

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk**



Karolina Ucieklak

**Wspólne elementy w strukturze antygenów cukrowych
bakterii z rodzaju *Bordetella* jako uniwersalne
składniki szczepionek**

Structural elements of carbohydrate antigens shared by bacteria of the genus
Bordetella as universal vaccine components

Promotor:
dr hab. Tomasz Niedziela

praca doktorska wykonana
w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

Wrocław, 2020 r.

“Zhoom! What was that? That was your life PhD, Mate! Oh, that was quick.”

Dr hab. Tomaszowi Niedzieli, promotorowi niniejszej pracy składam podziękowania, za każdą cenną poradę, liczne wskazówki merytoryczne, które pomogły mi w trakcie realizacji tej pracy, za ofiarowany mi czas i zaangażowanie, a także za wiele życzliwych słów.

Dr Sabinie Koj, za wszechstronną pomoc podczas realizacji i pisania tej pracy, a także za cierpliwość, poświęcony czas oraz za cenne uwagi przekazywane w dużym spokoju.

Współpracownikom za przychylną atmosferę w trakcie studiów doktoranckich i regularne dostawy cukrów prostych, w formach czasami skomplikowanych.

Wszystkim tym osobom, bez których pomocy, obecności i nastawienia ta praca nie mogłaby powstać.

Serdecznie dziękuję

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW	7
2. STRESZCZENIE	10
3. SUMMARY	14
4. WSTĘP.....	18
4.1. Krztusiec	18
4.2. Rodzaj <i>Bordetella</i>	20
4.2.1. Klaster <i>Bordetella bronchiseptica</i>	22
4.2.2. Przegląd epidemiologiczny i rozkład gatunkowy.....	25
4.2.3. Morfologia i diagnostyka bakterii z klastra <i>B. bronchiseptica</i>	26
4.2.4. Diagnostyka krztuśca.....	27
4.3. Antygeny <i>Bordetellae</i>	29
4.4. Szczepionki przeciwkrztuścowe.....	40
4.5. Neoglikokoniugaty i szczepionki glikokoniugatowe	43
4.6. Główne techniki stosowane w analizie antygenów cukrowych i glikokoniugatów	45
4.6.1. Spektrometria mas	45
4.6.2. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR	47
5. CEL PRACY.....	52
6. MATERIAŁY I METODY	53
6.1. Szczepy <i>Bordetella</i> i warunki hodowli.....	53
6.2. Metody preparatywne	55
6.2.1. Izolacja i oczyszczanie lipopolisacharydów oraz lipooligosacharydów	55
6.2.2. Otrzymywanie poli- i oligosacharydów z LPS.....	56
6.2.3. Izolacja egzopolisacharydów bakteryjnych.....	56
6.2.4. Redukcja egzopolisacharydów	56
6.2.5. Utlenianie oligosacharydów	57
6.2.6. Uzyskanie monomerycznej frakcji toksoidu tężca	57
6.2.7. Otrzymywanie neoglikokoniugatów	57
6.3. Metody immunochemiczne	58
6.3.1. Stosowane glikokoniugaty i surowice	58
6.3.2. Elektroforeza w warunkach denaturujących i immunoblotting.....	60
6.4. Metody analizy chemicznej	62
6.4.1. Częściowa hydroliza polisacharydów w kontrolowanych warunkach.....	62
6.4.2. Analiza cukrowa polisacharydów.....	62
6.4.3. Analiza metylacyjna polisacharydów	62
6.4.4. Redukcja estrów metylowych kwasów uronowych	63
6.4.5. Analiza absolutnej konfiguracji składników cukrowych techniką NMR.....	63
6.5. Metody instrumentalne	64
6.5.1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)	64
6.5.2. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)	65
6.5.3. Spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez jonizację typu elektrosprej (ESI).....	65

SPIS TREŚCI

6.5.4. Spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy z detekcją czasu przelotu jonów MALDI-TOF	65
6.5.5. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	67
6.6. Analiza mikroskopowa <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	67
7. WYNIKI.....	68
7.1. Szczepy <i>Bordetella</i> i warunki hodowli.....	68
7.2. Analiza heteropolisacharydowych fragmentów LPS <i>Bordetellae</i>.....	72
7.2.1. Izolacja lipopolisacharydów <i>Bordetellae</i>	72
7.2.2. Analiza serologiczna lipopolisacharydów wybranych bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	72
7.2.3. Oligosacharydy <i>Bordetellae</i> – strukturalne grupy reporterowe	79
7.2.4. Struktura lipopolisacharydu <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	93
7.3. Analiza egzopolisacharydów bakterii z klastra <i>B. bronchiseptica</i>.....	106
7.3.1. Izolacja egzopolisacharydów.....	106
7.3.2. Analiza Egzopolisacharydów	115
7.4. Nieklasyczne <i>Bordetellae</i> – porównawcza analiza egzopolisacharydów	142
7.5. Otrzymywanie i analiza glikokoniugatu BOS z toksoidem tężca	145
7.6. Ustalanie absolutnej konfiguracji składników cukrowych techniką spektroskopii NMR.....	151
8. DYSKUSJA.....	155
9. WNIOSKI	168
10. LITERATURA.....	172
11. SPIS RYCIN I TABEL.....	183
12. MATERIAŁY DODATKOWE	189

1. WYKAZ SKRÓTÓW

skrót	<i>rozwińnięcie angielskie</i>	rozwińnięcie polskie
A	<i>Absorbance</i>	absorbancja
Ab	<i>Antibody</i>	przeciwciało
Ag	<i>Antigen</i>	antygen
Ac	<i>Acetyl</i>	grupa acetylowa
ACN	<i>Acetonitrile</i>	acetonitryl
AP	<i>Alkaline Phosphatase</i>	fosfataza alkaliczna
AU	<i>Absorbance Units</i>	jednostki absorbancji
BCIP	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate</i>	fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolyłu
BOS	<i>Bordetella oligosaccharide</i>	
Bps	<i>Bordetella polysaccharide</i>	
CDC	<i>Centers For Disease Control And Prevention</i>	Centrum Kontroli i Prewencji Chorób
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>	dysocjacja indukowana zderzeniowo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>	spektroskopia korelacyjna
CPS	<i>Capsular polysaccharide</i>	polisacharyd kapsularny
Da	<i>Unified atomic mass unit, dalton</i>	zunifikowana jednostka masy atomowej, dalton
DHB	<i>2,5-Dihydroxybenzoic Acid</i>	kwask 2,5-dihydroksybenzoesowy
disach-HSA	<i>Disaccharide-Human Serum Albumin Conjugate</i>	koniugat disacharydu z ludzką albuminą surowiczą
DMF	<i>N,N-Dimethylformamide</i>	dimetyloformamid
DTaP, aP	<i>Acellular Vaccine for Diptheria-Tetanus-Pertussis</i>	bezkomórkowa szczepionka błoniczo-tężcowo-krztuścowa
dTap	<i>Acellular Vaccine for Diptheria-Tetanus-Pertussis</i>	bezkomórkowa szczepionka DTaP z obniżoną zawartością antygenów
DTP, DTwP, wP	<i>Vaccine for Diptheria Tetanus toxoid combined with whole Pertussis cells</i>	pełnokomórkowa szczepionka błoniczo-tężcowo-krztuścowa
EPS	<i>Exopolysacchride</i>	egzopolisacharyd
ESI-MS	<i>Electrospray-Ionization Mass Spectrometry</i>	spektrometria mas z jonizacją typu elektrosprej
ESI-MSⁿ	<i>Multiple Stage Electrospray-Ionization Mass Spectrometry</i>	wieloletapowa spektrometria mas z jonizacją typu elektrosprej
FA	<i>Formic Acid</i>	kwask mrówkowy
FHA	<i>Filamentous Hemagglutinin</i>	hemaglutynina włókienkowa
Fim	<i>Fimbriae</i>	aglutynogen, fimbrie
HCCA	<i>α-Cyano-4-Hydroxy-Cinnamic Acid</i>	kwask α-cyjano-4-hydroksycynamonowy
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>	ludzka albumina surowicy

