinocytozy (Schüller, 2011; Menge, 2020b; Detzner, Krojnewski, *i in.*, 2021). W bazie NCBI znajduje się sekwencja kurzego homologu ludzkiego genu *A4GALT*, jednak nie ulega on transkrypcji (badania własne autorki). Do tej pory nie opisano klinicznych objawów zakażenia STEC u drobiu, jednak w eksperymentach z kontrolowanymi zakażeniami *in vivo* wykazano wrażliwość ptaków na szczepy STEC (obserwowano zmiany w śródbłonku i leżącej poniżej blaszki właściwej błony śluzowej części proksymalnej i środkowej jelita ślepego (Beery, Doyle i Schoeni, 1985)). W późniejszych badaniach nie stwierdzono jednak żadnych objawów klinicznych a w badanej surowicy zidentyfikowano przeciwciała neutralizujące toksyny niektórych szczepów STEC (Williams Smith, Green i Parsell, 1983). Najnowsze prace potwierdzają brak objawów klinicznych wskazując jednocześnie gatunki

drobiu hodowlanego jako rezerwuary dla STEC (Ritchie, 2014; Chapman *i in.*, 2022).

Mała wrażliwość na holotoksynę obserwowana dla komórek gołębiego śródbłonka również jest nieoczekiwana. Ze względu na to, że poziom wiązania podjednostki 1B toksyny Shiga był stosunkowo niski (Tabela 19), można przypuszczać, że komórki te mają małą liczbę receptorów, lub że są one dla Stx1B niedostępne. Większość receptorów dla Stx1B znajduje się na glikoproteinach, które mogą wprawdzie być funkcjonalnymi receptorami, ale mogą też pełnić role receptorów pułapkowych, które wiążą toksynę, ale jej nie internalizują. Ponadto, w eksperymentach z użyciem DRMs (*detergent-resistant membranes*) wykazało, że długie łańcuchy acylowe (C24:0 oraz C24:1) Gb3 oraz Gb4 mogą powodować „spalenie” łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych w zewnętrznej części błony komórkowej (Detzner, Krojnewski, *i in.*, 2021). Oddziaływania między długołańcuchowymi glikosfingolipidami w zewnętrznej części i fosfatydyloseryną (18:0/18:1) w wewnętrznej części (mechanizm znany jako „uścisk ręki” łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych), może prowadzić do utworzenia klastrów poprzez sieciowanie glikosfingolipidów, co z kolei może prowadzić do przenoszenia sygnałów do cytozolu. Niewykluczone, że opisywany mechanizm ma miejsce w przypadku transportu toksyn Stx. Rola krótkich łańcuchów acylowych wciąż nie została zbadana (Detzner, Klein, *i in.*, 2021). W przypadku ptasich komórek, zidentyfikowano jony dla Gb3 z krótkimi łańcuchami acylowymi, w tym niespotykanymi u ssaków (C19, wielonienasycone). Synteza krótszych łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych może uniemożliwić tworzenia klastrów, tym samym blokując przenoszenie sygnałów do wnętrza komórki (Nakayama *i in.*, 2018; Iwabuchi, Nakayama i Hanafusa, 2022).

W przypadku ludzkiej linii komórkowej 2102Ep transfekowanej wektorami kodującymi enzym M lub P, testy cytotoxyczności wykazały wyższą wrażliwość na toksynę komórek z ekspresją enzymu M, jednak różnice były istotne statystycznie tylko dla dwóch najwyższych stosowanych stężeń holotoksyny.

Ze względu na to, że nie otrzymano dotychczas ptasiej linii komórkowej produkującej jedynie enzym M lub P, wysunięcie jednoznacznych wniosków na temat roli tych enzymów w wiązaniu toksyn Shiga jest na razie niemożliwe. Na pierwszy plan wysuwają się dwie hipotezy na temat możliwych przyczyn zmniejszonej oporności ptaków na toksynę Shiga. Pierwsza zakłada, że topologia błony ptasich komórek

(w szczególności śród błonkowych) utrudnia toksynom dostęp do receptorów. W wielu publikacjach sugerowano, że nie tylko obecność czy ilość receptorów, ale także topologia błony, stopień glikozylacji jej składników czy zawartość cholesterolu mogą mieć wpływ na dostęp i charakter wzajemnych oddziaływań cząsteczek toksyny i receptora (Pezeshkian *i in.*, 2016; Detzner, Pohlentz i Müthing, 2020; Menge, 2020a; Detzner, Krojnewski, *i in.*, 2021; Johannes i Verhelst, 2021). Większość produkowanych przez analizowane w niniejszej pracy ptasie komórki glikosfingolipidów ma krótkie łańcuchy kwasów tłuszczowych. Inaczej jest w przypadku ludzkiej linii 2102Ep, gdzie obserwowany efekt cytotoksyczny może być wynikiem produkcji głównie glikosfingolipidów o długich (C24, C24:1) łańcuchach acylowych kwasów tłuszczowych.

Druga (w opinii autorki bardziej prawdopodobna) hipoteza, to działanie glikotopów P1 jak receptory pułapkowe. Za tą hipotezą mogą przemawiać wyniki uzyskane przez Morimoto i współpr. w testach cytotoksyczności, gdzie komórki linii HeLa produkujące enzym P wykazywały znacznie mniejszą wrażliwość na toksynę niż komórki transfekowane wektorem kodującym ludzką syntazę Gb3/CD77, przy jednoczesnej obecności Gb3 (Morimoto *i in.*, 2020). Może się tak dzieć dlatego, że duża ilość glikoproteinowych glikotopów P1 tworzy barierę uniemożliwiającą cząsteczkom toksyn dotarcie do właściwego receptora.

Ludzie, zwierzęta i środowisko są ważnymi czynnikami w powstawaniu i przenoszeniu różnych chorób zakaźnych. W większości chorób zakaźnych ludzi zwierzęta pełnią rolę źródeł lub żywicieli pośrednich dla patogenów. Oszacowano, że około 60% pojawiających się u ludzi zakażeń ma charakter odzwierzęcy (zoonozy), a wśród tych patogenów ponad 70% pochodzi od dziko żyjących zwierząt. Szacuje się, że na całym świecie zoonozy to około 2,4 miliarda przypadków zachorowań i 2,7 miliona zgonów ludzi rocznie (Fong, 2017; Rahman *i in.*, 2020).

Niektóre kluczowe patogeny przenoszone przez człowieka, co do których wykazano, że zakażają zwierzęta obejmują: wirus odry (paramyksowirusy), wirus grypy A (ortomyksowirusy), wirus opryszczki zwykłej 1 (herpeswirusy), wirus SARS CoV-2, pierwotniaki i pasożyty robaków oraz bakterie, takie jak oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus* czy *Mycobacterium tuberculosis* (Epstein i Price, 2009; Messenger, Barnes i Gray, 2014). Wiele z tych patogenów rozpoznaje antygeny cukrowe; przykładowo, o tym że wirus grypy wiąże się z receptorem na powierzchni komórek za pośrednictwem

kwasu sialowego, wiadomo od lat 50. dwudziestego wieku (Gottschalk, 1952; Viswanathan *i in.*, 2010). (Unione *i in.*, 2017; Thompson, de Vries i Paulson, 2019). Dlatego modyfikacja takich antygenów przez organizmy gospodarza stała się jedną ze strategii obrony przed patogenami.

Aby sprawić, że receptory cukrowe na powierzchni komórki nie będą wiązać patogenów, organizmy gospodarzy wykorzystują trzy strategie:

1. Antygen cukrowy rozpoznawany przez patogen ulega modyfikacji, w wyniku czego przestaje być rozpoznawany przez patogen. Przykładem mogą być antygeny grupowe AB które są rozpoznawane przez receptor PfEMP1 z *P. falciparum*, w wyniku czego zakażone merozoitami erytrocyty wiążą się do komórek śródbłona, unikając kontaktu z makrofagami wątroby. Brak tych antygenów u osób grupy O powoduje bardziej wydajne usuwanie zakażonych erytrocytów w wątrobie (Cserti i Dzik, 2007).
2. Antygen cukrowy rozpoznawany przez patogen przestaje być produkowany, w wyniku czego wiązanie patogenu jest niemożliwe. Ubocznym skutkiem może być produkcja przeciwciał rozpoznających ten antygen na patogenach. Przykładem może być zanik antygeny Gal α 1 \rightarrow 3Gal, co podwyższa odporność na patogeny z tym antygenem (Suchanowska i Czerwiński, 2009).
3. Antygen cukrowy staje się receptorem pułapkowym (*decoy receptor*), który wiąże patogen, ale zapobiega jego wnikięciu. Przykład: antygeny A/B dla toksyny cholery albo ludzkie antygeny cukrowe z mleka ludzkiego (A/B, Lewis) dla rotawirusów (Anstee, 2010; El-Hawiet, Kitova i Klassen, 2015; Orczyk-Pawłowicz i Lis-Kuberka, 2020).

Mimo wielu badań nad poznaniem molekularnych mechanizmów, za pomocą których toksyny Shiga rozpoznają, wiążą się i prowadzą do śmierci komórek gospodarza (człowieka) nadal niewiele wiadomo, a stosowane terapie nie są skuteczne. Zwrócenie uwagi na ptaki, które mimo obecności na komórkach w pełni funkcjonalnych receptorów pozostają niewrażliwe na toksyny rodzi pytanie: w jaki sposób niwelują one działanie toksyn Shiga? Z przedstawionych powyżej strategii najbardziej prawdopodobną wydaje się trzecia. W przeciwieństwie do człowieka u ptaków dominującą wydaje się być syntaza Gb3/CD77 wykazująca aktywność jedynie wobec glikoproteinowych akceptorów, które jak mogą stanowić receptory pułapkowe dla toksyn. Być może pozostałe, niezbadane jeszcze paralogi tego enzymu z gołębia również mają znaczenie w niewrażliwości ptaków

na toksyny Shiga. Aby odpowiedzieć na to pytanie niezbędne jest wykonanie badań ich aktywności i swoistości akceptorowej.

Badanie wrażliwości komórek produkujących glikokoniugaty z epitopem Gal α 1 \rightarrow 4Gal na toksyny Shiga jest ważne dla zrozumienia związku między enterokrwotocznymi szczepami *E. coli* występującymi u ptaków a ich żywicielami, co nadal jest przedmiotem debaty. Przyjmuje się, że obecność enterokrwotocznych szczepów u niektórych gatunków może stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego (Lambrecht *i in.*, 2021; Pavez-Muñoz *i in.*, 2021). Wytwarzające toksynę Shiga (STEC) i enteropatogenne *E. coli* (EPEC) reprezentują dwa z co najmniej sześciu patotypów ludzkiej enterokrwotocznej bakterii *E. coli*, które kolonizują ptasie jelita i mogą być uważane za patogeny odzwierzęce. Jednak ptasi mechanizm odporności na toksyny nie jest znany (Sanches *i in.*, 2017). Wykazano, że ptaki mogą być nosicielami STEC, ale podobnie jak bydło wydają się odporne i mogą być żywicielem dodatkowym. Szpaki i gołębie są prawdopodobnie głównymi nosicielami patogennych szczepów zakażających człowieka i zwierzęta domowe, ponieważ te dwa gatunki ptaków mogą zamieszkiwać budynki miejskie, parki i place zabaw, gdzie ludzie są narażeni na kontakt z tymi zwierzętami i ich odchodami (Persad i Lejeune, 2014; Fadel, Afifi i Al-Qabili, 2017; Luzzago *i in.*, 2021). Dzikie ptaki zostały po raz pierwszy zidentyfikowane jako potencjalne źródło infekcji STEC w 1997 roku (Wallace, Cheasty i Jones, 1997). Od tego czasu STEC wyizolowano od gołębi (Schmidt, Scheef, Morabito, Caprioli, Lothar H Wieler, *i in.*, 2000; Wani *i in.*, 2004), wróbli (Foster *i in.*, 2006), szpaków (Kauffman i LeJeune, 2011; Williams, Pearl i LeJeune, 2011) i innych gatunków ptaków (Gholami-Ahangaran i Zia-Jahromi, 2014; Pedersen i Clark, 2007; Kobayashi *i in.*, 2009; Seleem, Sabry i Abdel-Moein, 2021). Ptaki migrujące na duże odległości mogą ułatwiać przenoszenie STEC na duże obszary. Podobnie jest z przenoszeniem patogennych bakterii między populacjami ptaków (Ohio *i in.*, 2007; Utratna *i in.*, 2017; Seleem, Sabry i Abdel-Moein, 2021). Nosiciele STEC odnotowano również wśród drobiu. Częstość występowania STEC O157:H7 u kurcząt wahała się od 0 do 1,5%, podczas gdy u indyków dochodziła do 7,5% dodatkowo zidentyfikowanych próbek kału (Nielsen *i in.*, 2004; Doane *i in.*, 2007).

Ostatnio wykazano, że ludzka syntaza Gb3/CD77 może również przyłączać reszty Gal do akceptorów glikoproteinowych, wbrew utrwalonemu od dawna przekonaniu, że

może ona wykorzystywać wyłącznie akceptory glikosfingolipidowe (Stenfelt *i in.*, 2019; Szymczak-Kulus *i in.*, 2021). Jeżeli ludzkie i ptasie enzymy rzeczywiście syntezują podobne produkty, wykluczyłoby to możliwość, że ptaki są odporne na toksyny Shiga z powodu braku funkcjonalnych receptorów. W niniejszej pracy udało się określić swoistość dwóch enzymów (M i P), a ujawnienie swoistości pozostałych może pomóc nam zrozumieć ptasi paradoks odporności na toksynę Shiga.

W trakcie realizacji niniejszej pracy pojawiły się trzy problemy, które trudno wyjaśnić. Są to:

1. Duża ilość GSL w erytrocytach ptaków, u których względny stosunek poziomu transkryptu P do M jest wysoki;
2. Niski poziom wrażliwości komórek gołębiego śródbłonka na holotoksyny Shiga;
3. Wrażliwość kurzych komórek śródbłonka na holotoksyny Shiga.

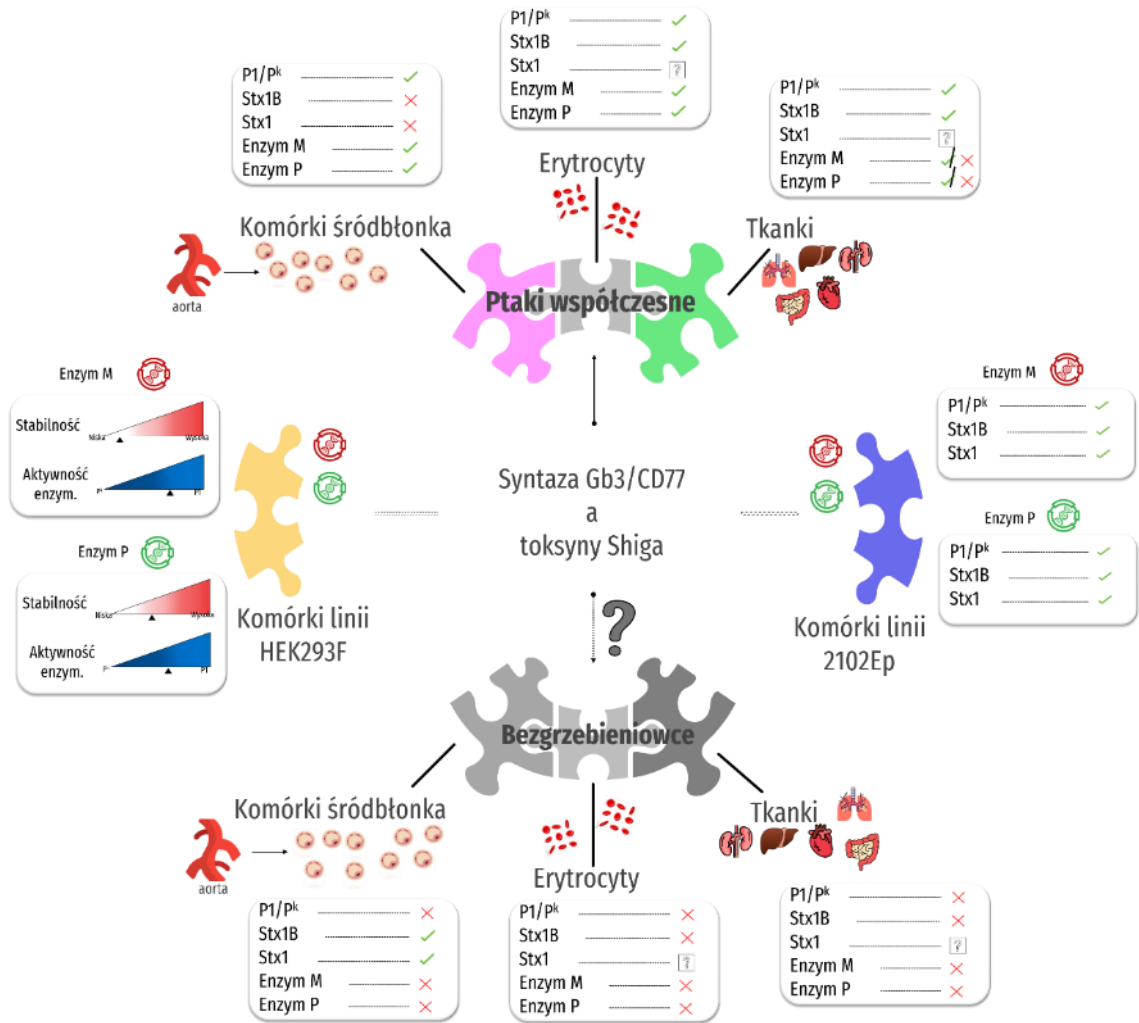
W przypadku pierwszego problemu podstawowym ograniczeniem jest zakres prowadzonej analizy. Niski poziom transkryptu dla enzymu M, w przypadkach, gdy komórki wykazują zdolność do produkcji glikosfingolipidów, jest trudny do wytłumaczenia. Autorka uważa, że analiza aktywności i swoistości pozostałych paralogów syntazy Gb3/CD77 pozwoli na wyjaśnienie tego zjawiska. Jest prawdopodobne, że obecność kilku paralogów może mieć wpływ na brak związku między poziomem transkryptu dla enzymu M a ilością glikosfingolipidów, co z kolei może przekładać się ochronę przez zakażeniami, w szczególności szczepami STEC.

Drugi problem może być związany z aktywnością enzymu P, który syntezuje reszty Gal α 1 \rightarrow 4Gal na glikoproteinach ze znacząco wyższą wydajnością niż ludzki enzym. Niewykluczone, że wysoki stopień α -galaktozylacji białek błonowych może tworzyć sieć, która wprowadzi wiąże toksyny Shiga, ale uniemożliwia im przedostanie się do w pełni funkcjonalnych receptorów glikosfingolipidowych, w szczególności Gb3.

Ostatni problem dotyczy sposobu internalizowania cząsteczek toksyn Shiga przez bezgrzebieniowców. Czy podobnie jak w ludzkich liniach komórkowych niewykazujących produkcji Gb3 (neutrofile, komórki nabłonka nerki) istnieją mechanizmy umożliwiające cząsteczkom toksyn wniknięcie do komórki oparte o transcytozę przekomórkową, makropinocytozę lub endocytozę? Wyjaśnienie podstaw tych mechanizmów molekularnych i czynników zaangażowanych w odpowiedź na działania toksyn Shiga stanowić będzie duże wyzwanie.

Celem odpowiedzi na pytania postawione w niniejszej pracy oraz rozszerzenia zakresu prowadzonych badań planowane są następujące eksperymenty:

1. Zbadanie swoistości substratowej i aktywności enzymatycznej pozostałych pięciu paralogów ptasiej syntazy Gb3/CD77 w celu określenia ich swoistości;
2. Przyżyciowe wiązanie podjednostki 1B toksyny Shiga wyznakowanej fluorescencyjnie do różnych komórkach (erytrocyty, komórki śródbłonka) pochodzących z gołębia i kury z wykorzystaniem nowoczesnych metod mikroskopowych (*live-cell imaging*) w celu wstępnego określenia mechanizmu wiązania cząsteczek toksyn Shiga przez te komórki;
3. Określenie względnych poziomów transkryptów dla poszczególnych paralogów w różnych tkankach gołębi;
4. Analiza struktur N-glikanów występujących na paralogach;
5. Ponowne próby unieśmiertelniania gołębiej linii śródbłonkowej;
6. Próba charakterystyki wstępnie zidentyfikowanych (punkt 2) cząsteczek obecnych na ptasich komórkach oddziaływujących z toksynami Shiga.



Ryc. 39. Schemat badań nad rolą ptasich syntaz Gb3/CD77 w oddziaływaniu z toksyną Shiga opisanych w niniejszej pracy.


9. PODSUMOWANIE

1. Antygeny układu grupowego krwi P1PK występują jedynie u przedstawicieli parwklasy ptaków współczesnych, nie ma ich u przedstawicieli bezgrzebieniowców. Wykazują duże zróżnicowanie gatunkowe i osobnicze. Mimo występowania antygenów układu grupowego krwi P1PK gatunki należące do ptaków współczesnych nie wytwarzają alloprzeciwciał na te antygeny.
2. Gatunki ptaków należące do parwklasy ptaków współczesnych mają co najmniej dwa geny odpowiedzialne za produkcję syntazy Gb3/CD77.
3. Enzym M wykazuje aktywność wobec akceptorów glikoproteinowych i glikosfingolipidowych, podczas gdy enzym P jest aktywny jedynie wobec glikoprotein.
4. Syntazy Gb3/CD77 M i P wykazują zdolność do produkcji w pełni funkcjonalnych i pułapkowych receptorów dla toksyn Shiga. Czynniki wpływające na wrażliwość ptasich komórek śródbłonna na holotoksynę Stx1 wykraczają poza proste oddziaływanie ligand – receptor.

10. LITERATURA

1. Aebi, Markus. 2013. 'N-Linked Protein Glycosylation in the ER'. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11):2430–37.
2. Albesa-Jové, David, David Giganti, Mary Jackson, Pedro M. Alzari, and Marcelo E. Guerin. 2014. 'Structure-Function Relationships of Membrane-Associated GT-B Glycosyltransferases.' *Glycobiology* 24(2):108–24.
3. Albesa-Jové, David, Fernanda Mendoza, Ane Rodrigo-Unzueta, Fernando Gomollón-Bel, Javier O. Cifuentes, Saioa Urresti, Natalia Comino, Hansel Gómez, Javier Romero-García, José M. Lluch, Enea Sancho-Vaello, Xevi Biarnés, Antoni Planas, Pedro Merino, Laura Masgrau, and Marcelo E. Guerin. 2015. 'A Native Ternary Complex Trapped in a Crystal Reveals the Catalytic Mechanism of a Retaining Glycosyltransferase'. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54(34):9898–9902.
4. Albesa-Jové, David, M. Ángela Sainz-Polo, Alberto Marina, and Marcelo E. Guerin. 2017. 'Structural Snapshots of α -1,3-Galactosyltransferase with Native Substrates: Insight into the Catalytic Mechanism of Retaining Glycosyltransferases'. *Angewandte Chemie - International Edition* 56(47):14853–57.
5. Albuquerque-Wendt, Andreia, Hermann J. Hütte, Falk F. R. Buettner, Françoise H. Routier, and Hans Bakker. 2019. 'Membrane Topological Model of Glycosyltransferases of the GT-C Superfamily'. *International Journal of Molecular Sciences* 20(19):4842.
6. Alteen, Matthew G., Hong Yee Tan, and David J. Vocadlo. 2021. 'Monitoring and Modulating O-GlcNAcylation: Assays and Inhibitors of O-GlcNAc Processing Enzymes'. *Current Opinion in Structural Biology* 68:157–65.
7. Altman, Meghan O. and Pascal Gagneux. 2019. 'Absence of Neu5Gc and Presence of Anti-Neu5Gc Antibodies in Humans-An Evolutionary Perspective'. *Frontiers in Immunology* 10:789.
8. Anon. 2018. 'The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2017'. *EFSA Journal* 16(12).
9. Anon. n.d. 'BGvar | Blood Group Associated Genomic Variant Resource - CSIR IGIB'. Retrieved 27 January 2022a (<https://clingen.igib.res.in/bgvar/>).
10. Anon. n.d. 'Dieter Avian Blood Groups_PoultSciRev_1992b.Pdf'.
11. Anon. n.d. 'SnapGene | Software for Everyday Molecular Biology'. Retrieved 1 March 2022c (<https://www.snapgene.com/>).
12. Anstee, David J. 2010. 'The Relationship between Blood Groups and Disease'. *Blood* 115(23):4635–43.
13. Appanna, Nathan, Hylton Gibson, Elena Gangitano, Niall J. Dempster, Karen Morris, Sherly George, Anastasia Arvaniti, Laura L. Gathercole, Brian Keevil, Trevor M. Penning, Karl-Heinz Storbeck, Jeremy W. Tomlinson, and Nikolaos Nikolaou. 2021. 'In Vitro Characterisation of AKR1D1 Variants N Appanna et Al'. *Journal of Molecular Endocrinology* 181–94.
14. Aquino-Gil, Moyira, Annick Pierce, Yobana Perez-Cervera, Edgar Zenteno, and Tony Lefebvre. 2017. 'OGT: A Short Overview of an Enzyme Standing out from Usual Glycosyltransferases'. *Biochemical Society Transactions* 45(2):365–70.
15. Arab, Sara and Clifford A. Lingwood. 1998. 'Intracellular Targeting of the Endoplasmic Reticulum/Nuclear Envelope by Retrograde Transport May Determine Cell Hypersensitivity to Verotoxin via Globotriaosyl Ceramide Fatty Acid Isoform Traffic'. *Journal of Cellular Physiology* 177(4):646–60.
16. Ardèvol, Albert and Carme Rovira. 2015. 'Reaction Mechanisms in Carbohydrate-Active Enzymes: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Insights from Ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations'. *Journal of the American Chemical Society* 137(24):7528–47.
17. Bai, Xiangning, Shanshan Fu, Ji Zhang, Ruyue Fan, Yanmei Xu, Hui Sun, Xiaohua He, Jianguo Xu, and Yanwen Xiong. 2018. 'Identification and Pathogenomic Analysis of an Escherichia Coli Strain Producing a Novel Shiga Toxin 2 Subtype'. *Scientific Reports* 8(1):6756.
18. Basu, Debaleena, Xiao Ping Li, Jennifer N. Kahn, Kerrie L. May, Peter C. Kahn, and Nilgun E. Tumer. 2015. 'The A1 Subunit of Shiga Toxin 2 Has Higher Affinity for Ribosomes and Higher Catalytic Activity than the A1 Subunit of Shiga Toxin 1'. *Infection and Immunity* 84(1):149–61.
19. Bateman, Alex, Maria Jesus Martin, Sandra Orchard, Michele Magrane, Rahat Agivetova, Shadab Ahmad, Emanuele Alpi, Emily H. Bowler-Barnett, Ramona Britto, Borisas Bursteinas, Hema Bye-A-

- Jee, Ray Coetzee, Austra Cukura, Alan Da Silva, Paul Denny, Tunca Dogan, Thank God Ebenezer, Jun Fan, Leyla Garcia Castro, Penelope Garmiri, George Georghiou, Leonardo Gonzales, Emma Hatton-Ellis, Abdulrahman Hussein, Alexandr Ignatchenko, Giuseppe Insana, Rizwan Ishtiaq, Petteri Jokinen, Vishal Joshi, Dushyanth Jyothi, Antonia Lock, Rodrigo Lopez, Aurelien Luciani, Jie Luo, Yvonne Lussi, Alistair MacDougall, Fabio Madeira, Mahdi Mahmoudy, Manuela Menchi, Alok Mishra, Katie Moulang, Andrew Nightingale, Carla Susana Oliveira, Sangya Pundir, Guoying Qi, Shriya Raj, Daniel Rice, Milagros Rodriguez Lopez, Rabie Saidi, Joseph Sampson, Tony Sawford, Elena Speretta, Edward Turner, Nidhi Tyagi, Preethi Vasudev, Vladimir Volynkin, Kate Warner, Xavier Watkins, Rossana Zaru, Hermann Zellner, Alan Bridge, Sylvain Poux, Nicole Redaschi, Lucila Aimò, Ghislaine Argoud-Puy, Andrea Auchincloss, Kristian Axelsen, Parit Bansal, Delphine Baratin, Marie Claude Blatter, Jerven Bolleman, Emmanuel Boutet, Lionel Breuza, Cristina Casals-Casas, Edouard de Castro, Kamal Chikh Echioukh, Elisabeth Coudert, Beatrice Cuche, Mikael Doche, Dolnide Dornevil, Anne Estreicher, Maria Livia Famiglietti, Marc Feuermann, Elisabeth Gasteiger, Sebastien Gehant, Vivienne Gerritsen, Arnaud Gos, Nadine Gruaz-Gumowski, Ursula Hinz, Chantal Hulo, Nevila Hyka-Nouspikel, Florence Jungo, Guillaume Keller, Arnaud Kerhornou, Vicente Lara, Philippe Le Mercier, Damien Lieberherr, Thierry Lombardot, Xavier Martin, Patrick Masson, Anne Morgat, Teresa Batista Neto, Salvo Paesano, Ivo Pedruzzi, Sandrine Pilbout, Lucille Pourcel, Monica Pozzato, Manuela Pruess, Catherine Rivoire, Christian Sigrist, Karin Sonesson, Andre Stutz, Shyamala Sundaram, Michael Tognolli, Laure Verbregue, Cathy H. Wu, Cecilia N. Arighi, Leslie Arminski, Chuming Chen, Yongxing Chen, John S. Garavelli, Hongzhan Huang, Kati Laiho, Peter McGarvey, Darren A. Natale, Karen Ross, C. R. Vinayaka, Qinghua Wang, Yuqi Wang, Lai Su Yeh, and Jian Zhang. 2021. 'UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021'. *Nucleic Acids Research* 49(D1):D480–89.
20. Beddoe, Travis, Adrienne W. Paton, Jérôme Le Nours, Jamie Rossjohn, and James C. Paton. 2010. 'Structure, Biological Functions and Applications of the AB5 Toxins'. *Trends in Biochemical Sciences* 35(7):411–18.
 21. Beery, J. T., M. P. Doyle, and J. L. Schoeni. 1985. 'Colonization of Chicken Cecae by Escherichia Coli Associated with Hemorrhagic Colitis'. *Applied and Environmental Microbiology* 49(2):310–15.
 22. Bernhofer, Michael, Christian Dallago, Tim Karl, Venkata Satagopam, Michael Heinzinger, Maria Littmann, Tobias Olenyi, Jiajun Qiu, Konstantin Schütze, Guy Yachdav, Haim Ashkenazy, Nir Ben-Tal, Yana Bromberg, Tatyana Goldberg, Laszlo Kajan, Sean O'donoghue, Chris Sander, Andrea Schafferhans, Avner Schlessinger, Gerrit Vriend, Milot Mirdita, Piotr Gawron, Wei Gu, Yohan Jarosz, Christophe Trefois, Martin Steinegger, Reinhard Schneider, and Burkhard Rost. n.d. 'PredictProtein – Predicting Protein Structure and Function for 29 Years'.
 23. Binnington, B., D. Lingwood, A. Nutikka, and C. A. Lingwood. 2002. 'Effect of Globotriaosyl Ceramide Fatty Acid Alpha-Hydroxylation on the Binding by Verotoxin 1 and Verotoxin 2'. *Neurochemical Research* 27(7–8):807–13.
 24. Blenda, Anna V., Nourine A. Kamili, Shang-Chuen Wu, William F. Abel, Diyoly Ayona, Christian Gerner-Smidt, Alex Ho, Guy M. Benian, Richard D. Cummings, Connie M. Arthur, and Sean R. Stowell. 2022. 'Galectin-9 Recognizes and Exhibits Antimicrobial Activity toward Microbes Expressing Blood Group-like Antigens'. *Journal of Biological Chemistry* 101704.
 25. Bonnedahl, J., M. Drobni, M. *. Gauthier-Clerc, J. Hernandez, and S. Granholm. 2009. 'Dissemination of Escherichia Coli with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France Dissemination of Escherichia Coli with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in The'. *PLoS ONE* 4(6):5958.
 26. Booher, S. L., N. A. Cornick, and H. W. Moon. 2002. 'Persistence of Escherichia Coli O157:H7 in Experimentally Infected Swine'. *Veterinary Microbiology* 89(1):69–81.
 27. Borges, Clarissa A., Renato P. Maluta, Lívia G. Beraldo, Marita V. Cardozo, Elisabete A. L. Guastalli, Subhashinie Kariyawasam, Chitrita DebRoy, and Fernando A. Ávila. 2017. 'Captive and Free-Living Urban Pigeons (Columba Livia) from Brazil as Carriers of Multidrug-Resistant Pathogenic Escherichia Coli'. *Veterinary Journal*.
 28. Boruah, Bhargavi M., Renuka Kadirvelraj, Lin Liu, Annapoorani Ramiah, Chao Li, Guanghui Zong, Gerlof P. Bosman, Jeong Yeh Yang, Lai Xi Wang, Geert Jan Boons, Zachary A. Wood, and Kelley W. Moremen. 2020. 'Characterizing Human α -1,6-Fucosyltransferase (FUT8) Substrate Specificity and Structural Similarities with Related Fucosyltransferases'. *Journal of Biological Chemistry* 295(50):11727–45.
 29. Breton, Christelle, Lenka Šnajdrová, Charlotte Jeanneau, Jaroslav Koča, and Anne Imberty. 2006.

- 'Structures and Mechanisms of Glycosyltransferases'. *Glycobiology*.
30. Brigotti, Maurizio, Domenica Carnicelli, Valentina Arfilli, Nicola Tamassia, Francesca Borsetti, Elena Fabbri, Pier Luigi Tazzari, Francesca Ricci, Pasqualepaolo Pagliaro, Enzo Spisni, and Marco A. Cassatella. 2013. 'Identification of TLR4 as the Receptor That Recognizes Shiga Toxins in Human Neutrophils'. *The Journal of Immunology* 191(9):4748–58.
 31. Brockhausen, Inka and Jacob Melamed. 2021. 'Mucins as Anti-Cancer Targets: Perspectives of the Glycobiologist'. *Glycoconjugate Journal* 2021 38:4 38(4):459–74.
 32. Bruyand, M., P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, H. de Valk, L. A. King, S. Le Hello, S. Bonacorsi, and C. Loirat. 2018. 'Hemolytic Uremic Syndrome Due to Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Infection'. *Médecine et Maladies Infectieuses* 48(3):167–74.
 33. Burk, C., Richard Dietrich, G. Acar, Maximilian Moravek, M. Bulte, and E. Martlbauer. 2003. 'Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in Escherichia Coli ONT:H19 of Bovine Origin'. *Journal of Clinical Microbiology* 41(5):2106–12.
 34. Burzyńska, Patrycja, Łukasz Sobala, Krzysztof Mikołajczyk, Marlena Jodłowska, and Ewa Jaśkiewicz. 2021. 'Sialic Acids as Receptors for Pathogens'. *Biomolecules* 11(6):831.
 35. Cabezas-Cruz, Alejandro, Lourdes Mateos-Hernández, Pilar Alberdi, Margarita Villar, Gilles Riveau, Emmanuel Hermann, Anne-Marie Schacht, Jamal Khalife, Margarida Correia-Neves, Christian Gortazar, and José De La Fuente. 2017. 'Effect of Blood Type on Anti- α -Gal Immunity and the Incidence of Infectious Diseases'. *Experimental & Molecular Medicine* 301.
 36. Cardini, C. E., A. C. Paladini, R. Caputto, and L. F. Leloir. 1950. 'Uridine Diphosphate Glucose: The Coenzyme of the Galactose–Glucose Phosphate Isomerization'. *Nature* 165(4188):191–92.
 37. Cervoni, Gabrielle E., Jane J. Cheng, Kathryn A. Stackhouse, Jamie Heimburg-Molinaro, and Richard D. Cummings. 2020. 'O-Glycan Recognition and Function in Mice and Human Cancers'. *The Biochemical Journal* 477(8):1541–64.
 38. Chapman, P. A., C. A. Siddons, A. T. Cerdan,  Malo, and M. A. Harkin. 2022. 'A 1-Year Study of Escherichia Coli O157 in Cattle, Sheep, Pigs and Poultry'. *Epidemiol. Infect* 119:245–50.
 39. Chen, Po Han, Jen Tsan Chi, and Michael Boyce. 2018. 'Functional Crosstalk among Oxidative Stress and O-GlcNAc Signaling Pathways'. *Glycobiology* 28(8):556.
 40. Chou, Teh Ying and Gerald W. Hart. 2001. 'O-Linked N-Acetylglucosamine and Cancer: Messages from the Glycosylation of c-Myc'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 491:413–18.
 41. Christiansen, Dale, Julie Milland, Effie Mouhtouris, Hilary Vaughan, Daniel G. Pellicci, Malcolm J. McConville, Dale I. Godfrey, and Mauro S. Sandrin. 2008. 'Humans Lack Igb3 Due to the Absence of Functional Igb3-Synthase: Implications for NKT Cell Development and Transplantation' edited by H. L. Ploegh. *PLoS Biology* 6(7):e172.
 42. Colebatch, Andrew J., Alexander Dobrovic, and Wendy A. Cooper. 2019. 'TERT Gene: Its Function and Dysregulation in Cancer'. *Journal of Clinical Pathology* 72(4):281–84.
 43. Cooling, Laura. 2015. 'Blood Groups in Infection and Host Susceptibility'. *Clinical Microbiology Reviews* 28(3):801–70.
 44. Cooling, Laura. 2016. 'Carbohydrate Blood Groups'.
 45. Cooling, Laura L. W., Kathleen Kelly, James Barton, Debbie Hwang, Theodore A. W. Koerner, and John D. Olson. 2005. 'Determinants of ABH Expression on Human Blood Platelets.' *Blood* 105(8):3356–64.
 46. Cooling, Laura L. W., De Sheng Zhang, Stanley J. Naides, and Theodore A. W. Koerner. 2003. 'Glycosphingolipid Expression in Acute Nonlymphocytic Leukemia: Common Expression of Shiga Toxin and Parvovirus B19 Receptors on Early Myeloblasts'. *Blood* 101(2):711–21.
 47. Coutinho, Pedro M., Emeline Deleury, Gideon J. Davies, and Bernard Henrissat. 2003. 'An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases'. *Journal of Molecular Biology* 328(2):307–17.
 48. Cserti, Christine M. and Walter H. Dzik. 2007. 'The ABO Blood Group System and Plasmodium Falciparum Malaria'. *Blood* 110(7):2250–58.
 49. Czerwiński, Marcin. 2015. '[Blood Groups - Minuses and Pluses. Do the Blood Group Antigens Protect Us from Infectious Diseases?]'. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 69:703–22.
 50. Czerwiński, Marcin and Radosław Kaczmarek. 2013. 'Genetic Basis of Synthesis of Carbohydrate Blood Group Antigens'. *Acta Haematologica Polonica* 44(3):251–59.
 51. D'Angelo, Giovanni, Serena Capasso, Lucia Sticco, and Domenico Russo. 2013. 'Glycosphingolipids: Synthesis and Functions'. *FEBS Journal* 280(24):6338–53.