WYKAZ SKRÓTÓW

HSQC-DEPT	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence –Distortionless Enhancement By Polarisation Transfer</i>	heterojądrowe jednokwantowe widmo korelacyjne-bezzakłócenio-we wzmo-cnienie sygnału poprzez transfer polaryzacji
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>	immunoglobuliny typu G
J	<i>Coupling Constant</i>	stała sprzężenia
Kdo	<i>3-Deoxy-D-Manno-oct-2-Ulosonic Acid</i>	kwask 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	chromatografia cieczowa
LOS	<i>Lipooligosaccharide</i>	lipooligosacharyd
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	lipopolisacharyd
[M+H]⁺	<i>Ion Molecule Charged Positively</i>	jon molekularny naładowany dodatnio
[M-H]⁻	<i>Ion Molecule Charged Negatively</i>	jon molekularny naładowany ujemnie
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization –Time Of Flight Mass Spectrometry</i>	spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy z detekcją czasu przelotu jonów
Me	<i>Methyl</i>	grupa metylowa
MPL	<i>Monophosphoryl Lipid A</i>	monofosforylowany lipid A
MS/MS	<i>Tandem MS</i>	fragmentacja metodą spektrometrii mas
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	spektrometria mas
-MS	<i>Mass Spectrometry Negative Ionization</i>	spektrometria mas w trybie polaryzacji ujemnej
+MS	<i>Mass Spectrometry Positive Ionization</i>	spektrometria mas w trybie polaryzacji dodatniej
M_w	<i>Molecular Weight</i>	masa cząsteczkowa
m/z	<i>Mass-To-Charge Ratio</i>	stosunek masy do ładunku
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>	błękit nitrotetrazolowy
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	magnetyczny rezonans jądrowy
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>	spektroskopia NMR wykorzystująca jądrowy efekt Overhausera
OS	<i>Oligosaccharide</i>	oligosacharyd, oligocukier
OS-PT	<i>Oligosaccharide-Pertussis Toxin Conjugate</i>	koniugat oligocukru z toksyną krztuśca
OS-TTd	<i>Oligosaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate</i>	koniugat oligocukru z toksoidem tężca
P	<i>Phosphate</i>	fosforan
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	sól fizjologiczna buforowana fosforanami
penta-PT	<i>Pentasaccharide-Pertussis Toxin conjugate</i>	koniugat pentasacharydu z toksyną krztuśca
penta-TTd	<i>Pentasaccharide-Tetanus Toxoid conjugate</i>	koniugat pentasacharydu z toksoidem tężca
PCM	<i>Polish Collection of Microorganisms</i>	Polska Kolekcja

WYKAZ SKRÓTÓW

PP	<i>Pyrophosphate</i>	Mikroorganizmów
PPEtn	<i>Ethanolamine Pyrophosphate</i>	pirofosforan
ppm	<i>Parts Per Million</i>	pirofosforyloetanolamina
PRN	<i>Pertactin</i>	części na milion
PS	<i>Polysaccharide</i>	pertaktyna
PT	<i>Pertussis Toxin</i>	polisacharyd
S	<i>Subunit</i>	toksyna krztuśca
SA	<i>3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid</i>	podjednostka
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	kwasy synapinowy
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	sól sodowa siarczanu dodecyłu
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	sączenie molekularne, filtracja żelowa
SM		elektroforeza w żelu poliakryloamidowym
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>	w warunkach denaturujących w obecności SDS
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>	sucha masa bakteryjna
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>	sól fizjologiczna buforowana TRIS
Th	<i>T Helper Cells</i>	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylenodiamina
THAP	<i>2',4',6-trihydroxyacetophenone</i>	kwasy trifluorooctowy
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>	limfocyt T pomocniczy
t_R	<i>Retention time</i>	trójhydroksyacetofenon
TRIS	<i>Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane</i>	spektroskopia korelacji całkowitej
TT	<i>Tetanus Toxin</i>	czas retencji
TTd	<i>Tetanus Toxoid</i>	tris(hydroksymetylo)aminometan
WHO	<i>World Health Organization</i>	toksyna tężca
ε	<i>Molar Extinction Coefficient</i>	toksoid tężcowy
1D NMR	<i>One Dimensional NMR</i>	Światowa Organizacja Zdrowia
2D NMR	<i>Two Dimensional NMR</i>	molowy współczynnik absorpcji
		jednowymiarowy NMR
		dwuwymiarowy NMR

2. STRESZCZENIE

Krztusiec jest wysoce zakaźną chorobą wieku dziecięcego, której czynnikiem etiologicznym jest bakteria *Bordetella pertussis*. Objawem patognomicznym jest silny, napadowy i bezproduktywny kaszel, pogarszający się w nocy i powodujący wymioty, bezdech oraz sinicę. Wśród zaszczepionych dzieci, nastolatków oraz dorosłych objawy mogą być znacznie łagodniejsze i mniej specyficzne, a więc trudniejsze do zdiagnozowania (WHO, 2014). Przed wprowadzeniem szczepionki, w Polsce corocznie diagnozowano kilkadziesiąt tysięcy przypadków krztuśca. Wprowadzenie szczepionki pełnokomórkowej (DTwP) oraz obowiązku szczepień okazało się skuteczną metodą zapobiegania zakażeniom. Ze względu na reaktogenność, wywoływaną obecnością lipopolisacharydu, szczepionki DTwP zostały częściowo lub całkowicie, zastąpione szczepionkami bezkomórkowymi (DTaP) zawierającymi oczyszczone białkowe antygeny bakteryjne. Jednak pomimo powszechności szczepień ochronnych obserwuje się wzrost zachorowań na krztusiec, nie tylko wśród najbardziej wrażliwej grupy - noworodków, ale również zaszczepionych nastolatków i dorosłych. Nowoczesne metody badawcze pozwalają zidentyfikować inne gatunki bakterii z rodzaju *Bordetella* wywołujące niezwykle podobne objawy chorobowe, tj. *B. parapertussis* oraz *B. holmesii* (Guthrie i in., 2010; Rodgers i in., 2013). Obecnie stosowane szczepionki nie zapewniają ochrony przed *B. holmesii*, która staje się drugim, pod względem zachorowalności, czynnikiem etiologicznym krztuśca. Niedoskonałość istniejących szczepionek jest przyczyną poszukiwań nowych antygenów szczepionkowych i powtórnego zainteresowania szczepionkami pełnokomórkowymi. Zupełnie innym podejściem jest skierowanie uwagi na niedoceniane antygeny cukrowe.

Bakteryjne polisacharydy można podzielić na 3 grupy. Pierwszą grupę tworzą lipopolisacharydy. LPS zbudowany jest z lipidu A, oligosacharydu rdzenia oraz antygeny O. Jest integralnym składnikiem osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych i indukuje powstawanie swoistych i bakteriobójczych przeciwciał (Rappuoli, 2004), wydaje się być idealnym antygenem szczepionkowym. Jego reaktogenność, wyklucza użycie LPS w natywnej formie. Jednak wyizolowane polisacharydowe fragmenty, przy zachowaniu właściwości antygenowych, tracą aktywność biologiczną. Szczepionki polisacharydowe rozwijane są od 50 lat, ale ich główną wadą jest to, że sam polisacharyd jako antygen T – niezależny, wywołuje słabą i krótkotrwałą odpowiedź immunologiczną. Cech antygeny T – zależnego nabiera jako glikokoniugat poprzez skoniugowanie z immunogennym