52. Daniels, Geoff. 2013. *Human Blood Groups*. 3rd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
53. Daszak, Peter, Andrew A. Cunningham, and Alex D. Hyatt. 2000. 'Emerging Infectious Diseases of Wildlife--Threats to Biodiversity and Human Health'. *Science (New York, N.Y.)* 287(5452):443–49.
54. Delplace, Florence, Emmanuel Maes, Jérôme Lemoine, and Gérard Strecker. 2002. 'Species Specificity of O-Linked Carbohydrate Chains of the Oviducal Mucins in Amphibians: Structural Analysis of Neutral Oligosaccharide Alditols Released by Reductive Beta-Elimination from the Egg-Jelly Coats of *Rana Clamitans*'. *The Biochemical Journal* 363(Pt 3):457–71.
55. Detzner, Johanna, Anna-Lena Klein, Gottfried Pohlentz, Elisabeth Krojnewski, Hans-Ulrich Humpf, Alexander Mellmann, Helge Karch, and Johannes Müthing. 2021. 'Primary Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells (PHRPTEpiCs): Shiga Toxin (Stx) Glycosphingolipid Receptors, Stx Susceptibility, and Interaction with Membrane Microdomains'.
56. Detzner, Johanna, Elisabeth Krojnewski, Gottfried Pohlentz, Daniel Steil, Hans-Ulrich Humpf, Alexander Mellmann, Helge Karch, and Johannes Müthing. 2021. 'Shiga Toxin (Stx)-Binding Glycosphingolipids of Primary Human Renal Cortical Epithelial Cells (PHRCEpiCs) and Stx-Mediated Cytotoxicity'.
57. Detzner, Johanna, Gottfried Pohlentz, and Johannes Müthing. 2020. 'Valid Presumption of Shiga Toxin-Mediated Damage of Developing Erythrocytes in EHEC-Associated Hemolytic Uremic Syndrome'. *Toxins* 12(6):373.
58. Dhar, Chirag, Aniruddha Sasmal, Sandra Diaz, Andrea Verhagen, Hai Yu, Wanqing Li, Xi Chen, and Ajit Varki. 2021. 'Are Sialic Acids Involved in COVID-19 Pathogenesis?' *Glycobiology* 31(9):1068–71.
59. Van Die, Irma, Angelique Van Tetering, Wietske E. C. M. Schiphorst, Takeshi Sato, Kiyoshi Furukawa, and Dirk H. Van Den Eijnden. 1999. 'The Acceptor Substrate Specificity of Human B4-Galactosyltransferase V Indicates Its Potential Function in O-Glycosylation'. *FEBS Letters* 450(1–2):52–56.
60. Doane, C. A., P. Pangloli, H. A. Richards, J. R. Mount, D. A. Golden, And F. A. Draughon. 2007. 'Occurrence of Escherichia Coli O157:H7 in Diverse Farm Environments'. *Journal of Food Protection* 70(1):6–10.
61. Duk, Maria, Grazyna Kusnierz-Alejska, Elena Y. Korchagina, Nicolai V. Bovin, Stanislaw Bochenek, and Elwira Lisowska. 2005. 'Anti- α -Galactosyl Antibodies Recognizing Epitopes Terminating with A1,4-Linked Galactose: Human Natural and Mouse Monoclonal Anti-NOR and Anti-P1 Antibodies'. *Glycobiology* 15(2):109–18.
62. Duk, Maria, Bruce B. Reinhold, Vernon N. Reinhold, Grazyna Kusnierz-Alejska, and Elwira Lisowska. 2001. 'Structure of a Neutral Glycosphingolipid Recognized by Human Antibodies in Polyagglutinable Erythrocytes from the Rare NOR Phenotype'. *Journal of Biological Chemistry*.
63. Dupuy, Fabrice, Jean Michel Petit, Rosella Mollicone, Rafael Oriol, Raymond Julien, and Abderrahman Maftah. 1999. 'A Single Amino Acid in the Hypervariable Stem Domain of Vertebrate A1,3/1,4-Fucosyltransferases Determines the Type 1/Type 2 Transfer: Characterization of Acceptor Substrate Specificity of the Lewis Enzyme by Site-Directed Mutagenesis'. *Journal of Biological Chemistry*.
64. Effler, D., F. Roland, and R. A. Redding. 1976. 'The P Blood Group System in Pigeon Breeders and Pigeon Breeder's Disease'. *Chest* 70(6):719–25.
65. El-Hawiet, Amr, Elena N. Kitova, and John S. Klassen. 2015. 'Glycan Recognition Recognition of Human Milk Oligosaccharides by Bacterial Exotoxins'.
66. Esmail, Sally and Morris F. Manolson. 2021. 'Advances in Understanding N-Glycosylation Structure, Function, and Regulation in Health and Disease'. *European Journal of Cell Biology* 100(7–8).
67. Espinosa, Laura, Aimée Gray, Geraldine Duffy, Séamus Fanning, and Barry J. McMahon. 2018. 'A Scoping Review on the Prevalence of Shiga-Toxigenic Escherichia Coli in Wild Animal Species'. *Zoonoses and Public Health* 65(8):911–20.
68. Fadel, Hanaa Mohamed, Rabab Afifi, and Dheyazan Mohammed Al-Qabili. 2017. 'Characterization and Zoonotic Impact of Shiga Toxin Producing Escherichia Coli in Some Wild Bird Species'.
69. Fairbrother, J. M. and É. Nadeau. 2006. 'Escherichia Coli: On-Farm Contamination of Animals'. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz* 25(2):555–69.
70. Falguières, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero, and L. Johannes. 2001. 'Targeting of Shiga Toxin B-Subunit to Retrograde Transport Route in Association with Detergent-Resistant Membranes'. *Molecular Biology of the Cell* 12(8):2453–68.
71. Fan, Erkang, Ethan A. Merritt, Christophe L. M. J. Verlinde, and Wim G. J. Hol. 2000. 'AB(5) Toxins: Structures and Inhibitor Design'. *Current Opinion in Structural Biology* 10(6):680–86.

72. FAO/WHO. 2018. 'Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC) and Food: Attribution, Characterization, and Monitoring MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT SERIES 31 REPORT Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC) and Food: Attribution, Characterisation, and Monitoring'.
73. Fehl, Charlie and John A. Hanover. 2021. 'Tools, Tactics and Objectives to Interrogate Cellular Roles of O-GlcNAc in Disease'. *Nature Chemical Biology* 2021 18:1 18(1):8–17.
74. Fernández, Lara P., Ruth Sánchez-Martínez, Teodoro Vargas, Jesús Herranz, Roberto Martín-Hernández, Marta Mendiola, David Hardisson, Guillermo Reglero, Jaime Feliu, Andrés Redondo, and Ana Ramírez de Molina. 2018. 'The Role of Glycosyltransferase Enzyme GCNT3 in Colon and Ovarian Cancer Prognosis and Chemoresistance'. *Scientific Reports* 8(1):8485.
75. Ferrando, Maria Laura, Niels Willemse, Edoardo Zaccaria, Yvonne Pannekoek, Arie van der Ende, and Constance Schultsz. 2017. 'Streptococcal Adhesin P (SadP) Contributes to Streptococcus Suis Adhesion to the Human Intestinal Epithelium' edited by J. Kreth. *PLOS ONE* 12(4):e0175639.
76. Folch, J., M. Lees, And G. H. Sloane Stanley. 1957. 'A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues.' *The Journal of Biological Chemistry* 226(1):497–509.
77. Foster, Geoffrey, Judith Evans, Hazel I. Knight, Alastair W. Smith, George J. Gunn, Lesley J. Allison, Barti A. Synge, and Tom W. Pennycott. 2006. 'Analysis of Feces Samples Collected from a Wild-Bird Garden Feeding Station in Scotland for the Presence of Verocytotoxin-Producing Escherichia Coli O157'. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 72(3):2265–67.
78. François-Gérard, C., J. Brocteur, and A. André. 1980. 'Turtledove: A New Source of P1-Like Material Cross-Reacting with the Human Erythrocyte Antigen'. *Vox Sanguinis* 39(3):141–48.
79. Frank, Christina, Dirk Werber, Jakob P. Cramer, Mona Askar, Mirko Faber, Matthias an der Heiden, Helen Bernard, Angelika Fruth, Rita Prager, Anke Spode, Maria Wadl, Alexander Zoufaly, Sabine Jordan, Markus J. Kemper, Per Follin, Luise Müller, Lisa A. King, Bettina Rosner, Udo Buchholz, Klaus Stark, and Gérard Krause. 2011. 'Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing Escherichia Coli O104:H4 Outbreak in Germany'. *The New England Journal of Medicine* 365(19):1771–80.
80. Fredriksson, Sten Åke, Maria Podbielska, Bo Nilsson, Bożena Krotkiewska, Elwira Lisowska, and Hubert Krotkiewski. 2010. 'ABH Blood Group Antigens in N-Glycan of Human Glycophorin A'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 498(2):127–35.
81. Fukushima, Hisao, Takao Hashizume, Yoshiki Morita, Junko Tanaka, Katsumi Azuma, Yuki Mizumoto, Masako Kaneno, Moto O. Matsu-Ura, Kazushi Konma, and Teruo Kitani. 1999. 'Clinical Experiences in Sakai City Hospital during the Massive Outbreak of Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157 Infections in Sakai City, 1996'. *Pediatrics International : Official Journal of the Japan Pediatric Society* 41(2):213–17.
82. Galili, U., M. R. Clark, S. B. Shohet, J. Buehler, and B. A. Macher. 1987. 'Evolutionary Relationship between the Natural Anti-Gal Antibody and the Gal Alpha 1----3Gal Epitope in Primates'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(5):1369–73.
83. Gallegos, Karen M., Deborah G. Conrady, Sayali S. Karve, Thusitha S. Gunasekera, Andrew B. Herr, and Alison A. Weiss. 2012. 'Shiga Toxin Binding to Glycolipids and Glycans'. *PLoS ONE*.
84. Gannon, Victor P. J. and Carlton L. Gyles. 1990. 'Characteristics of the Shiga-like Toxin Produced by Escherichia Coli Associated with Porcine Edema Disease'. *Veterinary Microbiology* 24(1):89–100.
85. García-García, Ana, Sonia Serna, Zhang Yang, Ignacio Delso, Víctor Taleb, Thomas Hicks, Raik Artschwager, Sergey Y. Vakhrushev, Henrik Clausen, Jesús Angulo, Francisco Corzana, Niels C. Reichardt, and Ramon Hurtado-Guerrero. 2021. 'FUT8-Directed Core Fucosylation of N-Glycans Is Regulated by the Glycan Structure and Protein Environment'. *ACS Catalysis* 11(15):9052–65.
86. Gargiulo, Antonio, Tamara Pasqualina Russo, Rita Schettini, Karina Mallardo, Mariarosaria Calabria, Lucia Francesca Menna, Pasquale Raia, Ugo Pagnini, Vincenzo Caputo, Alessandro Fioretti, and Ludovico Dipineto. 2014. 'Occurrence of Enteropathogenic Bacteria in Urban Pigeons (Columba Livia) in Italy'. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 14(4):251–55.
87. Garnham, Rebecca, Emma Scott, Karen E. Livermore, and Jennifer Munkley. 2019. 'ST6GAL1: A Key Player in Cancer'. *Oncology Letters* 18(2):983–89.
88. Garred, Øystein, Elena Dubinina, Anna Poleskaya, Sjur Olsnes, Juri Kozlov, and Kirsten Sandvig. 1997. 'Role of the Disulfide Bond in Shiga Toxin A-Chain for Toxin Entry into Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 272(17):11414–19.
89. Gault, Christopher R., Lina M. Obeid, and Yusuf A. Hannun. 2010. 'An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown'. Pp. 1–23 in *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 688. NIH Public Access.

90. De Geus, Eveline D., Boris Tefsen, Daphne A. Van Haarlem, Willem Van Eden, Irma Van Die, and Lonneke Vervelde. 2013. 'Glycans from Avian Influenza Virus Are Recognized by Chicken Dendritic Cells and Are Targets for the Humoral Immune Response in Chicken'. *Molecular Immunology* 56(4):452–62.
91. Ghanbarpour, Reza and Shirin Daneshdoost. 2012. 'Identification of Shiga Toxin and Intimin Coding Genes in Escherichia Coli Isolates from Pigeons (Columba Livia) in Relation to Phylotypes and Antibiotic Resistance Patterns'. *Tropical Animal Health and Production* 44(2):307–12.
92. Gholami-Ahangaran, Majid and Noosha Zia-Jahromi. 2014. 'Identification of Shiga Toxin and Intimin Genes in Escherichia Coli Detected from Canary (Serinus Canaria Domestica)'. *Toxicology and Industrial Health* 30(8):724–27.
93. Gioia-Di Chiacchio, R. M., M. P. V Cunha, R. M. Sturn, L. Z. Moreno, A. M. Moreno, C. B. P. Pereira, F. H. Martins, M. R. Franzolin, R. M. F. Piazza, and T. Knöbl. 2016. 'Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC): Zoonotic Risks Associated with Psittacine Pet Birds in Home Environments'. *Veterinary Microbiology* 184:27–30.
94. Gloster, Tracey M. 2014. 'Advances in Understanding Glycosyltransferases from a Structural Perspective'. *Current Opinion in Structural Biology* 28:131–41.
95. Goel, Ruchika, Evan M. Bloch, France Pirenne, Arwa Z. Al-Riyami, Elizabeth Crowe, Laetitia Dau, Kevin Land, Mary Townsend, Thachil Jecko, Naomi Rahimi-Levene, Gopal Patidar, Cassandra D. Josephson, Satyam Arora, Marion Vermeulen, Hans Vrieling, Celina Montemayor, Adaeze Oreh, S. Hindawi, Karin van den Berg, Katherine Serrano, Cynthia So-Osman, Erica Wood, D. V. Devine, and Steven L. Spitalnik. 2021. 'ABO Blood Group and COVID-19: A Review on Behalf of the ISBT COVID-19 Working Group'. *Vox Sanguinis* 116(8):849–61.
96. Gottschalk, Alfred. 1952. 'Carbohydrate Residue of a Urine Mucoprotein Inhibiting Influenza Virus Haemagglutination'. *Nature* 170(4329):662–63.
97. Gowda, D. Channe, John Glushka, Herman Van Halbeek, Rao N. Thotakura, Reinhard Bredehorst, and Carl Wilhelm Vogel. 2001. 'N-Linked Oligosaccharides of Cobra Venom Factor Contain Novel Alpha(1-3)Galactosylated Le(x) Structures'. *Glycobiology* 11(3):195–208.
98. De Graffenried, Christopher L. and Carolyn R. Bertozzi. 2004. 'The Roles of Enzyme Localisation and Complex Formation in Glycan Assembly within the Golgi Apparatus'. *Current Opinion in Cell Biology* 16(4):356–63.
99. Graham, David R. M., Megan J. Mitsak, Steven T. Elliott, Dawn Chen, Stephen A. Whelan, Gerald W. Hart, and Jennifer E. Van Eyk. 2008. 'Two-Dimensional Gel Based Approaches for the Assessment of N-Linked and O-GlcNAc Glycosylation in Human and Simian Immunodeficiency Viruses'. *Proteomics* 8(23–24):4919.
100. Guerardel, Y., O. Kol, E. Maes, T. Lefebvre, B. Boilly, M. Davril, and G. Strecker. 2000. 'O-Glycan Variability of Egg-Jelly Mucins from Xenopus Laevis: Characterization of Four Phenotypes That Differ by the Terminal Glycosylation of Their Mucins'. *Biochemical Journal* 352(Pt 2):449.
101. Gupta, Ramneek and Søren Brunak. 2002. 'Prediction of Glycosylation across the Human Proteome and the Correlation to Protein Function'. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing* 310–22.
102. Gupta, Rohitesh, Frank Leon, Christopher M. Thompson, Ramakrishna Nimmakayala, Saswati Karmakar, Palanisamy Nallasamy, Seema Chugh, Dipakkumar R. Prajapati, Satyanarayana Rachagani, Sushil Kumar, and Moorthy P. Ponnusamy. 2020. 'Global Analysis of Human Glycosyltransferases Reveals Novel Targets for Pancreatic Cancer Pathogenesis'. *British Journal of Cancer* 122:1661–72.
103. Hashimoto, Kosuke, Thomas Madej, Stephen H. Bryant, and Anna R. Panchenko. 2010. 'Functional States of Homooligomers: Insights from the Evolution of Glycosyltransferases'. *Journal of Molecular Biology* 399(1):196–206.
104. Hehnly, Heidi, David Sheff, and Mark Stamnes. 2006. 'Shiga Toxin Facilitates Its Retrograde Transport by Modifying Microtubule Dynamics'. *Molecular Biology of the Cell* 17(10):4379–89.
105. Heiman, Katherine E., Rajal K. Mody, Shacara D. Johnson, Patricia M. Griffin, and L. Hannah Gould. 2015. 'Escherichia Coli O157 Outbreaks in the United States, 2003-2012'. *Emerging Infectious Diseases* 21(8):1293–1301.
106. Herscovics, Annette. 1999. 'Importance of Glycosidases in Mammalian Glycoprotein Biosynthesis'. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473(1):96–107.
107. Hill, Chris H., Georgia M. Cook, Samantha J. Spratley, Stuart Fawke, Stephen C. Graham, and Janet E. Deane. 2018. 'The Mechanism of Glycosphingolipid Degradation Revealed by a GALC-SapA

- Complex Structure'. *Nature Communications* 2017 9:1 9(1):1–9.
108. Himswoth, Chelsea G., Erin Zabeck, Andrea Desruisseau, E. Jane Parmley, Richard Reid-Smith, Claire M. Jardine, Patrick Tang, and David M. Patrick. 2015. 'PREVALENCE AND CHARACTERISTICS OF ESCHERICHIA COLI AND SALMONELLA SPP. IN THE FECES OF WILD URBAN NORWAY AND BLACK RATS (RATTUS NORVEGICUS AND RATTUS RATTUS) FROM AN INNER-CITY NEIGHBORHOOD OF VANCOUVER, CANADA'. *Journal of Wildlife Diseases* 51(3):589–600.
109. Hoey, D. E. Elain., Linda Sharp, Carol Currie, Clifford A. Lingwood, David L. Gally, and David G. E. Smith. 2003. 'Verotoxin 1 Binding to Intestinal Crypt Epithelial Cells Results in Localization to Lysosomes and Abrogation of Toxicity'. *Cellular Microbiology* 5(2):85–97.
110. Hogg, R. A., J. P. Holmes, S. Ghebrehewet, K. Elders, J. Hart, C. Whiteside, G. A. Willshaw, T. Cheasty, A. Kay, K. Lynch, and G. C. Pritchard. 2009. 'Probable Zoonotic Transmission of Verocytotoxigenic Escherichia Coli O 157 by Dogs'. *The Veterinary Record* 164(10):304–5.
111. Holgersson, Jan and Jonas Löfling. 2006. 'Glycosyltransferases Involved in Type 1 Chain and Lewis Antigen Biosynthesis Exhibit Glycan and Core Chain Specificity'. *Glycobiology* 16(7):584–93.
112. Hughes, Anna C., Yuzhu Zhang, Xiangning Bai, Yanwen Xiong, Yan Wang, Xi Yang, Qingping Xu, and Xiaohua He. 2019. 'Structural and Functional Characterization of Stx2k, a New Subtype of Shiga Toxin 2'. *Microorganisms* 8(1):4.
113. Itkonen, Harri M., Massimo Loda, and Ian G. Mills. 2021. 'O-GlcNAc Transferase – An Auxiliary Factor or a Full-Blown Oncogene?' *Molecular Cancer Research* 19(4):555–64.
114. Iwabuchi, Kazuhisa, Hitoshi Nakayama, and Kei Hanafusa. 2022. 'Lactosylceramide-Enriched Microdomains Mediate Human Neutrophil Immunological Functions via Carbohydrate-Carbohydrate Interaction'. *Glycoconjugate Journal*.
115. Iwamura, Koichi, Keiko Furukawa, Makoto Uchikawa, Birgitta Nilsson Sojka, Yoshinao Kojima, Joelle Wiels, Hiroshi Shiku, Takeshi Urano, and Koichi Furukawa. 2003. 'The Blood Group P1 Synthase Gene Is Identical to the Gb3/CD77 Synthase Gene'. *Journal of Biological Chemistry* 278(45):44429–38.
116. Jacob, F., M. Anugraham, T. Pochechueva, B. W. C. Tse, S. Alam, R. Guertler, N. V. Bovin, A. Fedier, N. F. Hacker, M. E. Huflejt, N. Packer, and V. A. Heinzmann-Schwarz. 2014. 'The Glycosphingolipid P1 Is an Ovarian Cancer-Associated Carbohydrate Antigen Involved in Migration'. *British Journal of Cancer* 111(8):1634–45.
117. James, Earnest, Paul Daniel, Matilde De Las Rivas, Erandi Lira-Navarrete, Ana García-García, Ramon Hurtado-Guerrero, Henrik Clausen, Thomas A. Gerken, and Mariano Esquillor. 2020. 'Ser and Thr Acceptor Preferences of the GalNAc-Ts Vary among Isoenzymes to Modulate Mucin-Type O-Glycosylation'. *Glycobiology* 30(11):910–22.
118. Jin, Chunsheng and Susann Teneberg. 2022. 'Characterization of Novel Non-Acid Glycosphingolipids as Biomarkers of Human Gastric Adenocarcinoma'. *Journal of Biological Chemistry* 101732.
119. Jin, Fanqi and Fengshan Wang. 2020. 'The Physiological and Pathological Roles and Applications of Sialyl Lewis x, a Common Carbohydrate Ligand of the Three Selectins'. *Glycoconjugate Journal* 37(2):277–91.
120. Johannes, Ludger and Winfried Römer. 2010. 'Shiga Toxins--from Cell Biology to Biomedical Applications.' *Nature Reviews. Microbiology* 8(2):105–16.
121. Johannes, Ludger and Steven Verhelst. 2021. 'Molecules The Cellular and Chemical Biology of Endocytic Trafficking and Intracellular Delivery-The GL-Lect Hypothesis'.
122. Johansson, David, Eldina Kosovac, Jasmin Moharer, Ingrid Ljuslinder, Thomas Brännström, Anders Johansson, and Parviz Behnam-Motlagh. 2009. 'Expression of Verotoxin-1 Receptor Gb3 in Breast Cancer Tissue and Verotoxin-1 Signal Transduction to Apoptosis'. *BMC Cancer* 9(1):67.
123. Ju, Tongzhong, Grainger S. Lanneau, Tripti Gautam, Yingchun Wang, Baoyun Xia, Sean R. Stowell, Margaret T. Willard, Wenyi Wang, Jonathan Y. Xia, Rosemary E. Zuna, Zoltan Laszik, Doris M. Benbrook, Marie H. Hanigan, and Richard D. Cummings. 2008. 'Human Tumor Antigens Tn and Sialyl Tn Arise from Mutations in Cosmc'. *Cancer Research* 68(6):1636–46.
124. Kaczmarek, R., K. Szymczak-Kulus, A. Bereźnicka, K. Mikołajczyk, M. Duk, E. Majorczyk, A. Krop-Watorek, E. Klaus, J. Skowrońska, B. Michalewska, E. Brojer, and M. Czerwinski. 2018. 'Single Nucleotide Polymorphisms in A4GALT Spur Extra Products of the Human Gb3/CD77 Synthase and Underlie the P1PK Blood Group System'. *PLoS ONE* 13(4).
125. Kaczmarek, Radosław. 2010. '[Alterations of Lewis Histo-Blood Group Antigen Expression in Cancer Cells]'. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 64:87–99.

126. Kaczmarek, Radoslaw, Anna Buczkowska, Katarzyna Mikołajewicz, Hubert Krotkiewski, and Marcin Czerwinski. 2014. 'P1PK, GLOB, and FORS Blood Group Systems and GLOB Collection: Biochemical and Clinical Aspects. Do We Understand It All Yet?' *Transfusion Medicine Reviews*.
127. Kaczmarek, Radoslaw, Maria Duk, Katarzyna Szymczak, Elena Korchagina, Jolanta Tyborowska, Krzysztof Mikołajczyk, Nicolai Bovin, Boguslaw Szewczyk, Ewa Jaskiewicz, and Marcin Czerwinski. 2016. 'Human Gb3/CD77 Synthase Reveals Specificity toward Two or Four Different Acceptors Depending on Amino Acid at Position 211, Creating Pk, P1 and NOR Blood Group Antigens'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470(1):168–74.
128. Kattke, Michele D., Jason E. Gosschalk, Orlando E. Martinez, Garima Kumar, Robert T. Gale, Duilio Cascio, Michael R. Sawaya, Martin Philips, Eric D. Brown, and Robert T. Clubb. 2019. 'Structure and Mechanism of TagA, a Novel Membrane-Associated Glycosyltransferase That Produces Wall Teichoic Acids in Pathogenic Bacteria'. *PLoS Pathogens* 15(4):1–18.
129. Kauffman, M. D. and J. LeJeune. 2011. 'European Starlings (*Sturnus Vulgaris*) Challenged with *Escherichia Coli* O157 Can Carry and Transmit the Human Pathogen to Cattle'. *Letters in Applied Microbiology* 53(6):596–601.
130. Kelley, Lawrence A., Stefans Mezulis, Christopher M. Yates, Mark N. Wass, and Michael J. E. Sternberg. 2015. 'The Phyre2 Web Portal for Protein Modelling, Prediction and Analysis'. *Nature Protocols* 10(6):845.
131. Kim, Jun Seob, Moo Seung Lee, and Ji Hyung Kim. 2020. 'Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* and Its Potential Reservoirs'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:273.
132. Kirschner, Alexander K. T., Thomas C. Zechmeister, Gerhard G. Kavka, Christian Beiwl, Alois Herzig, Robert L. Mach, and Andreas H. Farnleitner. 2004. 'Integral Strategy for Evaluation of Fecal Indicator Performance in Bird-Influenced Saline Inland Waters'. *Applied and Environmental Microbiology*.
133. Kitano, Takashi, Antoine Blancher, and Naruya Saitou. 2012. 'The Functional A Allele Was Resurrected via Recombination in the Human ABO Blood Group Gene'.
134. Kobayashi, Hideki, Mika Kanazaki, Eiji Hata, and Masanori Kubo. 2009. 'Prevalence and Characteristics of Eae- and Stx-Positive Strains of *Escherichia Coli* from Wild Birds in the Immediate Environment of Tokyo Bay'. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 75(1):292–95.
135. Kobayashi, Mutsuo, Toshinori Sasaki, Noriko Saito, Kazumichi Tamura, Kenji Suzuki, Haruo Watanabe, and Noriaki Agui. 1999. 'Houseflies: Not Simple Mechanical Vectors of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61(4):625–29.
136. Koike, Chihiro, John J. Fung, David A. Geller, Reiji Kannagi, Therese Libert, Patrizia Luppi, Izumi Nakashima, Jennifer Profozich, William Rudert, Sugandha B. Sharma, Thomas E. Starzl, and Massimo Trucco. 2002. 'Molecular Basis of Evolutionary Loss of the Alpha 1,3-Galactosyltransferase Gene in Higher Primates'. *The Journal of Biological Chemistry* 277(12):10114–20.
137. Kojima, Hisao, Yukako Tohsato, Kazuya Kabayama, Saki Itonori, and Masahiro Ito. 2013. 'Biochemical Studies on Sphingolipids of *Artemia Franciscana*: Complex Neutral Glycosphingolipids'. *Glycoconjugate Journal* 30(3):257–68.
138. Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric. 1977. 'Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia Coli*'. *Infection and Immunity* 18(3):775–79.
139. Koochakzadeh, A., M. Askari Badouei, T. Zahraei Salehi, S. Aghasharif, M. Soltani, and M. R. Ehsan. 2015. 'Prevalence of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia Coli* in Wild and Pet Birds in Iran'. *Brazilian Journal of Poultry Science* 17(4):445–50.
140. Koutsoumanis, Kostas, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, Alessandra De Cesare, Lieve Herman, Friederike Hilbert, Roland Lindqvist, Maarten Nauta, Luisa Peixe, Giuseppe Ru, Marion Simmons, Panagiotis Skandamis, Elisabetta Suffredini, Claire Jenkins, Sara Monteiro Pires, Stefano Morabito, Taina Niskanen, Flemming Scheutz, Maria Teresa da Silva Felício, Winy Messens, and Declan Bolton. 2020. 'Pathogenicity Assessment of Shiga Toxin-producing *Escherichia Coli* (STEC) and the Public Health Risk Posed by Contamination of Food with STEC'. *EFSA Journal* 18(1):1–105.
141. Kovbasnjuk, Olga, Rakhilya Mourtazina, Boris Baibakov, Thomas Wang, Christian Elowsky, Michael A. Choti, Anne Kane, and Mark Donowitz. 2005. 'The Glycosphingolipid Globotriaosylceramide in the Metastatic Transformation of Colon Cancer'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- 102(52):19087–92.
142. Kuczowski, Maciej, Marta Krawiec, Berend Voslamber, Marta Ksiaczczyk, Gabriela Płoskońska-Bugla, and Alina Wieliczko. 2016. 'Virulence Genes and the Antimicrobial Susceptibility of Escherichia Coli, Isolated from Wild Waterbirds, in the Netherlands and Poland'. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 16(8):528–36.
143. Kvorjak, Michael, Yasmine Ahmed, Michelle L. Miller, Raahul Sriram, Claudia Coronello, Jana G. Hashash, Douglas J. Hartman, Cheryl A. Telmer, Natasa Miskov-Zivanov, Olivera J. Finn, and Sandra Cascio. 2020. 'Cross-Talk between Colon Cells and Macrophages Increases ST6GALNAC1 and MUC1-STn Expression in Ulcerative Colitis and Colitis-Associated Colon Cancer'. *Cancer Immunology Research* 8(2):167–78.
144. Lacher, David W., Jayanthi Gangiredla, Isha Patel, Christopher A. Elkins, and Peter C. H. Feng. 2016. 'Use of the Escherichia Coli Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Isolated from Foods.' *Journal of Food Protection* 79(10):1656–62.
145. Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4'. *Nature*.
146. Lairson, L. L., B. Henrissat, G. J. Davies, and S. G. Withers. 2008. 'Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms'. *Annual Review of Biochemistry* 77(1):521–55.
147. Lambrecht, Nathalie J., Mark L. Wilson, Dave Bridges, Joseph N. S. Eisenberg, Bright Adu, Ana Baylin, Gloria Folson, and Andrew D. Jones. 2021. 'Ruminant-Related Risk Factors Are Associated with Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Infection in Children in Southern Ghana'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 106(2):513–22.
148. Landsteiner, K. and P. Levine. 1927. 'Further Observations on Individual Differences of Human Blood.' *Experimental Biology and Medicine* 24(9):941–42.
149. Lee, Moo-Seung and Vernon Tesh. 2019. 'Roles of Shiga Toxins in Immunopathology'. *Toxins* 11(4):212.
150. Lengacher, Brandy, Terence R. Kline, Laura Harpster, Michele L. Williams, and Jeffrey T. Lejeune. 2010. 'Low Prevalence of Escherichia Coli O157:H7 in Horses in Ohio, USA'. *Journal of Food Protection* 73(11):2089–92.
151. Leung, P. H. M., J. S. M. Peiris, W. W. S. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, and W. C. Yam. 2003. 'A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxigenic Escherichia Coli'. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12):7549–53.
152. Li, Jinyuan Vero, Chai-Ann Ng, Delfine Cheng, Zijing Zhou, Mingxi Yao, Yang Guo, Ze-Yan Yu, Yogambha Ramaswamy, Lining Arnold Ju, Philip W. Kuchel, Michael P. Feneley, Diane Fatkin, and Charles D. Cox. 2021. 'Modified N-Linked Glycosylation Status Predicts Trafficking Defective Human Piezo1 Channel Mutations'. *Communications Biology* 4(1):1038.
153. Liew, Chee-Gee, Jonathan S. Draper, James Walsh, Harry Moore, and Peter W. Andrews. 2008. 'Transient and Stable Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells'. *Stem Cells*.
154. Lin, Leo Y. C., Bojana Rakic, Cecilia P. C. Chiu, Emilie Lameignere, Warren W. Wakarchuk, Stephen G. Withers, and Natalie C. J. Strynadka. 2011. 'Structure and Mechanism of the Lipooligosaccharide Sialyltransferase from Neisseria Meningitidis'. *The Journal of Biological Chemistry* 286(43):37237–48.
155. Lingwood, Clifford. 2020. 'Verotoxin Receptor-Based Pathology and Therapies'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10(March):1–10.
156. Liu, Yang, Songhai Tian, Hatim Thaker, and Min Dong. 2021. 'Shiga Toxins: An Update on Host Factors and Biomedical Applications'. *Toxins* 13(3):222.
157. Lombard, Vincent, Hemalatha Golaconda Ramulu, Elodie Drula, Pedro M. Coutinho, and Bernard Henrissat. 2014. 'The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013.' *Nucleic Acids Research* 42:D490-495.
158. Louise Wester, Astrid, Mohamed Salah Abbassi, Alice Vismarra, Magdalena Skar, Bocian Ł, Magdalena ZajačZajač, Arkadiusz Bomba, Łukasz Bocian, Wojciech Kozdrú, Marcin Polak, Jarosław WiačekWiaček, and Dariusz Wasyl. 2021. 'Antimicrobial Resistance Glides in the Sky-Free-Living Birds as a Reservoir of Resistant Escherichia Coli With Zoonotic Potential'.
159. Luna, Sarah, Vikram Krishnasamy, Louise Saw, Lori Smith, Jennifer Wagner, Jenna Weigand, Mackenzie Tewel, Marilee Kellis, Roumen Penev, Laine McCullough, Jeffrey Eason, Keegan McCaffrey, Cindy Burnett, Kelly Oakeson, Melissa Dimond, Allyn Nakashima, Deidre Barlow, Anna Scherzer, Melanie Sarino, Morgan Schroeder, Rashida Hassan, Colin Basler, Matthew Wise, and Laura Gieraltowski. 2018. 'Outbreak of E. Coli O157:H7 Infections Associated with Exposure to

- Animal Manure in a Rural Community - Arizona and Utah, June-July 2017'. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 67(23):659–62.
160. Luzzago, Camilla, Lucinda Janete Bessa, Clarissa Araujo Borges, Dorota Chrobak-Chmiel, Anna Golke, Ewelina Kwiecié, Beata Dolka, Krzysztof Adamczyk, Małgorzata J. Biegá Nska, Marina Spinu, Marian Binek, and Magdalena Rzewuska. 2021. 'Pigeons as Carriers of Clinically Relevant Multidrug-Resistant Pathogens-A Clinical Case Report and Literature Review'. *Frontiers in Veterinary Science | Www.Frontiersin.Org* 1:664226.
161. Machacek, Miranda, Chad Slawson, and Patrick E. Fields. 2018. 'O-GlcNAc: A Novel Regulator of Immunometabolism'. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 50(3):223.
162. Macher, Bruce A. and Uri Galili. 2008. 'The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) Epitope: A Carbohydrate of Unique Evolution and Clinical Relevance'. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780(2):75.
163. MacLeod, D. L., C. L. Gyles, A. Valdivieso-Garcia, and R. C. Clarke. 1991. 'Physicochemical and Biological Properties of Purified Escherichia Coli Shiga-like Toxin II Variant'. *Infection and Immunity* 59(4):1300–1306.
164. Majowicz, Shannon E., Elaine Scallan, Andria Jones-Bitton, Jan M. Sargeant, Jackie Stapleton, Frederick J. Angulo, Derrick H. Yeung, and Martyn D. Kirk. 2014. 'Global Incidence of Human Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis'. *Foodborne Pathogens and Disease*.
165. Mäkivuokko, Harri, Sampo J. Lahtinen, Pirjo Wacklin, Elina Tuovinen, Heli Tenkanen, Janne Nikkilä, Marika Björklund, Kari Aranko, Arthur C. Ouwehand, and Jaana Mättö. 2012. 'Association between the ABO Blood Group and the Human Intestinal Microbiota Composition'.
166. Maljukova, Irina, Karen F. Murray, Chengru Zhu, Edgar Boedeker, Anne Kane, Kathleen Patterson, Jeffrey R. Peterson, Mark Donowitz, and Olga Kovbasnjuk. 2009. 'Macropinocytosis in Shiga Toxin 1 Uptake by Human Intestinal Epithelial Cells and Transcellular Transcytosis'. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 296(1).
167. Maria Crespo, Pilar, Adolfo Ramó Zurita, and Jose Luis Daniotti. 2002. 'Effect of Gangliosides on the Distribution of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein in Plasma Membrane from Chinese Hamster Ovary-K1 Cells*'. *Journal of Biological Chemistry* 277:44731–39.
168. Maszszak-Seneczko, Dorota, Teresa Olczak, Piotr Jakimowicz, and Mariusz Olczak. 2011. 'Overexpression of UDP-GlcNAc Transporter Partially Corrects Galactosylation Defect Caused by UDP-Gal Transporter Mutation'. *FEBS Letters* 585(19):3090–94.
169. McFarland, Noeleen, N. Bundle, C. Jenkins, G. Godbole, A. Mikhail, T. Dallman, C. O'Connor, N. McCarthy, E. O'Connell, J. Treacy, G. Dabke, J. Mapstone, Y. Landy, J. Moore, R. Partridge, F. Jorgensen, C. Willis, P. Mook, C. Rawlings, R. Acornley, C. Featherstone, S. Gayle, J. Edge, E. McNamara, J. Hawker, and S. Balasegaram. 2017. 'Recurrent Seasonal Outbreak of an Emerging Serotype of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC O55:H7 Stx2a) in the South West of England, July 2014 to September 2015'. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 22(36).
170. McWilliam, Hamish, Weizhong Li, Mahmut Uludag, Silvano Squizzato, Young Mi Park, Nicola Buso, Andrew Peter Cowley, and Rodrigo Lopez. 2013. 'Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI'. *Nucleic Acids Research*.
171. Melton-Celsa, Angela R. 2014. 'Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function'. *Microbiol Spectr* 2(2):1–21.
172. Menge, Christian. 2020a. 'Molecular Biology of Escherichia Coli Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells.' *Toxins* 12(5).
173. Menge, Christian. 2020b. 'The Role of Escherichia Coli Shiga Toxins in STEC Colonization of Cattle'. *Toxins* 12(9):607.
174. Mercatelli, Daniele, Massimo Bortolotti, and Federico M. Giorgi. 2020. 'Transcriptional Network Inference and Master Regulator Analysis of the Response to Ribosome-Inactivating Proteins in Leukemia Cells'. *Toxicology* 441.
175. Merrill, Alfred H., May Dongmei Wang, Meeyoung Park, and M. Cameron Sullards. 2007. '(Glyco)Sphingolipidology: An Amazing Challenge and Opportunity for Systems Biology'. *Trends in Biochemical Sciences* 32(10):457–68.
176. Mestrom, Luuk, Marta Przepis, Daria Kowalczykiewicz, André Pollender, Antje Kumpf, Stefan R. Marsden, Isabel Bento, Andrzej B. Jarzębski, Katarzyna Szymańska, Arkadiusz Chruściel, Dirk Tischler, Rob Schoevaart, Ulf Hanefeld, and Peter Leon Hagedoorn. 2019. *Leloir*

- Glycosyltransferases in Applied Biocatalysis: A Multidisciplinary Approach*. Vol. 20.
177. Miao, Xiaolong, Li Jia, Huimin Zhou, Xiaobo Song, Ming Zhou, Jinchao Xu, Lifan Zhao, Xiaobin Feng, and Yongfu Zhao. 2016. 'MiR-4299 Mediates the Invasive Properties and Tumorigenicity of Human Follicular Thyroid Carcinoma by Targeting ST6GALNAC4'. *IUBMB Life* 68(2):136–44.
178. Mikolajczyk, Krzysztof, Anna Bereznička, Katarzyna Szymczak-Kulus, Katarzyna Haczkiwicz-Lesniak, Bożena Szulc, Mariusz Olczak, Joanna Rossowska, Edyta Majorczyk, Katarzyna Kapczyńska, Nicolai Bovin, Marta Lisowska, Radosław Kaczmarek, Arkadiusz Miazek, and Marcin Czerwinski. 2021. 'Missing the Sweet Spot: One of the Two N-Glycans on Human Gb3/CD77 Synthase Is Expendable'. *Glycobiology* 31(9).
179. Mikolajczyk, Krzysztof, Radosław Kaczmarek, and Marcin Czerwinski. 2020. 'How Glycosylation Affects Glycosylation: The Role of N-Glycans in Glycosyltransferase Activity'. *Glycobiology* 30(12):941–69.
180. Milland, Julie, Dale Christiansen, and Mauro S. Sandrin. 2005. 'A1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs Are Available for Xenotransplantation: Are Glycosyltransferases Still Relevant?' *Immunology & Cell Biology* 83(6):687–93.
181. Mora, Azucena, Cecilia López, Ghizlane Dhabbi, Ana M. López-Beceiro, Luís E. Fidalgo, Eduardo A. Díaz, Carlos Martínez-Carrasco, Rosalía Mamani, Alexandra Herrera, Jesús E. Blanco, Miguel Blanco, and Jorge Blanco. 2012. 'Seropathotypes, Phylogroups, Stx Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Strains with the Same Characteristics as Human-Pathogenic Isolates'. *Applied and Environmental Microbiology* 78(8):2578–85.
182. Morabito, Stefano, Giacomo Dell'Omo, Umberto Agrimi, Herbert Schmidt, Helge Karch, Thomas Cheasty, and Alfredo Caprioli. 2001. 'Detection and Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Feral Pigeons'. *Veterinary Microbiology* 82(3):275–83.
183. Moremen, Kelley W., Michael Tiemeyer, and Alison V Nairn. 2012. 'Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function'. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(7):448–62.
184. Morimoto, Kanta, Noriko Suzuki, Isei Tanida, Soichiro Kakuta, Yoko Furuta, Yasuo Uchiyama, Kentaro Hanada, Yusuke Suzuki, and Toshiyuki Yamaji. 2020. 'Blood Group P1 Antigen-Bearing Glycoproteins Are Functional but Less Efficient Receptors of Shiga Toxin than Conventional Glycolipid-Based Receptors'. *Journal of Biological Chemistry* 295(28):9490–9501.
185. Mourad, Rabih, Willy Morelle, André Neveu, and Gérard Strecker. 2001. 'Diversity of O-Linked Glycosylation Patterns between Species: Characterization of 25 Carbohydrate Chains from Oviducal Mucins of Rana Ridibunda'. *European Journal of Biochemistry*.
186. Mughini-Gras, L., | W Van Pelt, | M Van Der Voort, | M Heck, | I Friesema, and | E Franz. 2017. 'Attribution of Human Infections with Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC) to Livestock Sources and Identification of Source-Specific Risk Factors, The Netherlands (2010-2014)'. *Zoonoses Public Health* 1.
187. Murakami, Koichi, Yoshiki Etoh, Sachiko Ichihara, Eriko Maeda, Shigeyuki Takenaka, Kazumi Horikawa, Hiroshi Narimatsu, Kimiko Kawano, Yoshiaki Kawamura, and Kenitiro Ito. 2014. 'Isolation and Characteristics of Shiga Toxin 2f-Producing Escherichia Coli among Pigeons in Kyushu, Japan'. *PLoS One* 9(1).
188. Murphy, Robert, Martin Palm, Ville Mustonen, Jonas Warringer, Anne Farewell, Leopold Parts, and Danesh Moradigaravand. 2021. 'Genomic Epidemiology and Evolution of Escherichia Coli in Wild Animals in Mexico'.
189. Müthing, Johannes, Sevim Duvar, Dagmar Heitmann, Franz Georg Hanisch, Ulrich Neumann, Günter Lochnit, Rudolf Geyer, and Jasna Peter-Katalinic. 1999. 'Isolation and Structural Characterization of Glycosphingolipids of in Vitro Propagated Human Umbilical Vein Endothelial Cells'. *Glycobiology*.
190. Müthing, Johannes, Iris Meisen, Wenlan Zhang, Martina Bielaszewska, Michael Mormann, Rolf Bauerfeind, M. Alexander Schmidt, Alexander W. Friedrich, and Helge Karch. 2012. 'Promiscuous Shiga Toxin 2e and Its Intimate Relationship to Forssman'. *Glycobiology* 22(6):849–62.
191. Nagai, Ken-ichi, Nobuyoshi Takahashi, and Yukio Niimura. 2016. 'Novel Biosynthesis of Monogalactosyl-Alkylacyl Glycerolipid in Mop8 Fibroblast Cells Transfected with a Ceramide Galactosyltransferase Gene'. *Biomedical Research and Clinical Practice* 1(3):103–8.
192. Nair, Pramod C., Robyn Meech, Peter I. Mackenzie, Ross A. McKinnon, and John O. Miners. 2015. 'Insights into the UDP-Sugar Selectivities of Human UDP-Glycosyltransferases (UGT): A Molecular Modeling Perspective'. *Drug Metabolism Reviews* 47(3):335–45.
193. Nakayama, Hitoshi, Masakazu Nagafuku, Akemi Suzuki, Kazuhisa Iwabuchi, and Jin Ichi Inokuchi.