nośnikiem białkowym. Szczepionki glikokoniugatowe łączą w sobie właściwości antygenowe składników cukrowych jak i białkowych. Glikokoniugaty zawierające oligosacharydowe fragmenty LOS *B. pertussis* indukują produkcję przeciwciał bakteriobójczych (Koj i in., 2015). Bakterie należące do klastra *B. bronchiseptica* są blisko ze sobą spokrewnione, ale syntezują lipopolisacharydy różniące się w różnych segmentach. Wspólnych elementów poszukiwano w konserwatywnym ewolucyjnie OS rdzenia. W badaniach nad OS *Escherichia coli* wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko OS rdzenia szczepów szorstkich reagują krzyżowo z rdzeniami szczepów gładkich (Lukasiewicz i in., 2003). Dlatego niezmiernie istotne jest zidentyfikowanie wspólnych elementów antygenowych, których wyizolowane formy mogłyby stanowić składnik uniwersalnych szczepionek chroniących przed zakażeniami bakteriami z rodzaju *Bordetella*. Drugą grupę bakteryjnych glikanów, będących składnikami szczepionek, tworzą polisacharydy kapsularne (CPS). Ich rola polega na ochronie przed mechanizmami obronnymi gospodarza i ochronie komórki bakteryjnej przed wysuszeniem (Roberts, 1996). CPS z komórką związane są poprzez kotwicę lipidową. CPS wydzielany na zewnątrz bakterii zostaje przypisany do trzeciej grupy tzw. egzopolisacharydów (EPS). Według danych literaturowych niektóre *Bordetellae* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica*) produkują egzopolisacharyd Bps (ang. *Bordetella polysaccharide*), zbudowany z homopolimeru GlcNAc, który odgrywa istotną rolę w procesie wytwarzania biofilmu (Conover i in., 2010). Inne publikacje sugerują, że *B. pertussis* produkuje polisacharyd mikrokapsularny, prawdopodobnie zbudowany z homopolimeru GalNAcA, podobnie jak antygen Vi (Hoo i in., 2014; Neo i in., 2010). Jednak w żadnej ze wspomnianych prac nie zaprezentowano bezpośrednich analiz wyizolowanego EPS i CPS. W genomach *Bordetellae* zidentyfikowano geny odpowiedzialne za syntezę CPS, ale nikomu nie udało się dotąd ustalić czy polisacharydy kapsularne są rzeczywiście wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bordetella*. Te niejasności były przyczyną zainteresowania się tematem EPS oraz CPS u *Bordetellae*.

W zrealizowanej pracy przeprowadzono analizy strukturalne i serologiczne heteropolisacharydowych części LPS różnych gatunków *Bordetellae* (*B. pertussis* 186, *B. pertussis* 606, *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943). W pracy po raz pierwszy scharakteryzowano i opisano przesunięcia chemiczne dla oligosacharydu *B. pertussis* 606, które potwierdzają, że OS *B. pertussis* 606 jest nonasacharydem pozbawionym dystalnego trójcukru. Wyniki te potwierdza również brak reakcji krzyżowej z anty-glikokoniugatowymi surowicami (anty-penta-PT, anty-penta-

TTd i anty-disach-HSA) rozpoznającymi dystalny trójcukier dodekasacharydowego OS *B. pertussis* 186. Szczepy *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943 zidentyfikowano jako szczepy szorstkie, niesyntezyjące antygeny O. Minimalny OS *B. bronchiseptica* 530 i 1943 jest heptasacharydem. OS tych szczepów jest najkrótszym OS wśród analizowanych gatunków, co potwierdzają bardzo słabe reakcje krzyżowe z surowicami rozpoznającymi pełny OS *B. pertussis* 186 (anty-OS-TTd i anty-OS-PT). *B. parapertussis* 529 określono jako szczep gładki. Surowice anty-glikokoniugatowe (anty-penta-TTd i anty-disach-HSA) rozpoznają krzyżowo immunodominujący epitop OS *B. pertussis* 186 w LPS *B. parapertussis* 529, co sugeruje że w strukturze LPS *B. parapertussis* obecny jest dystalny trójcukier. W strukturach OS rdzenia *B. parapertussis* 529 wyróżniono dwie formy. Minimalny OS jest oktasacharydem, natomiast pełna struktura OS jest dodekasacharydem. Na podstawie przeprowadzonych badań dla posiadanych gatunków i szczepów minimalny OS rdzenia dla *Bordetellae* zdefiniowano jako heksasacharyd. Ustalono, że podstawowa struktura OS rdzenia jest zachowana pomiędzy gatunkami. Modyfikacje polegały na utracie niektórych reszt lub dodatkowym podstawieniu przez niecukrowe podstawniki. Ciekawą obserwacją jest fakt, że w trakcie analiz nie zidentyfikowano pentasacharydowego łącznika, do którego, według danych literaturowych, przyłączony jest antygen O (Preston i in., 2006). Pewnym wyjaśnieniem może być brak syntezy antygeny O przez posiadane szczepy *B. bronchiseptica*, ale tego rodzaju łącznik powinien być obecny w LPS *B. parapertussis*, która syntetyzuje antygen O.

W pracy ustalono po raz pierwszy strukturę OS rdzenia oraz antygeny O *B. holmesii* ATCC 51541, która jest nowym, ważnym czynnikiem etiologicznym krztuśca, a o której, z punktu widzenia poszukiwań nowych glikokoniugatowych szczepionek przeciwkrztuścowych, prawie nic nie wiadomo. Na podstawie analiz porównawczych widm NMR oraz MALDI-TOF MS ustalono, że OS *B. holmesii* jest identyczny z rdzeniem *B. pertussis* 606. OS jest nonasacharydem i w swojej strukturze pozbawiony jest dystalnego trójcukru, na co wskazywał również brak krzyżowych reakcji serologicznych z surowicami zawierającymi przeciwciała skierowane przeciwko immunodominującemu epitopowi *B. pertussis*. Przeprowadzone analizy technikami spektroskopii NMR, spektrometrii mas oraz metodami chemicznymi, pozwoliły ustalić strukturę antygeny O *B. holmesii* ATCC 51541, którego pentasacharydowa podjednostka ma masę 974,32 Da i zbudowana jest wg schematu: $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n$.

Ze względu na rozbieżne dane literaturowe dotyczące EPS wytwarzanych przez *Bordetellae* i brak danych z analiz strukturalnych przeprowadzono analizy EPS izolowanych z medium pohodowlanego badanych gatunków i szczepów *Bordetellae* w celu izolacji i identyfikacji tych glikanów. W medium pohodowlanym rozdzielanym na kolumnie filtracji żelowej wykryto długołańcuchowe polisacharydy, które zidentyfikowano jako dwa homopolimery glukozy podstawione w pozycjach 4 i 6 [\rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) i [\rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow]. Wykryto również krótszy egzooligosacharyd. Technikami spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas zidentyfikowano go jako nowy heksasacharyd o masie 1235,5 Da. Ze względu na jego odmienność od hipotetycznych struktur Bps i mikrokapsuły wprowadzono nową nazwę nieopisanego dotychczas egzooligosacharydu „*Bordetella oligosaccharide*” (BOS). BOS okazał się uniwersalny wśród wszystkich badanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Zdefiniowano jego strukturę jako α -GlcNac-(1 \rightarrow 4)- α -GalpNacAN-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)]- α -GalpNacAN-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNacA-(1 \rightarrow 3)- α/β -GlcNac. Na widmach NMR zarejestrowanych dla frakcji zawierającej BOS zidentyfikowano też sygnały -CH, -CH₂ i -CH₃ przypominające systemy spinowe kwasów tłuszczowych. Ich struktura nie została jeszcze ustalona, ale mogą one funkcjonować jako element kotwiczący BOS w zewnętrznej błonie osłony komórkowej bakterii. Na końcu redukującym BOS zidentyfikowano GlcNac w konfiguracji zarówno α i β , do której może być przyłączona lipidowa kotwica. Jednak nie udało się wskazać bezpośredniego połączenia między BOS, a ewentualną kotwicą, ponieważ nie zidentyfikowano frakcji zawierającej BOS połączonego z kotwicą lipidową.

Surowice anty-glikokoniugatowe (anty-penta-PT, anty-OS-PT i anty-disach-HSA) oraz surowice zawierające poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym *B. pertussis* (anty-SM Bp 186 i anty-SM Bp miks) rozpoznających LOS na powierzchni komórki wykazywały słabą reakcję krzyżową z BOS. W obu strukturach zidentyfikowano terminalną GlcNac, która może być epitopem odpowiedzialnym za krzyżowe rozpoznawanie struktur. Reakcje z surowicami na pełne komórki potwierdzają przypuszczenia, że BOS może być kapsułą. Również surowica do aglutynacji szkiełkowej anty-Vi, która wg danych literaturowych, rozpoznaje swoiście GalNacA tworzący mikrokapsułę, reaguje z BOS.