2018. 'The Regulatory Roles of Glycosphingolipid-Enriched Lipid Rafts in Immune Systems'. *FEBS Letters* 592(23):3921–42.
194. Nguyen, Linh, Kelli A. McCord, Duong T. Bui, Kim M. Bouwman, Elena N. Kitova, Mohamed Elaish, Dhanraj Kumawat, Gour C. Daskhan, Ilhan Tomris, Ling Han, Pradeep Chopra, Tzu-Jing Yang, Steven D. Willows, Andrew L. Mason, Lara K. Mahal, Todd L. Lowary, Lori J. West, Shang-Te Danny Hsu, Tom Hobman, Stephen M. Tompkins, Geert-Jan Boons, Robert P. de Vries, Matthew S. Macauley, and John S. Klassen. 2022. 'Sialic Acid-Containing Glycolipids Mediate Binding and Viral Entry of SARS-CoV-2'. *NATURE CHEMICAL BIOLOGY* | 18.
195. Nielsen, Eva Møller, Marianne N. Skov, † Jesper, J. Madsen, Jens Lodal, Jørgen Brøchner Jespersen, and Dorte L. Baggesen. 2004. 'Verocytotoxin-Producing Escherichia Coli in Wild Birds and Rodents in Close Proximity to Farms'. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 70(11):6944–47.
196. O'Brien, A., J. Newland, S. Miller, R. Holmes, H. Smith, and S. Formal. 1984. 'Shiga-like Toxin-Converting Phages from Escherichia Coli Strains That Cause Hemorrhagic Colitis or Infantile Diarrhea'. *Science* 226(4675):694–96.
197. Ohio, In, N. Cernicchiaro, D. L. Pearl, S. A. Mcewen, L. Harpster, H. J. Homan, G. M. Linz, and J. T. Lejeune. 2007. 'Association of Wild Bird Density and Farm Management Factors with the Prevalence of E. Coli O157 in Dairy Herds'.
198. Okuda, Tetsuya. 2017. 'PUGNAc Treatment Provokes Globotetraosylceramide Accumulation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 487(1):76–82.
199. Okuda, Tetsuya, Noriyo Tokuda, Shin Ichiro Numata, Masafumi Ito, Michio Ohta, Kumiko Kawamura, Joelle Wiels, Takeshi Urano, Orié Tajima, Keiko Furukawa, and Koichi Furukawa. 2006. 'Targeted Disruption of Gb3/CD77 Synthase Gene Resulted in the Complete Deletion of Globo-Series Glycosphingolipids and Loss of Sensitivity to Verotoxins'. *Journal of Biological Chemistry*.
200. Oliveira-Ferrer, Leticia, Karen Legler, and Karin Milde-Langosch. 2017. 'Role of Protein Glycosylation in Cancer Metastasis'. *Seminars in Cancer Biology* 44:141–52.
201. De Oliveira, Mirela C. V., Beatriz Q. Camargo, Marcos P. V. Cunha, Andre Becker Saldenberg, Rodrigo H. F. Teixeira, Carlos E. C. Matajira, Luisa Z. Moreno, Vasco T. M. Gomes, Ana P. G. Christ, Mikaela R. F. Barbosa, Maria I. Z. Sato, Andrea M. Moreno, and Terezinha Knöbl. 2018. 'Free-Ranging Synanthropic Birds (Ardea Alba and Columba Livia Domestica) as Carriers of Salmonella Spp. and Diarrheagenic Escherichia Coli in the Vicinity of an Urban Zoo'. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 18(1):65–69.
202. Omi, Toshinori, Shota Nakazawa, Chihiro Udagawa, Naomi Tada, Kazuhiko Ochiai, Yong Hwa Chong, Yuiko Kato, Hiroko Mitsui, Azusa Gin, Hitomi Oda, Daigo Azakami, Kyoichi Tamura, Toshinori Sako, Takeshi Inagaki, Atsushi Sakamoto, Toshihiko Tsutsui, Makoto Bonkobara, Shuichi Tsuchida, and Shigenori Ikemoto. 2016. 'Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System'.
203. Ong, Qunxiang, Weiping Han, and Xiaoyong Yang. 2018. 'O-GlcNAc as an Integrator of Signaling Pathways'. *Frontiers in Endocrinology* 9(OCT):599.
204. Orczyk-Pawłowicz, Magdalena and Jolanta Lis-Kuberka. 2020. 'The Impact of Dietary Fucosylated Oligosaccharides and Glycoproteins of Human Milk on Infant Well-Being'. *Nutrients* 12(4):1105.
205. Otani, Naoyuki, Yasutaka Kurata, Nani Maharani, Masanari Kuwabara, Nobuhito Ikeda, Tomomi Notsu, Peili Li, Junichiro Miake, Akio Yoshida, Hiromi Sakaguchi, Katsumi Higaki, Naoe Nakasone, Motokazu Tsuneto, Yasuaki Shirayoshi, Motoshi Ouchi, Haruaki Ninomiya, Kazuhiro Yamamoto, Naohiko Anzai, and Ichiro Hisatome. 2020. 'Evidence for Urate Uptake Through Monocarboxylate Transporter 9 Expressed in Mammalian Cells and Its Enhancement by Heat Shock'. *Circulation Reports* 2(8):425–32.
206. Ouzzine, Mohamed, Sandrine Gulberti, Nicolas Levoine, Patrick Netter, Jacques Magdalou, and Sylvie Fournel-Gigleux. 2002. 'The Donor Substrate Specificity of the Human B1,3-Glucuronosyltransferase I toward UDP-Glucuronic Acid Is Determined by Two Crucial Histidine and Arginine Residues'. *Journal of Biological Chemistry* 277(28):25439–45.
207. Pang, Xingchen, Hongjiao Li, Feng Guan, and Xiang Li. 2018. 'Multiple Roles of Glycans in Hematological Malignancies'. *Frontiers in Oncology* 8(SEP).
208. Parker, Heidi G., Lisa V. Kim, Nathan B. Sutter, Scott Carlson, Travis D. Lorentzen, Tiffany B. Malek, Gary S. Johnson, Hawkins B. DeFrance, Elaine A. Ostrander, and Leonid Kruglyak. 2004. 'Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog'. *Science* 304(5674):1160–64.

209. Parker, Matthew P., Kenneth R. Peterson, and Chad Slawson. 2021. 'O-GlcNAcylation and O-GlcNAc Cycling Regulate Gene Transcription: Emerging Roles in Cancer'. *Cancers* 13(7).
210. Pata, Mickael O., Yusuf A. Hannun, and Carl K. Y. Ng. 2010. 'Plant Sphingolipids: Decoding the Enigma of the Sphinx'. *The New Phytologist* 185(3):611–30.
211. Paton, Adrienne W., James C. Paton, Michael W. Heuzenroeder, Paul N. Goldwater, and Paul A. Manning. 1992. 'Cloning and Nucleotide Sequence of a Variant Shiga-like Toxin II Gene from Escherichia Coli OX3:H21 Isolated from a Case of Sudden Infant Death Syndrome'. *Microbial Pathogenesis* 13(3):225–36.
212. Paton, Adrienne W., Potjane Srimanote, Ursula M. Talbot, Hui Wang, and James C. Paton. 2004. 'A New Family of Potent AB(5) Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic Escherichia Coli'. *The Journal of Experimental Medicine* 200(1):35–46.
213. Paulson, James C. and Karen J. Colleys. 1989. 'The Journal Of Biological Chemistry Glycosyltransferases Structure, Localization, And Control Of Cell Type-Specific Glycosylation'. 264(30):17615–18.
214. Pavez-Muñoz, Erika, Bastián Fernández-Sanhueza, Constanza Urzúa-Encina, Nicolás Galarce, and Raúl Alegría-Morán. 2021. 'Risk Factors for Positivity to Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli and Salmonella Enterica in Backyard Production Systems Animals from Metropolitana Region, Chile: A Threat to Public Health?' *J. Environ. Res. Public Health* 18.
215. Pedersen, Kerri and Larry Clark. 2007. 'A Review of Shiga Toxin Escherichia Coli and Salmonella Enterica in Cattle and Free-Ranging Birds : Potential Association and Epidemiological Links'. *Human–Wildlife Conflicts*.
216. Persad, Anil K. and Jeffrey T. Lejeune. 2014. 'Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli'.
217. Pestana, Ana, João Vinagre, Manuel Sobrinho-Simões, and Paula Soares. 2017. 'TERT Biology and Function in Cancer: Beyond Immortalisation'. *Journal of Molecular Endocrinology* 58(2):R129–46.
218. Petruzzello-Pellegrini, Tania N., Mozghan Moslemi-Naeini, and Philip A. Marsden. 2013. 'New Insights into Shiga Toxin-Mediated Endothelial Dysfunction in Hemolytic Uremic Syndrome) New Insights into Shiga Toxin-Mediated Endothelial Dysfunction in Hemolytic Uremic Syndrome'. *Special Focus Review Virulence* 4(6):556–63.
219. Pezeshkian, Weria, Haifei Gao, Senthil Arumugam, Ulrike Becken, Patricia Bassereau, Jean-Claude Florent, John Hjort Ipsen, Ludger Johannes, and Julian C. Shillcock. 2016. 'Mechanism of Shiga Toxin Clustering on Membranes'.
220. Pinto, Graça, Marta Sampaio, Oscar Dias, Carina Almeida, Joana Azeredo, and Hugo Oliveira. 2021. 'Insights into the Genome Architecture and Evolution of Shiga Toxin Encoding Bacteriophages of Escherichia Coli'. *BMC Genomics* 22(1):366.
221. Plancke, Yves, Florence Delplace, Jean Michel Wieruszkeski, Emmanuel Maes, and Gérard Strecker. 1996. 'Isolation and Structures of Glycoprotein-Derived Free Oligosaccharides from the Unfertilized Eggs of Scyliorhinus Caniculus: Characterization of the Sequences Galactose(A1-4)Galactose(B1-3)-N-Acetylglucosamine and N-Acetylneuraminic Acid(A2-6)Galactose(B1-3)-N-Acetylglucosamine'. *European Journal of Biochemistry* 235(1–2):199–206.
222. Platt, Frances M., Alessandra d'Azzo, Beverly L. Davidson, Elizabeth F. Neufeld, and Cynthia J. Tifft. 2018. 'Lysosomal Storage Diseases'. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1 4(1):1–25.
223. Podbielska, Maria, Sten Åke Fredriksson, Bo Nilsson, Elwira Lisowska, and Hubert Krotkiewski. 2004. 'ABH Blood Group Antigens in O-Glycans of Human Glycophorin A'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 429(2):145–53.
224. Probert, William S., Cassandra McQuaid, and Kimmi Schrader. 2014. 'Isolation and Identification of an Enterobacter Cloacae Strain Producing a Novel Subtype of Shiga Toxin Type 1'. *Journal of Clinical Microbiology* 52(7):2346–51.
225. Qiang, Amy, Chad Slawson, and Patrick E. Fields. 2021. 'The Role of O-GlcNAcylation in Immune Cell Activation'. *Frontiers in Endocrinology* 12.
226. Qiu, Wang Ren, Xuan Xiao, Wei Zhong Lin, and Kuo Chen Chou. 2015. 'iUbiq-Lys: Prediction of Lysine Ubiquitination Sites in Proteins by Extracting Sequence Evolution Information via a Gray System Model'. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 33(8):1731–42.
227. Radermecker, M., M. Bruwier, J. Bury, And G. Fillet. 1980. 'P1 Incompatibility in Pigeon Breeders'. *Clinical & Experimental Allergy* 10(3):309–12.
228. Radhakrishnan, Prakash, Sally Dabelsteen, Frey Brus Madsen, Chiara Francavilla, Katharina L. Kopp, Catharina Steentoft, Sergey Y. Vakhrushev, Jesper V. Olsen, Lars Hansen, Eric P. Bennett, Anders

- Woetmann, Guangliang Yin, Longyun Chen, Haiyan Song, Mads Bak, Ryan A. Hlady, Staci L. Peters, Rene Opavsky, Christenze Thode, Klaus Qvortrup, Katrine T. B. G. Schjoldager, Henrik Clausen, Michael A. Hollingsworth, and Hans H. Wandall. 2014. 'Immature Truncated O-Glycophenotype of Cancer Directly Induces Oncogenic Features'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(39):E4066–75.
229. Radhouani, Hajer, Patrícia Poeta, Alexandre Gonçalves, Rui Pacheco, Roberto Sargo, and Gilberto Igrejas. 2012. 'Wild Birds as Biological Indicators of Environmental Pollution: Antimicrobial Resistance Patterns of Escherichia Coli and Enterococci Isolated from Common Buzzards (Buteo Buteo)'. *Journal of Medical Microbiology* 61(6):837–43.
230. Radosavljević, Vladan, Ernst Jürgens Finke, and Goran Belojević. 2016. 'Analysis of Escherichia Coli O104:H4 Outbreak in Germany in 2011 Using Differentiation Method for Unusual Epidemiological Events'. *Central European Journal of Public Health* 24(1):9–15.
231. Ramakrishnan, Boopathy and Pradman K. Qasba. 2002. 'Structure-Based Design of B1,4-Galactosyltransferase I (B4Gal-T1) with Equally Efficient N-Acetylgalactosaminyltransferase Activity'. *Journal of Biological Chemistry* 277(23):20833–39.
232. Ramakrishnan, Boopathy and Pradman K. Qasba. 2007. 'Role of a Single Amino Acid in the Evolution of Glycans of Invertebrates and Vertebrates'. *Journal of Molecular Biology* 365(3):570–76.
233. Ramakrishnan, Boopathy and Pradman K. Qasba. 2010. 'Structure-Based Evolutionary Relationship of Glycosyltransferases: A Case Study of Vertebrate B1,4-Galactosyltransferase, Invertebrate B1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase and α -Polypeptidyl-N-Acetylgalactosaminyltransferase'. *Current Opinion in Structural Biology* 20(5):536–42.
234. Rangel, Josefa M., Phyllis H. Sparling, Collen Crowe, Patricia M. Griffin, and David L. Swerdlow. 2005. 'Epidemiology of Escherichia Coli O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002'. *Emerging Infectious Diseases* 11(4):603–9.
235. Reed, Kurt D., Jennifer K. Meece, James S. Henkel, and Kurt Reed. 2002. 'Systematic Review Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens'. *Clinical Medicine & Research* 1:5–12.
236. Ricci Hagman, J. 2018. 'An Update on the GLOB Blood Group System (and Former GLOB Collection)'. *Blood Group Review*.
237. Ringressi, A., V. Yahalom, J. Säfwenbergh, M. E. Reid, M L Olsson, Magen David Adom, Ramat Gan, and Martin L Olsson. 2004. 'Genetic Heterogeneity at the Glycosyltransferase Loci Underlying the GLOB Blood Group System and Collection*'. *British Journal of Haematology* 125:528–36.
238. Ritchie, Jennifer M. 2014. 'Animal Models of Enterohemorrhagic Escherichia Coli Infection' edited by V. Sperandio and C. J. Hovde. *Microbiology Spectrum* 2(4).
239. Robert, Aude and Joëlle Wiels. 2021. 'Toxins Shiga Toxins as Antitumor Tools'.
240. Roche, Niamh, Dag Ilver, Jonas Ångström, Silvia Barone, John L. Telford, and Susann Teneberg. 2007. 'Human Gastric Glycosphingolipids Recognized by Helicobacter Pylori Vacuolating Cytotoxin VacA'. *Microbes and Infection* 9(5):605–14.
241. Rumi, María Valeria, Kinue Irino, Natalia Deza, Miguel J. Huguet, and Adriana B. Bentancor. 2012. 'First Isolation in Argentina of a Highly Virulent Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O145:NM from a Domestic Cat'. *Journal of Infection in Developing Countries* 6(4):358–63.
242. Russmann, H., H. Schmidt, J. Heesemann, A. Caprioli, and H. Karch. 1994. 'Variants of Shiga-like Toxin II Constitute a Major Toxin Component in Escherichia Coli O157 Strains from Patients with Haemolytic Uraemic Syndrome'. *Journal of Medical Microbiology* 40(5):338–43.
243. Russo, Tamara Pasqualina, Antonino Pace, Lorena Varriale, Luca Borrelli, Antonio Gargiulo, Marina Pompameo, Alessandro Fioretti, and Ludovico Dipineto. 2021. 'Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enteropathogenic Bacteria in Yellow-Legged Gulls (Larus Michahellis) in Southern Italy'.
244. Sahraneshin Samani, Fazel, Jodene K. Moore, Pardis Khosravani, and Marzieh Ebrahimi. 2014. 'Features of Free Software Packages in Flow Cytometry: A Comparison between Four Non-Commercial Software Sources'. *Cytotechnology*.
245. Saier, Milton H. 1999. 'Eukaryotic Transmembrane Solute Transport Systems'. Pp. 61–136 in *International Review of Cytology*. Vol. 190. Academic Press Inc.
246. Saleh, Mazen T. and Jean Gariépy. 1993. 'Local Conformational Change in the B-Subunit of Shiga-like Toxin 1 at Endosomal PH'. *Biochemistry* 32(3):918–22.
247. Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg, and H. C. Krivan. 1990. 'Comparison of the Glycolipid Receptor Specificities of Shiga-like Toxin Type II and Shiga-like Toxin Type II

- Variants.' *Infection and Immunity* 58(3):611–18.
248. Sanches, Lilian Aparecida, Marcelo da Silva Gomes, Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira, Marcos Paulo Vieira Cunha, Maria Gabriela Xavier de Oliveira, Mônica Aparecida Midolli Vieira, Tânia Aparecida Tardelli Gomes, and Terezinha Knobl. 2017. 'Captive Wild Birds as Reservoirs of Enteropathogenic E. Coli (EPEC) and Shiga-Toxin Producing E. Coli (STEC)'. *Brazilian Journal of Microbiology*.
249. Sandvig, Kirsten, Øystein Garred, Kristian Prydz, Juri V. Kozlov, Steen H. Hansen, and Bo Van Deurs. 1992. 'Retrograde Transport of Endocytosed Shiga Toxin to the Endoplasmic Reticulum'. *Nature* 1992 358:6386 358(6386):510–12.
250. Scallan, Elaine, Robert M. Hoekstra, Frederick J. Angulo, Robert V. Tauxe, Marc Alain Widdowson, Sharon L. Roy, Jeffery L. Jones, and Patricia M. Griffin. 2011. 'Foodborne Illness Acquired in the United States--Major Pathogens'. *Emerging Infectious Diseases* 17(1):7–15.
251. Schauer, Roland. 2016. 'Sialic Acids as Link to Japanese Scientists'. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* 92(4):109–20.
252. Schauer, Roland, G. Vinayaga Srinivasan, Bernadette Coddeville, Jean Pierre Zanetta, and Yann Guérardel. 2009. 'Low Incidence of N-Glycolylneuraminic Acid in Birds and Reptiles and Its Absence in the Platypus'. *Carbohydrate Research* 344(12):1494–1500.
253. Scheutz, Flemming, Louise D. Teel, Lothar Beutin, D. Pierard, Glenn Buvens, Helge Karch, Alexander Mellmann, Alfredo Caprioli, Rosangela Tozzoli, Stefano Morabito, Nancy A. Strockbine, Angela R. Melton-Celsa, Maria Sanchez, Søren Persson, and Alison D. O'Brien. 2012. 'Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature'. *Journal of Clinical Microbiology* 50(9):2951–63.
254. Schmidt, Herbert, Jürgen Scheef, Stefano Morabito, Alfredo Caprioli, Lothar H. Wieler, and Helge Karch. 2000. 'A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from Escherichia Coli Isolated from Pigeons'. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3):1205–8.
255. Schmidt, Herbert, Jürgen Scheef, Stefano Morabito, Alfredo Caprioli, Lothar H. Wieler, and Helge Karch. 2000. 'A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from Escherichia Coli Isolated from Pigeons'. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3):1205–8.
256. Schnaar, Ronald L. and Taroh Kinoshita. 2017. 'Glycosphingolipids'. *Essentials of Glycobiology* 5:1–12.
257. Schoeni, J. L. and M. P. Doyle. 1994. 'Variable Colonization of Chickens Perorally Inoculated with Escherichia Coli O157:H7 and Subsequent Contamination of Eggs'. *Applied and Environmental Microbiology* 60(8):2958–62.
258. Schüller, Stephanie. 2011. 'Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium'. *Toxins* 3:626–39.
259. Segurel, L., Emma E. Thompson, Timothée Flutre, Jessica Lovstad, Aarti Venkat, Susan W. Margulis, Jill Moyse, Steve Ross, Kathryn Gamble, Guy Sella, Carole Ober, and Molly Przeworski. 2012. 'The ABO Blood Group Is a Trans-Species Polymorphism in Primates'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(45):18493–98.
260. Seleem, Aya, Maha A. Sabry, and Khaled A. Abdel-Moein. 2021. 'Migratory Birds as a Potential Overseas Transmitter of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli'. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 9(1):52–58.
261. Shapiro, Michael D., Zev Kronenberg, Cai Li, Eric T. Domyan, Hailin Pan, Michael Campbell, Hao Tan, Chad D. Huff, Haofu Hu, Anna I. Vickrey, Sandra C. A. Nielsen, Sydney A. Stringham, Hao Hu, Eske Willerslev, M. T. P. Gilbert, Mark Yandell, Guojie Zhang, and Jun Wang. 2013. 'Genomic Diversity and Evolution of the Head Crest in the Rock Pigeon'. *Science*.
262. Shaz, Beth H. 2009. 'Lewis, I and P Blood Group Systems'. *Transfusion Medicine and Hemostasis* 139–44.
263. Shi, Zhen, Kotaro Fujii, Kyle M. Kovary, Naomi R. Genuth, Hannes L. Röst, Mary N. Teruel, and Maria Barna. 2017. 'Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of MRNAs Genome-Wide'. *Molecular Cell* 67(1):71–83.e7.
264. Shiga, Kiyoshi. 1898. 'Ueber Den Erreger Der Dysenterie in Japan, Vorläufige Mitteilung.' *Zentralbl Bakteriol Microbiol Hyg* 23:599–600.
265. Shrimal, Shiteshu, Natalia A. Cherepanova, and Reid Gilmore. 2015. 'Cotranslational and Posttranslocational N-Glycosylation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum'. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41:71–78.
266. Silva, Christopher J., David L. Brandon, Craig B. Skinner, and Xiaohua He. 2017. *Shiga Toxins*. Cham: Springer International Publishing.

267. Smith, Daniel C., Daniel J. Silience, Thomas Falguières, Rosemary M. Jarvis, Ludger Johannes, J. Michael Lord, Frances M. Platt, and Lynne M. Roberts. 2006. 'The Association of Shiga-like Toxin with Detergent-Resistant Membranes Is Modulated by Glucosylceramide and Is an Essential Requirement in the Endoplasmic Reticulum for a Cytotoxic Effect'. *Molecular Biology of the Cell* 17(3):1375–87.
268. Söderqvist, Karin, Anna Karin Rosberg, Sofia Boqvist, Beatrix Alsanus, Lars Mogren, and Ivar Vågsholm. 2019. 'Season and Species: Two Possible Hurdles for Reducing the Food Safety Risk of Escherichia Coli O157 Contamination of Leafy Vegetables'. *Journal of Food Protection* 82(2):247–55.
269. Spiro, Robert G. 2002. 'Protein Glycosylation: Nature, Distribution, Enzymatic Formation, and Disease Implications of Glycopeptide Bonds'. *Glycobiology* 12(4).
270. Springer, Stevan A. and Pascal Gagneux. 2016. 'Glycomics: Revealing the Dynamic Ecology and Evolution of Sugar Molecules HHS Public Access'. *J Proteomics* 135:90–100.
271. Ståhl, Anne-lie, Lisa Sartz, Anders Nelsson, Zivile D. Békássy, and Diana Karpman. 2009. 'Shiga Toxin and Lipopolysaccharide Induce Platelet-Leukocyte Aggregates and Tissue Factor Release, a Thrombotic Mechanism in Hemolytic Uremic Syndrome' edited by S. Bereswill. *PLoS ONE* 4(9):e6990.
272. Ståhl, Anne lie, Ida Arvidsson, Karl E. Johansson, Milan Chromek, Johan Rebetz, Sebastian Loos, Ann Charlotte Kristoffersson, Zivile D. Békássy, Matthias Mörgelin, and Diana Karpman. 2015. 'A Novel Mechanism of Bacterial Toxin Transfer within Host Blood Cell-Derived Microvesicles'. *PLoS Pathogens* 11(2).
273. States, David J. and Warren Gish. 1994. 'Combined Use of Sequence Similarity and Codon Bias for Coding Region Identification'. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 1(1):39–50.
274. Steil, Daniel, Robert Bonse, Iris Meisen, Gottfried Pohlentz, German Vallejo, Helge Karch, and Johannes Müthing. 2016. 'A Topographical Atlas of Shiga Toxin 2e Receptor Distribution in the Tissues of Weaned Piglets'. *Toxins* 8(12).
275. Stenfelt, Linn, Julia S. Westman, Åsa Hellberg, and Martin L. Olsson. 2019. 'The P1 Histo-Blood Group Antigen Is Present on Human Red Blood Cell Glycoproteins'. *Transfusion*.
276. Stockklauser, Clemens, Anne Christine Klotter, Nicole Dickemann, Isabelle N. Kuhlee, Christin M. Duffert, Carolin Kerber, Niels H. Gehring, and Andreas E. Kulozik. 2015. 'The Thrombopoietin Receptor P106L Mutation Functionally Separates Receptor Signaling Activity from Thrombopoietin Homeostasis'. *Blood* 125(7):1159–69.
277. Strecker, Gerard, Jean-Michel Wieruszkeski, Jean-Claude Michalski, Catherine Alonso, Yves Leroy, Benoni Boilly, And Jean Montreuil. 1992. 'Primary Structure of Neutral and Acidic Oligosaccharide-Alditols Derived from the Jelly Coat of the Mexican Axolotl. Occurrence of Oligosaccharides with Fucosyl(Alpha1-3)Fucosyl(Alpha1-4)-3-Deoxy-d-Glycero-d-Galacto-Nonulosonic Acid and Galactosyl(Alpha1-'. *European Journal of Biochemistry* 207(3):995–1002.
278. Suchanowska, Anna and Marcin Czerwiński. 2009. 'Why Humans and Catarrhini Lack the Gal α 1-3Gal Epitope, Related to Xenograft Rejection?' *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 63:250–57.
279. Suchanowska, Anna, Radoslaw Kaczmarek, Maria Duk, Jolanta Lukasiewicz, Dorota Smolarek, Edyta Majorczyk, Ewa Jaskiewicz, Anna Laskowska, Kazimiera Wasniowska, Magdalena Grodecka, Elwira Lisowska, and Marcin Czerwinski. 2012. 'A Single Point Mutation in the Gene Encoding Gb3/CD77 Synthase Causes a Rare Inherited Polyagglutination Syndrome'. *Journal of Biological Chemistry*.
280. Sun, Angela. 2018. 'Lysosomal Storage Disease Overview'. *Annals of Translational Medicine* 6(24):476.-476.
281. Suzuki, Noriko. 2019. 'Glycan Diversity in the Course of Vertebrate Evolution'. *Glycobiology* 29(9):625–44.
282. Suzuki, Noriko, Kay Hooi Khoo, Chin Mei Chen, Hao Chia Chen, and Yuan C. Lee. 2003. 'N-Glycan Structures of Pigeon IgG: A Major Serum Glycoprotein Containing Gal α 1-4Gal Termini'. *Journal of Biological Chemistry*.
283. Suzuki, Noriko, Michael Laskowski, and Yuan C. Lee. 2004. 'Phylogenetic Expression of Gal α 1-4Gal on Avian Glycoproteins: Glycan Differentiation Inscribed in the Early History of Modern Birds'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(24):9023–28.
284. Suzuki, Noriko, Michael Laskowski, and Yuan C. Lee. 2006. 'Tracing the History of Gal α 1-4Gal on Glycoproteins in Modern Birds'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*

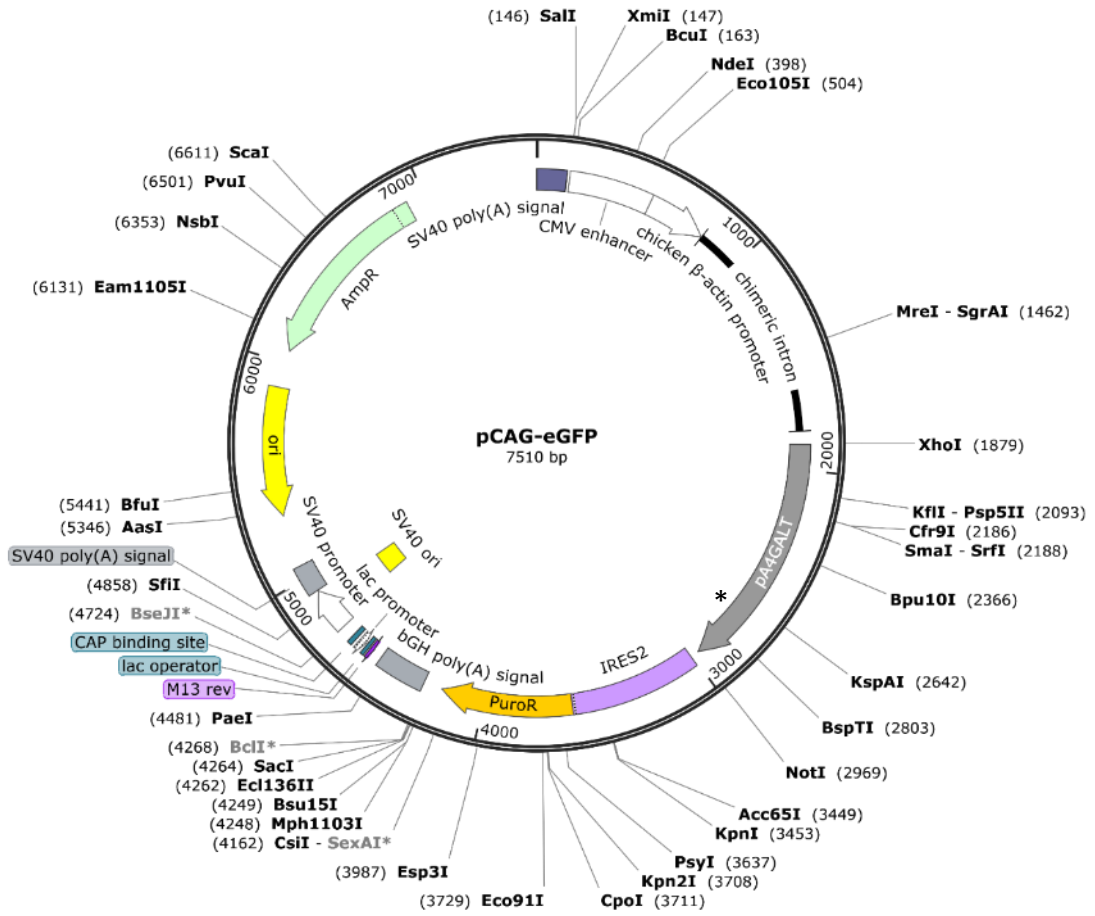
- 1760(4):538–46.
285. Suzuki, Noriko, Daisuke Nawa, and Kazuo Yamamoto. 2011. 'Distinct Expression Profiles of UDP-Galactose: β -D-Galactoside A1,4-Galactosyltransferase and UDP-Galactose: β -D-Galactoside B1,4-Galactosyltransferase in Pigeon, Ostrich and Chicken'. *Glycobiology*.
286. Suzuki, Noriko, Tseng Hsiung Su, Sze Wei Wu, Kazuo Yamamoto, Kay Hooi Khoo, and Yuan C. Lee. 2009. 'Structural Analysis of N-Glycans from Gull Egg White Glycoproteins and Egg Yolk IgG'. *Glycobiology*.
287. Suzuki, Noriko and Kazuo Yamamoto. 2010. 'Molecular Cloning of Pigeon UDP-Galactose: β -D-Galactoside A1,4-Galactosyltransferase and UDP-Galactose: β -D-Galactoside B1,4-Galactosyltransferase, Two Novel Enzymes Catalyzing the Formation of Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc Sequence'. *Journal of Biological Chemistry*.
288. Suzuki, Yuichiro, Mihoko Sutoh, Shingo Hatakeyama, Kazuyuki Mori, Hayato Yamamoto, Takuya Koie, Hisao Saitoh, Kanemitsu Yamaya, Tomihisa Funyu, Tomonori Habuchi, Yoichi Arai, Minoru Fukuda, Chikara Ohyama, and Shigeru Tsuboi. 2012. 'MUC1 Carrying Core 2 O-Glycans Functions as a Molecular Shield against NK Cell Attack, Promoting Bladder Tumor Metastasis'. *International Journal of Oncology* 40(6):1831–38.
289. Szymczak-Kulus, Katarzyna, Radosław Kaczmarek, Maria Duk, Krzysztof Mikołajczyk, Agata Zerka, Anna Bereznicka, Mariusz Olczak, and Marcin Czerwinski. 2016. 'Human A1,4-Galactosyltransferase (Gb3/CD77 Synthase): Expression in Insect Cells, Properties, Role of Glycans'. P. New Biotechnology Volume: 33, S123 in. ECB 2016, European Congress of Biotechnology, Krakow.
290. Szymczak-Kulus, Katarzyna, Sascha Weidler, Anna Bereznicka, Krzysztof Mikołajczyk, Radosław Kaczmarek, Bartosz Bednarz, Tao Zhang, Anna Urbaniak, Mariusz Olczak, Enoch Y. Park, Edyta Majorczyk, Katarzyna Kapczynska, Jolanta Lukasiewicz, Manfred Wuhrer, Carlo Unverzagt, and Marcin Czerwinski. 2021. 'Human Gb3/CD77 Synthase Produces P1 Glycotope-Capped N-Glycans, Which Mediate Shiga Toxin 1 but Not Shiga Toxin 2 Cell Entry'. *Journal of Biological Chemistry*.
291. Takahashi, Noriko, K. H. Khoo, Noriko Suzuki, J. R. Johnson, and Y. C. Lee. 2001. 'N-Glycan Structures from the Major Glycoproteins of Pigeon Egg White'. *Journal of Biological Chemistry*.
292. Tam, Patty, Radhia Mahfoud, Anita Nutikka, Aye Aye Khine, Beth Binnington, Paul Paroutis, and Clifford Lingwood. 2008. 'Differential Intracellular Transport and Binding of Verotoxin 1 and Verotoxin 2 to Globotriaosylceramide-Containing Lipid Assemblies'. *Journal of Cellular Physiology* 216(3):750–63.
293. Tarr, Phillip I., Carrie A. Gordon, and Wayne L. Chandler. 2005. 'Shiga-Toxin-Producing Escherichia Coli and Haemolytic Uraemic Syndrome'. *The Lancet* 365(9464):1073–86.
294. Taylor, R. L., Z. Medarova, and W. E. Briles. 2016. 'Immune Effects of Chicken Non-MHC Alloantigens'. *Poultry Science* 95(2):447–57.
295. Terajima, Jun, Sunao Iyoda, Makoto Ohnishi, and Haruo Watanabe. 2014. 'Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia Coli in Japan'. *Microbiology Spectrum* 2(5).
296. Thompson, Andrew J., Robert P. de Vries, and James C. Paulson. 2019. 'Virus Recognition of Glycan Receptors'. *Current Opinion in Virology* 34:117–29.
297. Thuresson, Britt, Julia S. Westman, and Martin L. Olsson. 2011. 'Identification of a Novel A4GALT Exon Reveals the Genetic Basis of the P1/P2 Histo-Blood Groups.' *Blood* 117(2):678–87.
298. Tian, E. and Kelly G. Ten Hagen. 2009. 'Recent Insights into the Biological Roles of Mucin-Type O-Glycosylation'. *Glycoconjugate Journal* 26(3):325–34.
299. Togayachi, Akira, Tomohiro Akashima, Reiko Ookubo, Takashi Kudo, Shoko Nishihara, Hiroko Iwasaki, Ayumi Natsume, Hiroyuki Mio, Jin Ichi Inokuchi, Tatsuro Irimura, Katsutoshi Sasaki, and Hisashi Narimatsu. 2001. 'Molecular Cloning and Characterization of UDP-GlcNAc:Lactosylceramide Beta 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase (Beta 3Gn-T5), an Essential Enzyme for the Expression of HNK-1 and Lewis X Epitopes on Glycolipids'. *The Journal of Biological Chemistry* 276(25):22032–40.
300. Togayachi, Akira, Yuko Kozono, Atsushi Kuno, Takashi Ohkura, Takashi Sato, Jun Hirabayashi, Yuzuru Ikehara, and Hisashi Narimatsu. 2010. 'B3GnT2 (B3GNT2), a Major Poly lactosamine Synthase: Analysis of B3gnt2-Deficient Mice'. *Methods in Enzymology* 479(C):185–204.
301. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. 'Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
302. Tsiodras, Sotirios, Theodoros Kelesidis, Iosif Kelesidis, Ulf Bauchinger, and Matthew E. Falagas.

2008. 'Human Infections Associated with Wild Birds'. *Journal of Infection* 56:83–98.
303. Tsutsuki, Hiroyasu, Kohei Ogura, Joel Moss, and Kinnosuke Yahiro. 2020. 'Host Response to the Subtilase Cytotoxin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic Escherichia Coli'. *Microbiology and Immunology* 64(10):657–65.
304. Turcot-Dubois, Anne Laure, Béatrice Le Moullac-Vaidye, Stéphanie Despiau, Francis Roubinet, Nicolai Bovin, Jacques Le Pendu, and Antoine Blancher. 2007. 'Long-Term Evolution of the CAZY Glycosyltransferase 6 (ABO) Gene Family from Fishes to Mammals--a Birth-and-Death Evolution Model'. *Glycobiology* 17(5):516–28.
- 305.Unione, Luca, Ana Gimeno, Pablo Valverde, Ilaria Calloni, Helena Coelho, Stefania Mirabella, Ana Poveda, Ana Arda, and Jesus Jimenez-Barbero. 2017. 'Glycans in Infectious Diseases. A Molecular Recognition Perspective'. *Current Medicinal Chemistry* 24(36).
306. Utratna, Marta, Heidi Annuk, Jared Q. Gerlach, Yuan C. Lee, Marian Kane, Michelle Kilcoyne, and Lokesh Joshi. 2017. 'Rapid Screening for Specific Glycosylation and Pathogen Interactions on a 78 Species Avian Egg White Glycoprotein Microarray'. *Scientific Reports* 7(1):6477.
307. Varki, Ajit, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Hudson H. Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R. Bertozzi, Gerald W. Hart, and Marilyn E. Etzler, eds. 2009. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
308. Varki, Ajit, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Pamela Stanley, Gerald W. Hart, Markus Aebi, Alan G. Darvill, Taroh Kinoshita, Nicolle H. Packer, James H. Prestegard, Ronald L. Schnaar, and Peter H. Seeberger. 2017. *Essentials of Glycobiology, Third Edition*.
309. Viswanathan, Karthik, Aarthi Chandrasekaran, Aravind Srinivasan, Rahul Raman, V. Sasisekharan, and Ram Sasisekharan. 2010. 'Glycans as Receptors for Influenza Pathogenesis'. *Glycoconjugate Journal* 27(6):561–70.
310. Wallace, J. S., T. Cheasty, and K. Jones. 1997. 'Isolation of Vero Cytotoxin-Producing Escherichia Coli O157 from Wild Birds'. *Journal of Applied Microbiology* 82(3):399–404.
311. Wang, Wei, Tianmu Zhang, Chunyan Wu, Shanshan Wang, Yuxiang Wang, Hui Li, and Ning Wang. 2017. 'Immortalization of Chicken Preadipocytes by Retroviral Transduction of Chicken TERT and TR'. *PLoS One* 12(5).
312. Wani, S. A., I. Samanta, M. A. Bhat, and Y. Nishikawa. 2004. 'Investigation of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Avian Species in India'. *Letters in Applied Microbiology* 39(5):389–94.
313. Wardzala, Casia L., Amanda M. Wood, David M. Belnap, and Jessica R. Kramer. 2022. 'Mucins Inhibit Coronavirus Infection in a Glycan-Dependent Manner'. *ACS Central Science* acscentsci.1c01369.
314. Welch, Lawrence G. and Sean Munro. 2019. 'A Tale of Short Tails, through Thick and Thin: Investigating the Sorting Mechanisms of Golgi Enzymes'. *FEBS Letters* 593(17):2452–65.
315. Westman, Julia S., John Benktander, Jill R. Storry, Thierry Peyrard, Annika K. Hult, Åsa Hellberg, Susann Teneberg, and Martin L. Olsson. 2015. 'Identification of the Molecular and Genetic Basis of PX2, a Glycosphingolipid Blood Group Antigen Lacking on Globoside-Deficient Erythrocytes'. *The Journal of Biological Chemistry* 290(30):18505–18.
316. Westman, Julia S., Linn Stenfelt, Karina Vidovic, Mattias Möller, Åsa Hellberg, Sven Kjellström, and Martin L. Olsson. 2018. 'Allele-Selective RUNX1 Binding Regulates P1 Blood Group Status by Transcriptional Control of A4GALT'. *Blood* 131(14):1611–16.
317. Wieruszkeski, J. M., J. C. Michalski, J. Montreuil, G. Strecker, J. Peter-Katalinic, H. Egge, H. van Halbeek, J. H. Mutsaers, and J. F. Vliegenthart. 1987. 'Structure of the Monosialyl Oligosaccharides Derived from Salivary Gland Mucin Glycoproteins of the Chinese Swiftlet (Genus Collocalia). Characterization of Novel Types of Extended Core Structure, Gal Beta(1----3)[GlcNAc Beta(1----6)] GalNAc Alpha(1----3)GalNAc(-OI), and of Chain Termination, [Gal Alpha(1----4)]0-1[Gal Beta(1----4)]2GlcNAc Beta(1----)'. *The Journal of Biological Chemistry* 262(14):6650–57.
318. Williams, Gavin J., Changsheng Zhang, and Jon S. Thorson. 2007. 'Expanding the Promiscuity of a Natural-Product Glycosyltransferase by Directed Evolution'. *Nature Chemical Biology* 3(10):657–62.
319. Williams, M. L., D. L. Pearl, and J. T. LeJeune. 2011. 'Multiple-Locus Variable-Nucleotide Tandem Repeat Subtype Analysis Implicates European Starlings as Biological Vectors for Escherichia Coli O157:H7 in Ohio, USA'. *Journal of Applied Microbiology* 111(4):982–88.
320. Williams Smith, H., P. Green, and Z. Parsell. 1983. 'Vero Cell Toxins in Escherichia Coli and Related Bacteria: Transfer by Phage and Conjugation and Toxic Action in Laboratory Animals, Chickens and Pigs'. *Journal of General Microbiology* 129(10):3121–37.
321. Wu, Qizheng, Hui Zhong, Yafei Zhai, Yanjiong Jia, Zhinan Yin, Min Chen, Hengwen Yang, and George