Poznanie właściwości antygenowych BOS, jego roli w kolonizacji i transmisji bakterii i możliwości zastosowania neoglikoniugatu BOS jako nowego potencjalnego składnika szczepionek przeciwwkrztuścowych o szerokim spektrum ochrony wymaga dalszych badań.

3. SUMMARY

Whooping cough is a highly contagious disease caused by *Bordetella pertussis*. A pathognomonic symptom of pertussis is a severe spasmodic and unproductive cough that worsens at night and is accompanied by vomiting, apnea and cyanosis. Among vaccinated children, adolescents and adults, the symptoms are milder and less specific, and therefore more difficult to diagnose (WHO 2014). In the pre-vaccination era, tens of thousands of pertussis cases were diagnosed each year in Poland. Whole-cell pertussis vaccine (DTwP) has been highly effective in reducing morbidity and mortality. However, DTwP vaccines are reactogenic as they contain lipopolysaccharide (LPS) and they have been partly or completely replaced, by acellular pertussis vaccines (DTaP) that instead contain purified bacterial protein antigens. In spite of the sustained high coverage of vaccinations, there is an increase of whooping cough in all age groups. New diagnostic methods allow to identify other *Bordetella* species that cause pertussis-like symptoms, i.e. *B. parapertussis* and *B. holmesii* (Guthrie *et al.* 2010; Rodgers *et al.* 2013). *B. holmesii* have become the second pertussis etiological factor, but the currently used vaccines do not provide a cross-protection. The imperfection of existing vaccines is the reason for development of improved and new components of vaccines against whooping cough. One of the novel approaches is to focus on surface carbohydrates antigens of *Bordetellae*.

Bacterial polysaccharides can be divided into 3 groups. The first group comprises of LPS which are composed of the lipid A, an oligosaccharide core and an O-antigen. LPS is an integral component of the outer membrane of Gram-negative bacteria and induces the production of specific and bactericidal antibodies (Rappuoli 2004). LPS seems to be an ideal vaccine antigen, but its reactogenicity excludes using it in its native form. LPS-derived polysaccharide fragments are devoid of endotoxic activity and still maintain antigenic properties. Polysaccharide vaccines have been developed for 50 years, but their main disadvantage is that the polysaccharide itself as a T-independent antigen induces a weak and short-lived immunity. Polysaccharides become T-dependent antigen by conjugation with an immunogenic protein carrier. Glycoconjugate vaccines combine the antigenic properties of carbohydrate and protein components. Glycoconjugates containing *B. pertussis* LOS-derived oligosaccharide fragments induce the production of bactericidal antibodies (Koj *et al.* 2015). Bacteria of the “*B. bronchiseptica* cluster” are closely related, but they produce different lipopolysaccharides, containing some highly conserved segments related to the core OS.

SUMMARY

Previously *Escherichia coli* OS studies have shown that antibodies directed against the OS core of rough-strains cross-react with smooth-strains cores (Lukasiewicz *et al.* 2003). Therefore, it is essential to identify common antigenic motifs that in the isolated forms could become components of universal vaccines protecting against *Bordetella* infections. The second group of bacterial glycans, which are also used as vaccine components, are capsular polysaccharides (CPS). CPS protect bacterial cells from the host defense mechanisms and from environmental conditions (Roberts 1996). CPS are bound to the cell via a lipid anchor. CPS molecules released into environment constitute the third group of so-called exopolysaccharides (EPS). According to published data, some *Bordetellae* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*) produce Bps exopolysaccharide (*Bordetella polysaccharide*), made of the GlcNAc homopolymer, which is supposed to play an important role in the biofilm development (Conover *et al.* 2010). Other publications suggest that *B. pertussis* produces a microcapsular polysaccharide, a form of the GalNAcA homopolymer that might resemble Vi antigen (Neo *et al.* 2010; Hoo *et al.* 2014). However, none of these publications presented direct analyses of the isolated EPS and CPS. The genes responsible for the CPS synthesis have been identified in the *Bordetellae* genomes, but to the date no one has been able to determine whether the capsular polysaccharides are actually produced by *Bordetella* species. These uncertainties were the reason for our interest in EPS and CPS structural features of *Bordetellae*.

In this study, structural and serological analyses of heteropolysaccharide parts of LPS among various *Bordetellae* species (*B. pertussis* 186, *B. pertussis* 606, *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* 530, and *B. bronchiseptica* 1943) were performed. This work identifies the structure and describes the chemical shifts for *B. pertussis* 606 oligosaccharide for the first time. The lack of cross-reactivity with anti-glycoconjugate sera (anti-penta-PT, anti-penta-TTd and anti-disach-HSA) recognizing the distal trisaccharide, confirms that the OS of *B. pertussis* 606 is a nonasaccharide devoid of distal trisaccharide. *B. bronchiseptica* 530 and *B. bronchiseptica* 1943 strains were identified as rough strains not synthesizing the O-antigen. Minimal OS of *B. bronchiseptica* 530 and 1943 is a heptasaccharide and is the shortest OS among the analysed species, which has also been confirmed by very weak cross-reactions with sera recognizing OS of *B. pertussis* 186 (anti-OS-TTd and anti-OS-PT). *B. parapertussis* 529 was defined as a smooth strain. Anti-glycoconjugate sera (anti-penta-TTd and anti-disach-HSA) cross-recognize the *B. pertussis* 186 immunodominant epitope in the LPS of *B. parapertussis* 529, suggesting that a distal trisaccharide is present in the

SUMMARY

B. parapertussis LPS structure. Two forms have been distinguished among structures of the OS core of *B. parapertussis* 529. Minimal OS is an octasaccharide, while the complete structure of OS is a dodecaccharide. The minimum OS core for *Bordetellae* was defined as a hexasaccharide. It has been established that the basic core OS structure is conserved among *Bordetella* species. The modifications included the loss of some residues or an additional substitution by non-sugar substituents. An interesting observation is the fact that during the performed analyses no pentasaccharide linker was identified. According to Preston et al. this linker attaches the O-antigen to OS (Preston et al. 2006). This can be explained by the lack of O-antigens in *B. bronchiseptica* strains, but this type of linker should be present in *B. parapertussis* LPS, which synthesizes the O-antigen.

B. holmesii ATCC 51541 is a novel and important etiological factor of pertussis. Almost nothing is known regarding the structure of carbohydrate antigens of this bacterium and their possible applications as new glycoconjugate pertussis vaccines. Here the structure of the OS core and O-antigen of *B. holmesii* ATCC 51541 is presented. Based on the NMR and MALDI-TOF MS spectra it was established that the OS core of *B. holmesii* is identical to this of *B. pertussis* 606. *B. holmesii* OS is a nonasaccharide devoid of distal trisaccharide in its structure. This observation was also confirmed by the lack of serological cross-reactions with antibodies directed against the immunodominant epitope of *B. pertussis* 186. The NMR spectroscopy, mass spectrometry and chemical methods allowed to determine the structure of the O-antigen of *B. holmesii* ATCC 51541. It has been identified as a polysaccharide composed of pentasaccharide subunit (mass of 974.32 Da) with the following structure: $[-\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)-[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 3)]\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n$

Due to the divergent literature data on the EPS produced by *Bordetellae* and the lack of complete structural data, analyses of EPS isolated from the post-culture medium of the tested *Bordetellae* species were performed. Long-chain polysaccharides were detected in the post-culture medium separated using size exclusion chromatography. Polysaccharides were identified as two glucose homopolymers substituted at the 4 and 6 positions $[-\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow]$ and $[-\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow]$. In the chromatograms exooligosaccharide-like fractions was also detected. The main oligosaccharide fraction contains a new hexasaccharide with a mass of 1235.5 Da, identified using mass spectrometry techniques. The structure was characterized by NMR spectroscopy and chemical analysis. The deduced structure differed substantially from hypothetical Bps and

SUMMARY

microcapsule structures, thus it has been named "*Bordetella* oligosaccharide" (BOS). BOS is universal among all the *Bordetella* species studied. BOS structure was defined as α -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -GalNAcAN-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAcAN-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- α / β -GlcNAc. In the NMR spectra of BOS-containing fraction -CH, -CH₂ and -CH₃ signals were also identified, resembling fatty acids spin systems. They could be explained by the presence of an anchoring element for the BOS in the outer membrane. At the BOS reducing end, GlcNAc has been identified in both α and β configurations. This could be a place where the lipid anchor might be attached. However, no direct connection between BOS and possible anchor could be identified, because no BOS-containing fraction connected to the lipid anchor was identified.