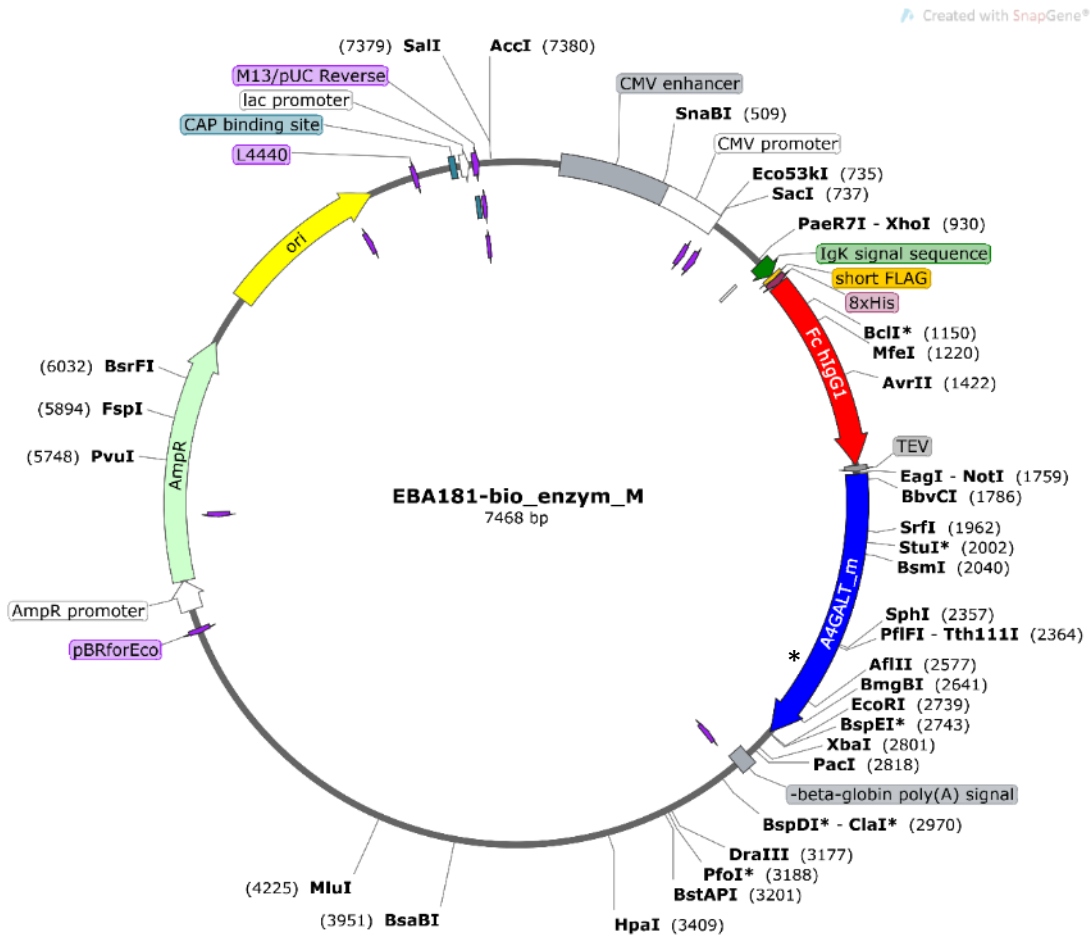
- Wang. 2018. 'Gut Microbiota Have Blood Types as Human'. *Science Bulletin* 63:1311–13.
322. Xu, Huaijin, Thomas Storch, Min Yu, Sean P. Elliott, and David B. Haslam. 1999. 'Characterization of the Human Forssman Synthetase Gene. An Evolving Association between Glycolipid Synthesis and Host-Microbial Interactions'. *The Journal of Biological Chemistry* 274(41):29390–98.
323. Yahiro, Kinnosuke, Kohei Ogura, Yoshiyuki Goto, Sunao Iyoda, Tatsuya Kobayashi, Hiroki Takeuchi, Makoto Ohnishi, and Joel Moss. 2020. 'Subtilase Cytotoxin Induces a Novel Form of Lipocalin 2, Which Promotes Shiga-Toxigenic Escherichia Coli Survival'. *Scientific Reports* 10(1):1–15.
324. Yamamoto, Fumiichiro. 2017. 'Evolutionary Divergence of the ABO and GBGT1 Genes Specifying the ABO and FORS Blood Group Systems through Chromosomal Rearrangements'. *Scientific Reports* 7(1).
325. Yamamoto, Fumiichiro, Emili Cid, Miyako Yamamoto, Naruya Saitou, Jaume Bertranpetit, and Antoine Blancher. 2015. 'An Integrative Evolution Theory of Histo-Blood Group ABO and Related Genes'. *Scientific Reports* 4(1):6601.
326. Yang, Z., J. Bergström, and K. A. Karlsson. 1994. 'Glycoproteins with Gal Alpha 4Gal Are Absent from Human Erythrocyte Membranes, Indicating That Glycolipids Are the Sole Carriers of Blood Group P Activities'. *The Journal of Biological Chemistry* 269(20):14620–24.
327. Yeh, Chih-Chun, Ching-Jin Chang, Yuh-Ching Twu, Shu-Ting Hung, Yi-Jui Tsai, Jia-Ching Liao, Ji-Ting Huang, Yu-Hsin Kao, Sheng-Wei Lin, and Lung-Chih Yu. 2018. 'The Differential Expression of the Blood Group P 1 - A4GALT and P 2 - A4GALT Alleles Is Stimulated by the Transcription Factor Early Growth Response 1'. *Transfusion* 58(4):1054–64.
328. Yuan, Aiyun, Xiangyan Tang, and Jing Li. 2020. 'Centrosomes: Til O-GlcNAc Do Us Apart'. *Frontiers in Endocrinology* 11.
329. Yuan, Xiaotian and Dawei Xu. 2019. 'Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) in Action: Cross-Talking with Epigenetics'. *International Journal of Molecular Sciences* 20(13).
330. Yuri, Juliana, Saviolli, Marcos Paulo Vieira, Cunha, Maria Flávia, Lopes Guerra, Kinue Irino, José Luiz Catão-Dias, and Vania Maria De Carvalho. 2016. 'Free-Ranging Frigates (Fregata Magnificens) of the Southeast Coast of Brazil Harbor Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli Resistant to Antimicrobials'.
331. Zachara, Natasha, Yoshihiro Akimoto, and Gerald W. Hart. 2015. 'The O-GlcNAc Modification'. *Essentials of Glycobiology*.
332. Zhang, Hua, Fan Zhu, Tiandi Yang, Lei Ding, Meixian Zhou, Jingzhi Li, Stuart M. Haslam, Anne Dell, Heidi Erlandsen, and Hui Wu. 2014. 'The Highly Conserved Domain of Unknown Function 1792 Has a Distinct Glycosyltransferase Fold'. *Nature Communications* 5(1):4339.
333. Zhang, Wenlan, Martina Bielaszewska, Thorsten Kuczius, and Helge Karch. 2002. 'Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (Stx1c) in Escherichia Coli Strains Isolated from Humans'. *Journal of Clinical Microbiology* 40(4):1441–46.



11. SUPPLEMENT



Ryc. S1. Mapa wektora pCAG. Oznaczenia: pA4GAL1: sekwencja genu kodującej syntazę Gb3/CD77 P (GenBank: NG_007495.2); *: zamiennie wklonowano gen kodujący syntazę Gb3/CD77 M (GenBank: MN545843.1).



Ryc. S2. Mapa wektora EBA181-bio. Oznaczenia: *A4GALT_m*: sekwencja genu kodującej syntazę Gb3/CD77 M (bez części transbłonowej sekwencji); *: zamiennie wklonowano gen kodujący syntazę Gb3/CD77 P.

SUPPLEMENT

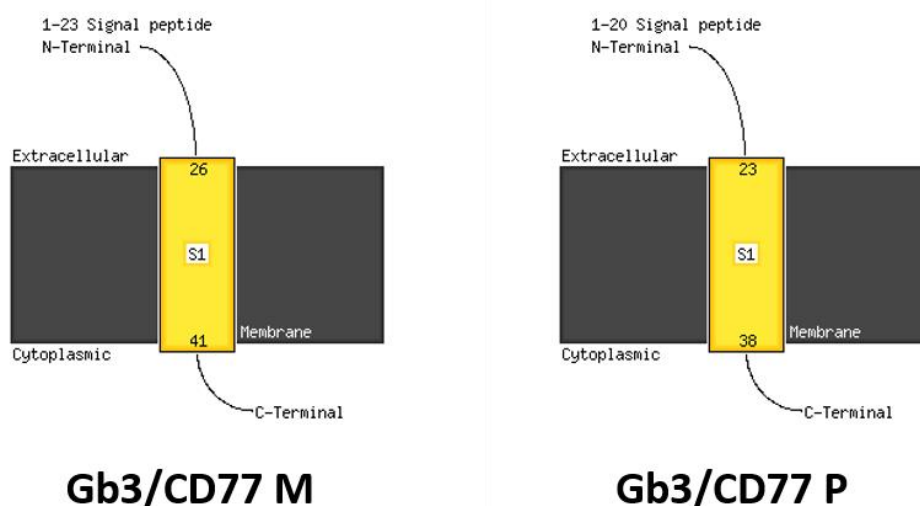
A4GALT P	ATGTCCAGCTACCTGCAAAAACTGACCACAGTGTGCCGAGCCACAGGCCTGGGGCTCTG	60
A4GALT M	ATGTCCAGCTACCTGCAAAAACTGACCACAGTGTGCCGAGCCACAGGCCTGGGGCTCTG *****	60
A4GALT P	TTTATCCTCATCATTTTCATTCTGCTCGTTGCCTCTGTTGTGTTCTACAGAGAAGTGGG	120
A4GALT M	TTTATCCTCATCATTTTCATTCTGCTCGTTGCCTCTGTTGTGTTCTACAGAGAAGTGGG *****	120
A4GALT P	AAGGACACTGAAGGCCAGCTCTACCACCTCGCCTACACAGAACAGGTCGAAGACTTTTTC	180
A4GALT M	AAGGACACTGAAGGCCAGCTCTATGGCTTGCTATACAAAACAGGTTAAACAGTTTTTC ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	180
A4GALT P	ACTTCTCCTCCCACACCATTGCTGGTGGTCCCTCCTTCCCAGGGGATGTGTGTTTTT	240
A4GALT M	GCTTCCCTCCCACACCATTGCTGGTGGTCCCTCCTTCCCAGGGGATGTGTGTTTTT * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	240
A4GALT P	GTGGAGACCTCTGAGCGAATTAACCAAGTTACCTGTTACAGTGCTCTGTGGAGTCAGCG	300
A4GALT M	GTGGAGACCTCTGAGCAAATAACCAAGTTACCTGTTACAGTGCTCTGTGGAGTCAGCG ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	300
A4GALT P	GCCCAGGCACACCTGGAACACGGGTTGTGGTGTCTATGAAAGGCCTGGCAAAGGGGAAT	360
A4GALT M	GCCCAGGCACACCTGGAACACGGGTTGTGGTGTCTATGAAAGGCCTGGCAAAGGGGAAT *****	360
A4GALT P	GTCTCATTGCCAGCCACTGGGCATTCTCATTGCTGAGCCGCTTCCC AACGTGGAGATC	420
A4GALT M	GTCTCATTGCCAGCCACTGGGCATTCTCATTGCTGAGCCGCTTCCC AACGTGGAGATC *****	420
A4GALT P	CAGCCCTGGACTTGGCAGAGCTTTTCTCAGGAACACCTCTGGCAAAGTGGTACTCACAG	480
A4GALT M	CGGCCCTGGACTTGGCAGAGCTTTTCTCAGGAACACCTCTGGCAAAGTGGTACTCACAG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	480
A4GALT P	CCTGAGCACCAGAAGGAACCTTATTTCTTCCCCTGCTGTCTGACGCCTGCAGAATTACC	540
A4GALT M	CCTGAGCACCAGAAGGAACCTTATTTCTTCCCCTGCTGTCTGACGCCTGCAGAATTACC ***** **	540
A4GALT P	ATCATGTGGAATTTGGTGGCATCTACCTGGACACAGACTTCATTGTAAGAACTTG	600
A4GALT M	ATCATGTGGAATTTGGTGGCATCTACCTGGACACAGACTTCATTGTAAGAACTTG *****	600
A4GALT P	AAGAACCCTACCAATGCCCTCGGGCTCCAGTCTCAGGATGACTGAATGGGGCTTCTTG	660
A4GALT M	AAGAACCCTACCAATGCCCTCGGGCTCCAGTCTCAGGATGACTGAATGGGGCTTCTTG ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	660
A4GALT P	TCTTTCAAACCGAAGCATGAGTTTATGGAACCTTGCATTGAGGACTTTGTGGACAACCTAC	720
A4GALT M	TCTTTCAAACCGAAGCATGAGTTTATGGAACCTTGCATTGAGGACTTTGTGGACAACCTAC ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	720
A4GALT P	AATGGGTGGATCTGGGACACAGGGCCAGAACTGTTAACACGTGTCTTCAAAGTGA	780
A4GALT M	AAAAGCTGGATCTGGGGCCACAGGGCCACAGCTACTAACACGTGTCTTCAAAGTGA ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	780
A4GALT P	TGCTCCATCAGTAATATCCAGAATGGTATGATCTGCAAAGGAGTGAGTGCTTCTCCTCT	840
A4GALT M	TGCTCTATCAGTAATATCCAAAGTGGTATGATCTGCAAAGGAGTGAGTGCTTCTCCTCT **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	840
A4GALT P	GATGCTCTTTATCCCATTCATGGCAGGACTGGAAGAAATATTTGAAGCAATCAGCTCC	900
A4GALT M	GATGCTCTTTATCCCATTCATGGCAGGACTGGAAGAAATATTTGAAGCAATCAGCTCC *****	900
A4GALT P	TCAGAGCTTACAATCTCTTAAGAACACCTATGCGGTGCACGTATGGAACAACTGAGC	960
A4GALT M	TCAGAGCTTACAATCTCTTAAGAACACGTATGCGGTGCATGTATGGAACAACTGAGC *****	960
A4GALT P	CACGATGCAAGGCTAGAGATCACGTCCCAGGCTTTGCTGGCTCAGCTGTATTCTCAGTTC	1020
A4GALT M	CACGATGCAAGGCTAGAGATCACGTCCCAGGCTTTGCTGGCTCAGCTGTATTCTCAGTTC *****	1020
A4GALT P	TGCCCTGCCACATCTGCACAGATGAAGAAGGACTTTGAAGAGCAGTCAAGGCCTGTAATG	1080
A4GALT M	TGCCCTGCCACATCTGCACAGATGAAGAAGGACTTTGAAGAGCAGTCAAGGCCTGTAATG ***** * ** * ** * ** * ** *	1080
A4GALT P	TGA 1083	
A4GALT M	TGA 1083	

Ryc. S3. Porównanie sekwencji nukleotydowych gołębianych genów *A4GALT* M (GenBank: MN545843.1) i P GenBank: NG_007495.2.

A

Gb3/CD77 P	MSSYLQKLTTVLPSHRPGALFILIISFLLVASVVFYQRTGKDTEGQLYHSPTQNRSEDFL	60
Gb3/CD77 M	MSSYLQKLTTVLPSHRPGALFILIISFLLVASVVFYQRTGKDAEGQLYGLSIQNRCKQFF	60
	*****:***** **.:**:	
Gb3/CD77 P	TSPPHTIAGGSPSPGDVFFVETSERIKPSYLFTCVESAARAHPGTRVVLMKGLAKGN	120
Gb3/CD77 M	ASPPHTIAGGPPSPGDVFFVETSEQTNPSYLFVSWESAARAHPGTRVVLMKGLAKGN	120
	:***** *****:***** *****	
Gb3/CD77 P	VSLPSHWAFSLLSRFPNVEIQPLDLAELFSGTPLAKWYSQPEHQEYFFPVLSDACRIT	180
Gb3/CD77 M	VSLPSHWAFSLLSFCFNMEIRPLDLAELFSGTPLAKWYSQPEHQEYFFPVLSDACRIA	180
	***** **.:**.:*****:*****:*****:	
Gb3/CD77 P	IMWKFGGIYLDTFIVLKNLKNLTNALGLQSQDVLNGAFLSFKPKHEFMELCIQDFVDNY	240
Gb3/CD77 M	IMWKFGGIYLDTFIVLKNLKNLTNALGIESQDVLNGAFLSFKPKHEFIELCMQDFVDNY	240
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Gb3/CD77 P	NGWIWAHQGPPELLTRVFKKLCISISNIQNGMICKGVSALPPDALYIPWQDWKCLFEAISS	300
Gb3/CD77 M	KSWIWHQGPQLLTRVFKKWCISISNIQSGMICKGVSALPPDALYIPWQDWKCLFEAISS	300
	:**.:**.:***** *****:*****:*****:*****:*****:*****	
Gb3/CD77 P	SELHNLLKNTYAVHVWNKLSHDARLEITSQALLAQLYSQFCPATSAQMKKDFEEQSRPVM	360
Gb3/CD77 M	SELHNLLKNTYAVHVWNKLSHDARLEITSQALLAQLYSQFCPATSAQMKKDLKSSQRTVM	360
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

B



Ryc. S4. Porównanie sekwencji aminokwasowej syntaz Gb3/CD77 M i P (Panel A). Kolorami oznaczono część przezbłonową wyznaczoną na podstawie analizy *in silico* za pomocą narzędzia Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Panel B).

A

Name: Sequence Length: 359
MSSYLQKLTTLVPSHRPGALFILIISFLLVASVVFYQRTGKDAEGQLVGLSIQNRCKQFFASPPHTIAGGSPSPGDVFF
VETSEQTNPSTVFTMSVESAARAHPTGTRVVVLMKGLAKGNVSLPSHIAFSLSCFPNMEIRPLDLAELFSGTPLAKHYSQ
PEHQKEPYFFPVLSDACRIAIIHMKFGGIYLDTFIVLKNLKNLNLALGIESQDVLNGAFSLFKPKHEFIELCMQDFVDNY
KSWIWHGQGPQLLTRVFKKNCISINIQSGHICKGVSALPPDALYPIPHQDHWKLFEAITSSSELHNLKNTYAVHVNKLS
HDARLEITSQALLAQLYSQFCPATSAQMKKDLKSSQPVH

.....N.....
.....N.....
.....N.....