Anti-glycoconjugate sera (anti-penta-PT, anti-OS-PT and anti-disach-HSA) and sera containing polyclonal antibodies directed against whole bacterial cells of *B. pertussis* (anti-SM Bp 186 and anti-SM Bp mix) that recognize LOS on the cell surface, showed a weak cross-reaction with BOS. In both structures, the terminal GlcNAc was identified, which may be the crucial epitope for the cross-recognition. Reactivity of sera to whole-cells support the hypothesis that BOS may be a capsule. Similarly anti-Vi serum, which according to published data, specifically recognizes GalNAcA that form a microcapsule, weakly reacts with BOS.

Understanding of the antigenic properties of BOS, its role in colonization and transmission of bacteria, as well as the possible application of BOS neoglyconjugate as a new potential component of broad-spectrum pertussis vaccines requires further research.

4. WSTĘP

4.1. Krztusiec

Bordetella pertussis (pałeczka krztuśca) została opisana, jako czynnik etiologiczny krztuśca, na początku XX wieku przez zespół belgijskich badaczy Julesa Bordeta i Octave'a Gengou'a (Bordet i Gengou, 1906). W Chinach choroba ta znana jest pod nazwą „kaszlu stu dni”. We Francji, ze względu na bardzo charakterystyczny kaszel przypominający pianie koguta, nazywana była *coqueluche* (Long i in., 2018), skąd prawdopodobnie nazwa ta przywędrowała do Polski.

Pierwsze udokumentowane doniesienia o krztuścu pochodzą z początku XV w. z Korei. Krztusiec rozprzestrzenił się dość szybko, ponieważ pierwsze odnotowane opisy epidemii przypisuje się perskiemu lekarzowi Baha al-Dawlah Razi. Epidemie miały miejsce w mieście Herat (obecnie zachodni Afganistan) pod koniec XV w. W tamtym okresie było to miasto położone na ważnych szlakach handlowych do Chin, Indii oraz Europy, co prawdopodobnie miało istotny wpływ na rozprzestrzenianie się „plag”. Pierwsza fala epidemii krztuśca charakteryzowała się wysoką zaraźliwością oraz śmiertelnością zarówno u dzieci jak i wśród dorosłych. Choroba zaatakowała wszystkie grupy wiekowe, co jest wskazaniem, że był to pierwszy kontakt tej ludności z pałeczką krztuśca. Jako lekarstwo stosowano napar z 1 mithkala (6 g) imbiru. Druga fala epidemii miała znacznie łagodniejszy przebieg oraz znacznie mniejszą śmiertelność (Aslanabadi i in., 2015).

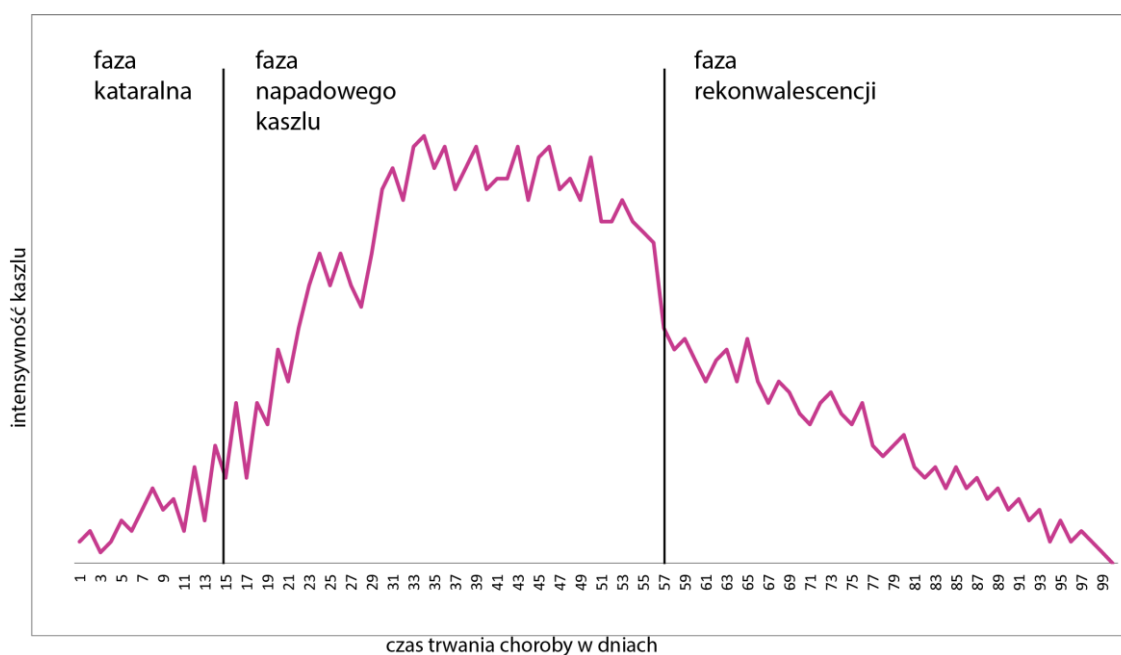
Różne doniesienia sugerują, że do Europy krztusiec dotarł prawdopodobnie z zachodniej Azji. Najwcześniejsze europejskie informacje o epidemii pochodzą z Paryża z 1578 roku. Francuski lekarz Guillaume de Baillou opisuje dwie fale epidemii. Ze względu na to, że podczas pierwszej fali choroba zaatakowała zarówno niemowlęta, dzieci jak i dorosłych można przypuszczać, że podobnie jak to miało miejsce w perskim mieście Herat, był to pierwszy kontakt tej społeczności z pałeczką krztuśca (Aslanabadi i in., 2015).

Tradycyjnie krztusiec uważa się za wysoce zakaźną chorobę wieku dziecięcego. Współczynnik określający zakaźność choroby (*ang. rate of infection*) dla krztuśca jest wysoki $R_0 = 15-17$ (Anderson i May, 1990). Kliniczny obraz krztuśca zależy jest od stopnia uodpornienia, wieku oraz płci. Zakażenie przenosi się drogą kropelkową. Transmisja bakterii możliwa jest jedynie pomiędzy ludźmi. Nie ma doniesień, mówiących o zakażeniach odzwierzęcych lub środowiskowych. Wśród zaszczepionych dzieci,

nastolatków oraz dorosłych objawy mogą być znacznie łagodniejsze i mniej specyficzne, a więc trudniejsze do zdiagnozowania. Nawet zaszczepiony dorosły może zostać „cichym nosicielem” i nieświadomie brać udział w transmisji choroby.

Według definicji World Health Organization, aby zaklasyfikować chorobę jako krztusiec, głównym objawem musi być przewlekły kaszel trwający dłużej niż 21 dni oraz konieczne jest spełnienie jednego z dodatkowych warunków: kontakt z osobą z potwierdzonym przypadkiem krztuśca, wzrost *B. pertussis* na podłożu stałym lub dodatni wynik badania serologicznego (WHO, 1991).

W klasycznym przebiegu krztuśca u nieszczepionych dzieci poniżej pierwszego roku życia można wyróżnić trzy fazy (Ryc. 1). Pierwsza faza choroby, zwana inaczej fazą kataralną, trwa 7-14 dni. W tym czasie obserwuje się mało specyficzne objawy jak przy typowym przeziębieniu, czyli nieżyt dróg oddechowych, osłabienie, ból gardła, katar, suchy kaszel, zapalenie spojówek oraz lekkie stany podgorączkowe. Po okresie około dwóch tygodni chory wchodzi w drugą fazę, zwaną fazą napadowego kaszlu. Faza ta może trwać nawet do dwóch miesięcy. Typowe i bardzo charakterystyczne dla tej fazy objawy to: silny, napadowy i bezproduktywny kaszel pogarszający się w nocy, bezdech, sinica, a nawet wymioty. Trzecia faza choroby to faza rekonwalescencji, w której częstotliwość napadowego kaszlu wyraźnie maleje, ale może trwać nawet 12 tygodni (WHO, 2014).