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	88 NPSY	0.4931	(4/9)	-
Sequence	120 NVSL	0.7148	(9/9)	++
Sequence	202 NLTN	0.5441	(7/9)	+

B

Name: Sequence Length: 360
MSSYLQKLTTLVPSHRPGALFILIISFLLVASVVFYQRTGKDTGQLYHSPTQNRSEDFLTSPPHIAGGSPSPGDVFF
VETSERIKPSYLFVCSVESAARAHPTGTRVVVLMKGLAKGNVSLPSHIAFSLSRFPNVEIQPLDLAELFSGTPLAKHYSQ
PEHQKEPYFFPVLSDACRIAIIHMKFGGIYLDTFIVLKNLKNLNLALGIESQDVLNGAFSLFKPKHEFIELCMQDFVDNY
NGWIWAHQPELLTRVFKKNCISINIQSGHICKGVSALPPDALYPIPHQDHWKLFEAITSSSELHNLKNTYAVHVNKLS
HDARLEITSQALLAQLYSQFCPATSAQMKKDFEEQSRVH

.....N.....
.....N.....
.....N.....

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	54 NRSE	0.6036	(6/9)	++
Sequence	120 NVSL	0.7151	(9/9)	++
Sequence	202 NLTN	0.5324	(7/9)	+

C

#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment
MEWKA	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	3	3	0.5	3	0.5	#POSITIVE
MEWKA	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	15	15	0.0541654	15	0.0541654	
MEWKA	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	26	26	0.753601	26	0.753601	#POSITIVE
MEWKA	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	30	30	0.560602	30	0.560602	#POSITIVE
MEWKA	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	38	38	0.509312	38	0.509312	#POSITIVE
MEWKA	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	47	47	0.0458243	47	0.0458243	

#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	3	3	0.729904	3	0.729904	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	7	7	0.436822	7	0.436822	
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	14	14	0.539031	14	0.539031	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	16	16	0.646226	16	0.646226	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	20	20	0.35429	20	0.35429	
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	25	25	0.678753	25	0.678753	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	26	26	0.775504	26	0.775504	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	30	30	0.602664	30	0.602664	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	35	35	0.629537	35	0.629537	#POSITIVE
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	38	38	0.43808	38	0.43808	
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	47	47	0.0377719	47	0.0377719	
POCZTOWY	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	48	48	0.085791	48	0.085791	

Ryc. S5. Identyfikacja potencjalnych miejsc N- (Panel A i B) i O-glikozylacji (Panel C) dla gołębich enzymów: A) syntaza Gb3/CD77 M oraz B) syntaza Gb3/CD77 P. Analizę *in silico* wykonano z wykorzystaniem narzędzi internetowych NetNGlyc 1.0 oraz NetOGlyc 4.0. Panel A i B: na czerwono zaznaczono miejsca N-glikozylacji odpowiadające ludzkiemu homologowi; Panel C: na czerwono zaznaczono najbardziej prawdopodobne miejsca O-glikozylacji. Zieloną linią odznaczono reszty domen rozpuszczalnych dla obydwu enzymów. Oznaczenia: MEWKA: syntaza Gb3/CD77 M; POCZTOWY: syntaza Gb3/CD77 P.

> Syntaza Gb3/CD77 M Length: 323
QRTGKDAEGQLYGLSIQNRCKQFFASPPHTIAGGPPSPGDVFFVETSE

Total number of K in the example protein # 1: 22

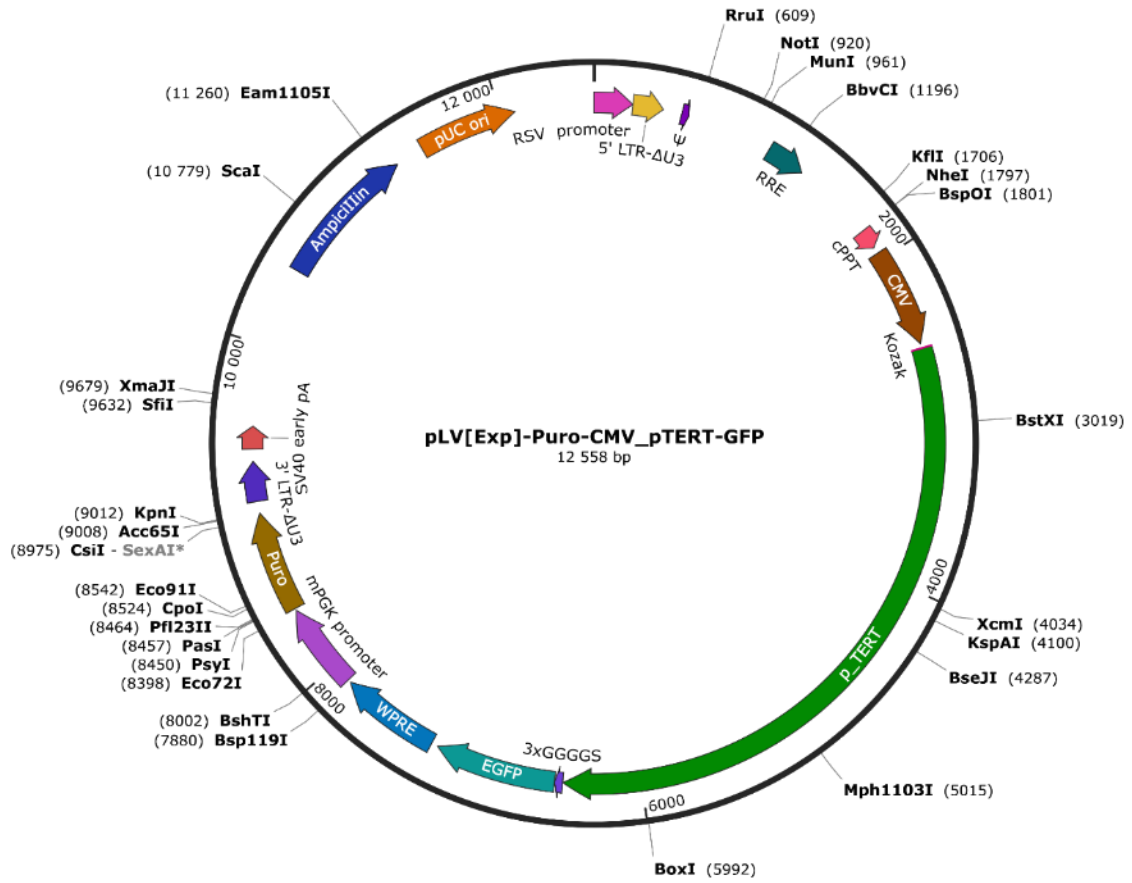
The K at location 5 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 21 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 78 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 82 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 120 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 129 was found to be Ubiquitination Site.
The K at location 148 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 162 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 165 was found to be Ubiquitination Site.

> Syntaza Gb3/CD77 P Length: 324
QRTGKDTEGQLYHSPQTQNRSEDFLTSPPHIAGGSPSPGDVFFVETSERIK

Total number of K in the example protein # 2: 20

The K at location 5 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 52 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 78 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 82 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 120 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 129 was found to be Ubiquitination Site.
The K at location 148 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 162 was found to be non-Ubiquitination Site.
The K at location 165 was found to be Ubiquitination Site.

Ryc. S6. Analiza *in silico* miejsc ubikwitynacji rozpuszczalnych domen katalitycznych gołębic syntaz Gb3/CD77 M i P.



Ryc. S7. Mapa wektora lentiwirusowego pLV [Exp]-Puro-CMV-pTERT-GFP. Oznaczenia: pTERT: sekwencja genu kodującego gołębi *TERT* (GenBank: XM_021297820.1).

Tabela S1. Bufory

Nazwa buforu	Skład	Producent odczynników
TBS	25 mM Tris-HCl, pH 7,6 140 mM NaCl pH 7,4	Serva POCh
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2 137 mM NaCl; 2 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 0,5 mM MgCl ₂ pH 7,2	POCh
Bufor węglanowy	50 mM Na ₂ CO ₃ 50 mM NaHCO ₃ pH 9,6	POCh
Bufor kakodylowy	50 mM kakodylan sodu pH 6,32	Sigma
Bufor do blottingu	25 mM Tris 192 mM glicyna 20% v/v methanol pH 8,3	Serva POCh
Bufor do wywoływania BCIP/NBT	0,1 M Tris-HCl 100 mM chlorku sodu 5 mM MgCl ₂ pH 9,5	Serva POCh

Tabela S2. Bufory do oczyszczania białek w warunkach natywnych

Nazwa buforu	Skład	Producent odczynników
Bufor zawieszający i płuczający	20 mM bufor fosforanowy (NaH_2PO_4), pH 7,2-7,4	POCh
Bufor elucyjny	0,1 M glicyna/HCl, pH 2,7	POCh Roth
Bufor neutralizujący	1 M Tris/HCl, pH 8,5	POCh Roth

Tabela S3. Skład roztworów do elektroforezy DNA

Nazwa roztworu	Skład	Producent odczynników
TAE	40 mM Tris-HCl 20 mM kwas octowy 1 mM EDTA pH 8,0	Serva Boehringer Mannheim
Bufor obciążający do próbek DNA	0,03% m/v błękit bromofenolowy 0,03% m/v cyjanol ksylenowy FF 60% v/v glicerol 1% m/v SDS 100 mM EDTA pH 7,6	Fermentas Vilnius Serva Boehringer Mannheim
Żel agarozowy	1% m/v agarozą Ultra-Pure 15 μ l/100 ml żelu Midori Green DNA Stain	Gibco Genetics

Tabela S4. Skład roztworów użytych do elektroforezy białek

Nazwa roztworu	Skład	Producent odczynników
Bufor elektrodowy (SDS-PAGE)	25 mM Tris 192 mM glicyna 0,1% m/v SDS; pH 8,3	Serva POCh
Bufor obciążający do nanoszenia próbek na żel poliakrylamidowy	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2% m/v SDS 10% v/v glicerol 5% v/v β-merkaptotanol 0,15% m/v błękit bromofenolowy	Serva Fermentas Vilnius BioRad Boehringer Mannheim
Bufor do żelu górnego (zagęszczającego)	125 mM Tris-HCl 0,1% m/v SDS; pH 6,8	Serva POCh
Bufor do żelu dolnego (rozdzielającego)	0,375 mM Tris-HCl 0,1% m/v SDS pH 8,8	Serva
Żel górny (zagęszczający)	1,2 ml buforu do żelu zagęszczającego (przepis powyżej) 0,7 ml 30% roztworu akrylamidu (29.2% (m/v) akrylamid, 0,8% (m/v) N, N'-metylenobis-akrylamid) 2,8 ml H ₂ O 48 μl 10% SDS 29 μl nadsiarczan amonu (APS) 9,6 μl N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Roth Serva
Żel dolny (rozdzielający)	3 ml buforu do żelu rozdzielającego (przepis powyżej) 5 ml 30% roztworu akrylamidu (29.2% (m/v) akrylamid, 0,8% (m/v) N, N'-metylenobis-akrylamid) 3,8 ml H ₂ O 120 μl 10% SDS 60 μl nadsiarczan amonu (APS) 6 μl N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Roth Serva

Tabela S5. Skład pożywek mikrobiologicznych

Nazwa pożywki	Skład	Producent odczynników
Super Broth (SB)	10 g MOPS 30 g pepton 20 g ekstrakt drożdżowy	Roth
SB stała	10 g MOPS 30 g pepton 20 g ekstrakt drożdżowy 15 g agar	Roth DIFCO Laboratories
Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)	20 g pepton 5 g ekstrakt drożdżowy 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM glukoza 10 mM NaCl pH 7,0	Roth POCh Polfa Polska

Tabela S6. Skład pożywek i odczynników używanych do hodowli i transfekcji komórek ssaczych

Nazwa odczynnika	Skład	Producent odczynników
DMEM High Glucose suplementowany (2102Ep)	500 ml DMEM High Glucose 10% FBS 2 mM glutaMAX 1X Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher Scientific
0.25% roztwór trypsyny- EDTA	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 5,6 mM glukoza 4,3 mM NaHCO ₃ 0,7 mM EDTA 0,014 mM czerwień fenolowa 0,25% trypsyna	Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN
DMEM F/12 suplementowany (komórki śródbłonnków ptasich)	500 ml DMEM F/12 20% FBS 1X Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher Scientific
Medium do mrożenia	Medium hodowlane suplementowane 10% DMSO	Thermo Fisher Scientific
Antybiotyki selekcyjny	Puromycyna (10mg/ml) (roztwory robocze od 0,1 do 0,44 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific
Bufor do transfekcji	20 mM HEPES 150 mM NaCl pH 7,5	Roth

12. SPIS ILUSTRACJI

Ryc. 1. Mechanizm reakcji glikozylotransferaz	24
Ryc. 2. Schemat przedstawiający ludzki gen <i>A4GALT</i>	25
Ryc. 3. Schemat budowy glikosfingolipidu	26
Ryc. 4. Struktury neutralnych cukrów rdzenia glikosfingolipidów i nazwy klas.....	27
Ryc. 5. Struktury N-glikanów powszechnie występujących u eukariontów.....	29
Ryc. 6. Schemat biosyntezy i dojrzewania N-glikanu	30
Ryc. 7. Rodzaje rdzeni O-glikanów	34
Ryc. 8. Szlak biosyntezy glikosfingolipidowych antygenów ludzkiego układu grupowego krwi P1PK ...	38
Ryc. 9. Struktury kwasów sjałowych	42
Ryc. 10. Struktury cukrowe antygenów ABH i Forssman	44
Ryc. 11. Struktura 3D toksyny Shiga typu 1 (Stx1) z <i>E. coli</i> O157:H7.	48
Ryc. 12. Schemat mechanizmu działania toksyn Shiga..	51
Ryc. 13. Analiza cytofluorometryczna wiązania przeciwciała anty-P1/P ^k (klon 650) do erytrocytów różnych gatunków ptaków.....	83
Ryc. 14. Analiza HPTLC frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z erytrocytów ptaków należących do ptaków współczesnych oraz bezgrzebieniowców.	84
Ryc. 15. Widma masowe MALDI TOF glikosfingolipidów neutralnych wyizolowanych z membran erytrocytów przedstawicieli ptaków współczesnych i bezgrzebieniowców.	87
Ryc. 16. Analiza metodą Western blotting lizatów białkowych otrzymanych z erytrocytów gołębi: pocztowego oraz ozdobnego i kury.....	88
Ryc. 17. Aglutynacja erytrocytów osób o różnych grupach krwi przez surowice ptaków różnych gatunków. Podano genotypy P1PK (P ¹ P ¹ , P ² P ²) oraz fenotypy ABO (A, B i O)	89
Ryc. 18. Analiza wiązania gołębiej surowicy do ludzkiej glikoforyny A w teście ELISA.	91
Ryc. 19. Tworzenie pseudonaczyń przez komórki śródbłonkowe	93
Ryc. 20. Analiza cytofluorometryczna wiązania przeciwciał anty-P1 (klon 650 i P3NIL100), anty-CD77 oraz podjednostki 1B toksyny Shiga (Stx1B)	94
Ryc. 21. HPTLC frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z pierwotnych komórek endotelialnych kury i gołębia.	95
Ryc. 22. Widma masowe MALDI-TOF glikosfingolipidów neutralnych wyizolowanych z pierwotnych komórek endotelialnych	96
Ryc. 23. Analiza metodą Western blotting lizatów białkowych otrzymanych z pierwotnych komórek endotelialnych kury i gołębia.	97
Ryc. 24. Żywotność pierwotnych ptasich komórek endotelialnych	98
Ryc. 25. Barwienie immunohistochemiczne hematoksyliną i detekcja antygenów P1 i P ^k oraz wiązania podjednostki 1B toksyny Stx	102
Ryc. 26. Trawienie różnicujące M/P dla różnych gatunków ptaków	104

Ryc. 27. Analiza cytofluorometryczna komórek linii 2102Ep transfekowanych wektorami kodującymi syntazę Gb3/CD77 M lub P	105
Ryc. 28. Analiza HPTLC frakcji neutralnych glikosfingolipidów wyizolowanych z komórek linii 2102Ep.	106
Ryc. 29. Widma masowe MALDI-TOF frakcji glikosfingolipidów neutralnych z komórek linii 2102Ep.	108
Ryc. 30. Analiza HPTLC glikosfingolipidów wyizolowanych z komórek linii 2102Ep i transfekowanych wektorami kodującymi enzym M lub P, które były metabolicznie znakowane ¹⁴ C-galaktozą	109
Ryc. 31. Analiza metodą Western blottingu lizatów otrzymanych z komórek linii 2102Ep	110
Ryc. 32. Ilościowa analiza transkryptów genów kodujących syntazę Gb3/CD77 M i P w komórkach linii 2102Ep.....	111
Ryc. 33. Żywotność komórek linii 2102Ep	112
Ryc. 34. Ilościowa analiza ekspresji genów kodujących enzym M i enzym P w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej gołębia pocztowego i ozdobnego.....	113
Ryc. 35. Ilościowa analiza ekspresji genów kodujących enzym M i enzym P w różnych tkankach u gołębia pocztowego..	114
Ryc. 36. Analiza Western blotting nadsączu z hodowli komórek linii EXPi293F™ transfekowanych wektorami kodującymi rozpuszczalne formy syntazy Gb3/CD77 M lub Gb3/CD77 P	116
Ryc. 37. Analiza Western blotting syntaz Gb3/CD77 M i P wyprodukowanych w komórkach Expi293 i poddanych działaniu PNGazy F i O-glikanazy.	117
Ryc. 38. Aktywność enzymatyczna oczyszczonych ludzkich i gołębic syntaz Gb3/CD77 wobec syntetycznych prekursorów oznaczona za pomocą testu ELISA	118
Ryc. 39. Schemat badań nad rolą ptasich syntaz Gb3/CD77 w oddziaływaniu z toksyną Shiga opisanych w niniejszej pracy	135
Ryc. S1. Mapa wektora pCAG.....	159
Ryc. S2. Mapa wektora EBA181-bio.	160
Ryc. S3. Porównanie sekwencji nukleotydowych gołębic genów A4GALT M i P	161
Ryc. S4. Porównanie sekwencji aminokwasowej syntaz Gb3/CD77 M i P.....	162
Ryc. S5. Identyfikacja potencjalnych miejsc N- i O-glikozylacji dla gołębic enzymów	163
Ryc. S6. Analiza <i>in silico</i> miejsc ubikwitynacji rozpuszczalnych domen katalitycznych gołębic syntaz Gb3/CD77 M i P	164
Ryc. S7. Mapa wektora lentiwirusowego pLV [Exp]-Puro-CMV-pTERT-GFP.....	165

13. SPIS TABEL

Tabela 1. Struktury antygenów grupowych krwi należących do układu grupowego krwi P1PK	37
Tabela 2. Fenotypy i genotypy układu grupowego P1PK	39
Tabela 3. Podobieństwo (%) sekwencji nukleotydowych 7 genów gołębiej syntazy Gb3/CD77	46
Tabela 4. Typy i subtypy toksyn Shiga	49
Tabela 5. Przeciwciała monoklonalne	61
Tabela 6. Przeciwciała poliklonalne.....	61
Tabela 7. Startery użyte do amplifikacji i sekwencjonowania gołębiego genu <i>A4GALT</i>	64
Tabela 8. Warunki reakcji PCR.....	64
Tabela 9. Sondy i startery użyte do analizy ekspresji genu <i>A4GALT</i>	67
Tabela 10. Warunki qPCR użyte dla analizy ekspresji genu <i>A4GALT</i>	67
Tabela 11. Startery użyte do amplifikacji i sekwencjonowania gołębiech genów <i>A4GALT_p</i> oraz <i>A4GALT_m</i>	69
Tabela 12. Warunki reakcji PCR.....	69
Tabela 13. Struktury syntetycznych glikokoniugatów wykorzystanych w tej pracy	76
Tabela 14. Narzędzia bioinformatyczne użyte do analizy wyników umieszczonych w pracy.....	80
Tabela 15. Wiązanie przeciwciała anty-P1/P ^k (klon 650) do erytrocytów różnych gatunków ptaków. Na czerwono oznaczono przedstawicieli rzędu Galliformes	81
Tabela 16. Test hamowania aglutynacji ludzkich erytrocytów przez gołębią surowicę	90
Tabela 17. Tkanki gołębia (G) i kury (K) użyte w detekcji immunohistochemicznej oraz w qPCR.....	114
Tabela 18. Porównanie analizy swoistości gołębiech syntaz Gb3/CD77 opisanych w piśmiennictwie i analizowanych w niniejszej pracy	126
Tabela 19. Porównanie dystrybucji antygenów P1/P ^k i aktywności enzymatycznej gołębiech syntaz Gb3/CD77 M i P opisanych w niniejszej pracy	127
Tabela S1. Bufory	166
Tabela S2. Bufory do oczyszczania białek w warunkach natywnych	167
Tabela S3. Skład roztworów do elektroforezy DNA	168
Tabela S4. Skład roztworów użytych do elektroforezy białek.....	169
Tabela S5. Skład pożywek mikrobiologicznych	170
Tabela S6. Skład pożywek i odczynników używanych do hodowli i transfekcji komórek ssaczych	171