Ryc. 1. Przebieg krztuśca wg WHO 2014

Z infekcją *B. pertussis* powiązane jest wiele, dość często występujących, komplikacji takich jak krwotok spojówkowy, przepuklina pachwinowa, drgawki, zespół zaburzeń oddychania, zapalenie płuc, encefalopatia oraz głównie u noworodków bezdech i nagła śmierć (Heininger, 2010).

Jak już wspomniano, dotychczas krztusiec uważany był za chorobę wieku dziecięcego. Powszechne stosowanie szczepionek spowodowało przesunięcie wieku zachorowań. Coraz częściej chorują dzieci poniżej szóstego miesiąca życia, które nie przeszły pełnego cyklu szczepień, dzieci powyżej 10 roku życia, kiedy mija okres ochronny szczepionki oraz dorośli, którzy nie mają obowiązku szczepień i są głównym źródłem transmisji choroby. Określa się ich „cichymi nosicielami” (McNabb i in., 2007).

Krztusiec w klasycznym podejściu jest wywoływany przez *B. pertussis*. Jednak nowoczesne metody badawcze pozwalają zidentyfikować inne gatunki bakterii z rodzaju *Bordetella* wywołujące chorobę o niezwykle podobnych objawach - parakrztusiec. Obecnie uważa się, że krztusiec może być wywoływany przez trzy gatunki bakterii: *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. holmesii*. Dość często *B. pertussis* oraz *B. holmesii* izolowane są wspólnie, istnieje więc możliwość, że te dwa gatunki współkrążą wywołując infekcje mieszane. Podobnie jest w przypadku *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* (Guthrie i in., 2010; Mir-Cros i in., 2017; Njamkepo i in., 2011; Rodgers i in., 2013). W ciągu ostatnich dwudziestu lat odkryto też nowe gatunki z rodzaju *Bordetella* początkowo uważane za niepatogenne jak *B. petrii*, a obecnie klasyfikowane jako chorobotwórcze, więc może niedługo uda się odkryć, nieznaną jeszcze, gatunek również powodujący krztusiec.

4.2. Rodzaj *Bordetella*

Rodzaj *Bordetella* jest częścią rodziny *Alcaligenaceae* (Austin, 2014). *Bordetellae* to małe, zazwyczaj aerobowe, Gram-ujemne bakterie o kształcie „coccobacilli”, czyli pośrednim między ziarniakiem, a pałeczką. Dzięki badaniom molekularnym 16S rybosomowego RNA (rRNA) lista odkrywanych gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella* coraz bardziej się powiększa. Na chwilę obecną do rodzaju *Bordetella* zaliczane jest szesnaście gatunków:

- *B. pertussis*,
- *B. parapertussis*,
- *B. bronchiseptica*,
- *B. holmesii*,
- *B. petrii*,
- *B. hinzii*,
- *B. pseudohinzii*,
- *B. trematum*,
- *B. avium*,
- *B. ansorpii*,
- *B. flabillis*,
- *B. bronchialis*,

- *B. sputigena*,
- *B. tumulicola*,
- *B. muralis*,
- *B. tumbae*.

Bakterie z rodzaju *Bordetella* mają zdolność wzrostu w rozmaitych warunkach. Klasyczne *Bordetellae*, czyli *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* kolonizują drogi układu oddechowego wywołując infekcje oskrzeli i płuc u zwierząt i ludzi, włączając w to krztusiec występujący jedynie u człowieka. Pozostałe gatunki mogą wywoływać infekcje oskrzeli i płuc, ale także posocnicę (Shepard i in., 2004), czy zakażenie ran (Ko i in., 2005; Vandamme i in., 1996; Wang i in., 2007). *Bordetellae* izolowane są z różnych środowisk, takich jak: osad rzeczny (von Wintzingerode i in., 2001), ścieki (Nisola i in., 2010), gąbki morskie, rośliny, przemysłowo zanieczyszczone gleby (Wang i in., 2007), gleby zanieczyszczone olejami i paliwami (Eriksson i in., 2003), czy nawet starożytne malowidła w grobowcu (Tazato i in., 2015).

Najbardziej rozpoznawanym przedstawicielem bakterii z rodzaju *Bordetella* jest *B. pertussis*, która wywołuje zakaźną chorobę zwaną krztuścem. Jest to wyłącznie ludzki patogen i oprócz człowieka z aktywną infekcją nie jest znany żaden inny rezerwuuar tej bakterii, a nawet u osoby z infekcją bakterie można wyizolować w początkowych etapach choroby (Bordet i Gengou, 1906). Podobną chorobę, o łagodniejszym przebiegu, zwaną parakrztuścem, wywołuje *B. parapertussis*. W przypadku *B. parapertussis* istnieją dwie linie (Lund i in., 2001). Jedna (*B. parapertussis_{HU}*) jest specyficzna dla ludzkiego gospodarza, natomiast druga (*B. parapertussis_{OV}*) infekuje jedynie owce (Hester i in., 2015). Późniejsze odniesienia w pracy dotyczyć będą jedynie patogenu ludzkiego, czyli *B. parapertussis_{HU}*. Łagodniejsza forma krztuśca powodowana jest również przez *B. holmesii*, która początkowo izolowana była jedynie od pacjentów z obniżoną odpornością (Weyant i in., 1995; Yih i in., 1999).

Najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem środowiskowym, ale jednocześnie patogennym jest *B. bronchiseptica*. Bakteria ta nie jest ograniczona tylko do jednego typu gospodarza. Ma zdolność do infekcji wielu gatunków ssaków, szczególnie zwierząt towarzyszących człowiekowi, ale także dzikich. Zakażenie u zwierząt może być przewlekłe oraz bezobjawowe (Goodnow, 1980).

Również pozostałe gatunki są zdolne do kolonizacji układu oddechowego. *B. avium* izolowana jest od hodowlanych ptaków takich jak kurczaki, kaczki czy gęsi. Jest głównym czynnikiem etiologicznym kataru u indyjskich piskląt (Kerstens i in., 1984). Z dróg oddechowych drobiu często izoluje się *B. hinzii*, która czasami ulega pasażowi na człowieka (Vandamme i in., 1995). Gatunkiem izolowanym z dróg oddechowych myszy

laboratoryjnych jest blisko spokrewniona *B. pseudohinzii* (Ivanov i in., 2016). *B. flabillis*, *B. bronchialis* oraz *B. sputigena* zostały wyizolowane od pacjentów chorujących na mukowiscydozę (Vandamme i in., 2015). Gatunki takie jak *B. trematum* (Vandamme i in., 1996) oraz *B. ansorpii* (Ko i in., 2005) związane są z infekcjami ran oraz ucha. Pierwszym opisanym środowiskowym gatunkiem z rodzaju *Bordetella* jest *B. petrii* wyizolowana z osadu rzeczno-jeziornego (von Wintzingerode i in., 2001). Donoszono też o obecności *B. petrii* w izolatach pobranych z zainfekowanych kości (Fry i in., 2005; Stark i in., 2007) czy u pacjentów z mukowiscydozą (Spilker i in., 2008). Do nowo odkrytych gatunków niepatogennych należą *B. muralis*, *B. tumulicola* i *B. tumbae* wyizolowane z malowideł naściennych (Tazato i in., 2015).

Wiele gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella* infekuje drogi oddechowe zwierząt i ludzi. Ale równie wiele szczepów jest szeroko rozpowszechnionych i izolowanych z różnych nisz środowiskowych zarówno wodnych, roślinnych oraz w przeważającej większości różnych środowisk glebowych. Sugeruje to, że właśnie gleba może być naturalnym środowiskiem dla *Bordetella spp.* Co więcej *B. bronchiseptica* oraz *B. hinzii* pomimo przystosowania do zwierzęcego i ludzkiego gospodarza, zachowały zdolność do wzrostu na ekstrakcie glebowym (Hamidou Soumana i in., 2017). Istnieje możliwość, że wiele innych, nie poznanych jeszcze, patogennych *Bordetellae* może bytować w środowisku glebowym.

4.2.1. Klaster *Bordetella bronchiseptica*

W literaturze funkcjonuje określenie „klaster *Bordetella bronchiseptica*” odnoszące się do patogennych gatunków z rodzaju *Bordetella*, blisko spokrewnionych i wywołujących infekcje układu oddechowego u ssaków. Do tej grupy należą *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* (Weiss, 2006), określane również mianem klasycznych *Bordetellae*. Na podstawie analiz 16S rRNA ustalono, że *B. holmesii* jest blisko spokrewniona z *B. pertussis* (Austin, 2014; Weyant i in., 1995), jednak szersze analizy genomu wskazują, że jest to dalsze pokrewieństwo i *B. holmesii* nie należy do klasycznych *Bordetellae* (Linz i in., 2016). Ze względu na podobieństwo objawów wywoływanej choroby, które bardzo przypominają klasyczny krztusiec *B. holmesii*, traktowana będzie jako bakteria należąca do klastra *B. bronchiseptica*.

4.2.1.1. *Bordetella bronchiseptica*

B. bronchiseptica izolowana jest od psów, kotów, kawii domowej, królików, świń i koni (Batey i Smits, 1976; Bemis i in., 1977; Evans i Maitland, 1939; Goodnow, 1980).

Przy nagromadzeniu dużej liczby zwierząt, jak to ma miejsce np. w schronisku czy w gospodarstwie rolnym, bakteria ta może się bardzo szybko rozprzestrzenić wywołując chorobę, zwłaszcza że zakażenie może przebiegać bezobjawowo. Pierwszych izolacji *B. bronchiseptica* dokonano u psów z infekcjami dróg oddechowych. Wywołuje ona u tych zwierząt kaszel kennelowy (Ferry, 1911). Człowiek zazwyczaj nie jest gospodarzem dla *B. bronchiseptica*, ale w wyjątkowych przypadkach, może zostać zakażony (Ghosh i Tranter, 1979). Dotyczy to najczęściej osób mających kontakt ze zwierzętami np. w gospodarstwie (Kristensen i Lautrop, 1962; Woolfrey i Moody, 1991) albo pacjentów immunosupresorowych, będących na przykład nosicielami ludzkiego wirusa niedoboru odporności (Dworkin i in., 1999; Woolfrey i Moody, 1991), pacjentów nowotworowych (Szvalb i in., 2018), czy pacjentów po przeszczepach (Ner i in., 2003), którzy mieli kontakt z zakażonymi zwierzętami. Badania filogenetyczne wskazują, że gatunki patogenne mogą pochodzić od jednego wspólnego przodka zbliżonego do *B. bronchiseptica* (van der Zee i in., 1996).

4.2.1.2. *Bordetella pertussis*

Analizy filogenetyczne szczepów krążących w ciągu ostatniego wieku wykazały, że niesłychanie szybkie rozprzestrzenienie się *B. pertussis* w populacji ludzkiej nastąpiło zaledwie w ciągu ostatnich 500 lat. Obecnie krążące szczepy można przyporządkować do dwóch znacznie różniących się między sobą rozgałęzień. Do I rozgałęzienia można zaliczyć niewielką liczbę szczepów, natomiast rozgałęzienie II zawiera ok. 97,3% szczepów. Według jednej z teorii, około dwa tysiące lat temu te dwie linie uległy rozdzieleniu, z kolei według drugiej teorii zostały wprowadzone niezależnie od siebie do populacji ludzkiej z nieznanego rezerwuaru (Bart i in., 2014). Na skutek efektu „wąskiego gardła” i przystosowania się do ludzkiego gospodarza znacznie zmniejszyła się różnorodność genetyczna *B. pertussis* (Linz i in., 2016). Genom *B. pertussis* (~4000 kilo par zasad) jest o 400 kbp mniejszy niż w przypadku innych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Wynika to prawdopodobnie z tego, że w trakcie adaptowania się do człowieka jako jedyne gospodarza, *B. pertussis* utraciła część genomu, aby móc skolonizować niszę i przetrwać w nowych warunkach środowiskowych. Pałeczka krztuśca tak mocno przystosowała się do jednego gospodarza, że poza człowiekiem z aktywną infekcją nie jest znany, żaden inny rezerwuar. *B. pertussis* każdego roku powoduje ok. 400 tysięcy zgonów (Weiss, 2006).

4.2.1.3. *Bordetella parapertussis*

B. parapertussis została wykryta wśród przypadków krztuśca, którego wyizolowane kolonie bakteryjne przypominały *B. pertussis*, ale nie spełniały wszystkich kryteriów morfologicznych i biochemicznych. Nie można było ich zaliczyć również do *B. bronchiseptica*, ponieważ pałeczki *B. parapertussis* nie wykazują zdolności ruchu (Eldering i Kendrick, 1938). Krztusiec powodowany przez *B. parapertussis* ma znacznie łagodniejszy przebieg (Bergfors i in., 1999).

4.2.1.4. *Bordetella holmesii*

B. holmesii początkowo została opisana jako bakteria wywołująca zakażenia u pacjentów immunosupresorowych po resekcji śledziony (Weyant i in., 1995), a dopiero później została wyizolowana od pacjentów z objawami przypominającymi krztusiec (Yih i in., 1999).

B. holmesii nie jest typowym przykładem patogennych ssaczy *Bordetellae*, jest blisko spokrewniona z *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* i współdzieli z nimi ok. 66% genów. Natomiast biorąc pod uwagę zawartość genomu, jest on bardziej zbliżony do genomów *B. avium* oraz *B. petrii*. Prawdopodobnie wyewoluowała od ptasich *Bordetellae* (Diavatopoulos i in., 2006). 400 genów opisanych w różnych izolatach *B. holmesii* (ok. 12,5%) nie występuje u innych *Bordetellae*. Co więcej każdy szczep posiada od 24 do 114 unikalnych genów, a jeden z wykrytych genów jest wykrywany w genomie *Escherichia coli*. Istnieje możliwość, że w przypadku *B. holmesii* dość łatwo zachodzi poziomy transfer genów. *B. holmesii* mogła uzyskać zdolność do wywoływania parakrztuśca poprzez horyzontalny transfer genów od *B. pertussis* (Harvill i in., 2014). W przypadku szczepów *B. holmesii* różnorodność genetyczna jest jeszcze mniejsza niż wśród szczepów *B. pertussis*, co również sugeruje jej niedawne przystosowanie do ludzkiego gospodarza (Linz i in., 2016).

Zakażenie *B. holmesii* przenosi się prawdopodobnie drogą kropelkową (Kamiya i in., 2012). Bakteria ta początkowo izolowana była u pacjentów z podejrzeniem krztuśca, na poziomie około 0,4% (Guthrie i in., 2010). Późniejsze doniesienia sugerują, że *B. holmesii* rozprzestrzeniła się po całym świecie. Wykrywana jest w 20% próbek pobranych od dorosłych pacjentów we Francji (Njamkepo i in., 2011), czy do 29% w Ohio diagnozowanych w kierunku krztuśca (Rodgers i in., 2013).

Nie odnotowano śmiertelnego przypadku zakażenia *B. holmesii*, ale jest to bardzo inwazyjna bakteria. Został opisany przypadek wyizolowania tej bakterii od pacjentki

z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa, która kilka miesięcy wcześniej miała objawy krztuśca (Nadji i in., 2018). Obecnie zakażenia wywoływane przez *B. holmesii* nie wydają się być zbyt dużym zagrożeniem dla zdrowia publicznego i powodem do obaw. Jednak jej teoretyczna zdolność do zwiększania chorobotwórczości przez horyzontalny transfer czynników wirulencji może być przyczyną częstszego pojawiania się ostrych infekcji (Pittet i Posfay-Barbe, 2015).

Powszechnie dostępne szczepionki przeciwkrztuścowe nie zapewniają ochrony przeciwko *B. holmesii*. W badaniach przeprowadzonych przez Zhang i wsp. poliklonalne przeciwciała uzyskane po zaszczepieniu myszy szczepionkami pełnokomórkowymi (DTwP) oraz bezkomórkowymi (DTaP) skutecznie wiązały się z antygenami *B. pertussis*. Mniej wydajnie wiązały się z antygenami *B. parapertussis*, a w przypadku *B. holmesii* poliklonalne przeciwciała indukowane szczepionką DTwP rozpoznawały jedynie antygeny o masie niższej niż 60 kDa, a poliklonalne przeciwciała indukowane szczepionką DTap, rozpoznawały tylko jeden antygen z niską efektywnością (Zhang i in., 2012). *B. holmesii* nie produkuje większości antygenów białkowych takich jak PT, FHA, PRN i FIM, które są składnikami szczepionek DTap. Japońska grupa badawcza zaproponowała szczepionkę opartą o białko BipA, produkowane zarówno przez *B. pertussis* jak i *B. holmesii*. Sekwencja aminokwasowa białka BipA produkowanego przez *B. holmesii* wykazuje 59% homologii i 89% podobieństwa do sekwencji białka BipA *B. pertussis*. W modelu mysim wykazano, że ma właściwości ochronne przeciwko infekcji *B. holmesii*. Jednak główną wadą BipA jest jego wysoka niestabilność i łatwość do fragmentacji w trakcie hodowli (Saito i in., 2016).

4.2.2. Przegląd epidemiologiczny i rozkład gatunkowy

W latach 1995-1998 w stanie Massachusetts z prób zebranych od pacjentów z objawami krztuśca, przeprowadzono badania w celu identyfikacji bakterii w kierunku *Bordetellae*. W 85% przypadków wykryto *B. pertussis*, *B. parapertussis* wykryta została w 11% przypadków, a *B. holmesii* w 3,7% przypadków (Mazengia i in., 2000).

W stanie Ohio latach 2010-2011 podczas epidemii, odnotowano 918 przypadków choroby, której objawy bardzo przypominały krztusiec. Na podstawie badań molekularnych bakterie z rodzaju *Bordetella* wykryte zostały w 164 próbkach. Rozkład wyglądał następująco: *B. pertussis* wykryta została w 68% przypadków, *B. parapertussis* w 1,4%, a *B. holmesii* co jest dość zaskakujące w 29%. Mieszane zakażenie *B. pertussis* i *B. holmesii* wykryto w 2% przypadków. Efektywność szczepionki dTap oceniono na

67% dla *B. pertussis* oraz 36% dla *B. holmesii*. *B. holmesii* znacznie częściej wykrywana była u dzieci w wieku 11-18 lat. U dzieci poniżej pierwszego roku życia rozkład tych bakterii był na podobnym poziomie (Rodgers i in., 2013).

W Kanadzie w latach 2007-2008 *B. pertussis* wykryta została w 96% przebadanych prób, *B. parapertussis* wykryto w 2,5% przypadków, a *B. holmesii* to znikomy procent przypadków (0,007%). Na podobnym poziomie 0,007% pojawiły się zakażenia mieszane *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* (Guthrie i in., 2010).

We Francji wśród prób zebranych w latach 2009-2010 od pacjentów z podejrzeniem krztuśca w 92% przypadków wykryto *B. pertussis*, w 6,8% prób wykryto DNA *B. holmesii*, a 0,6% próbek zostało zidentyfikowane jako przypadek jednoczesnej infekcji *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* lub *B. bronchiseptica* (Njamkepo i in., 2011).

Zebrane próby w sąsiadującej z Francją Szwajcarii w podobnym okresie (lata 2009-2012) miały inny rozkład. Krztusiec był wywołany w przeważającej części przez *B. pertussis* (97% przypadków), niewielki odsetek przypadków został zidentyfikowany jako zakażenie *B. parapertussis* (3%). W żadnej próbie nie wykryto *B. holmesii* (Pittet i in., 2014).

Z kolei w Barcelonie przebadano potwierdzone przypadki krztuśca w latach 2013-2016. W 97,2% prób wykryto *B. pertussis*, 4,1% zostało zidentyfikowane jako *B. holmesii*. Pięć przypadków (1,3%) zostało zakwalifikowane jako zakażenie mieszane wywołane przez *B. pertussis* oraz *B. holmesii*. W przypadku *B. holmesii* zaobserwowano interesujący trend. Badaniom podlegały cztery kolejne lata. W latach 2013-2014 w żadnej próbce nie wykryto DNA bakterii *B. holmesii*. W kolejnych latach doszło do rozpowszechnienia *B. holmesii*. W 2015 wykryta została w 3,9% przypadków, a w 2016 roku liczba przypadków uległa podwojeniu - 8,8% (Mir-Cros i in., 2017). W innym barcelońskim szpitalu w okresie maj 2016 - kwiecień 2017 na 69 potwierdzonych przypadków krztuśca *B. pertussis* zidentyfikowano w 91,3% prób, *B. holmesii* - 7,2%, a *B. parapertussis* - 1,5% (Valero-Rello i in., 2019).

4.2.3. Morfologia i diagnostyka bakterii z klastra *B. bronchiseptica*

4.2.3.1. Morfologia

B. pertussis można wyhodować w warunkach laboratoryjnych na podłożu Bordet – Gengou lub alternatywnie na agarze węglowym wzbogaconym odwłóknioną krwią baranią w czasie 3 – 7 dni, w warunkach tlenowych w temperaturze 37 °C. *B. pertussis* nie wykazuje wzrostu na podstawowym agarze odżywczym, ani na podłożu

MacConkey'a. Kolonie są małe, gładkie, wypukłe i perłowe. Kolor kolonii zależy od fazy wzrostu. Typowe kolonie fazy I *B. pertussis* są małe i lśniące. W odniesieniu do tego typu kolonii w literaturze funkcjonuje określenie „kropki Merkurego”. Kolonie *B. parapertussis* pojawiają się wcześniej i mogą być bardziej brązowe ze względu na wytwarzanie barwnika. Oba gatunki w fazie I (faza wzrostu „logarytmicznego”) charakteryzują się właściwościami hemolitycznymi. Kolonie fazy II i III nie zmieniają wyglądu, ale tracą właściwości hemolityczne. W fazie IV zmienia się wygląd kolonii na bardziej biały i płaski (WHO, 2014). Drobne kolonie *B. holmesii* pojawiają się po 2 dniach i w kolejnych 2-3 dniach bakterie produkują brązowy barwnik. Dodatek antybiotyku cefaleksyny, standardowo stosowanego w celu identyfikacji *B. pertussis* hamuje wzrost *B. holmesii*. *B. bronchiseptica* nie ma specjalnych wymagań do wzrostu. Kolonie pojawiają się po 24 godzinach. Sama diagnostyka mikrobiologiczna jest niewystarczająca do odróżnienia od siebie *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* oraz *B. bronchiseptica*.

W hodowli płynnej bakterie z klastra *B. bronchiseptica* produkują słomkowożółty pigment uwalniany do pożywki. Ten pigment to ryboflawina (witamina B₂). *B. pertussis* w I i II fazie wzrostu produkuje ryboflawinę, która stymuluje jej namnażanie w niskiej gęstości (Odanaka i in., 2017). *B. parapertussis* oraz *B. holmesii* po 48 godzinach hodowli w obecności jonów żelaza produkują brązowy barwnik.

Tabela 1. Morfologia bakterii z klastra *B. bronchiseptica*

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>
Czas wzrostu na płytce	3-4 dni	2-3 dni	1 dzień	3-4 dni
Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	35 °C
Wymagania tlenowe	aerobowe	aerobowe	aerobowe	aerobowe 5% CO ₂
Oksydaza	+	-	+	-
Ureaza	-	+	+	-
Ruch	+	-	+	-
Właściwości hemolityczne	+	+	+	+
Wytwarzanie pigmentu	żółty	żółty	żółty	żółty
	-	brązowy	-	brązowy

4.2.4. Diagnostyka krztusca

Krztusiec diagnozowany jest przede wszystkim na podstawie obrazu klinicznego. Jeżeli ten obraz jest typowy i wiadomo, że pacjent miał kontakt z osobą chorą na krztusiec, diagnostyka mikrobiologiczna i serologiczna nie jest konieczna. U nastolatków oraz dorosłych choroba nie ma tak klasycznego przebiegu jak u dzieci poniżej pierwszego roku życia, dlatego głównym wskazaniem jest kaszel, który trwa dłużej niż trzy tygodnie.

Podstawą rozpoznania jest przeprowadzenie badań mikrobiologicznych, serologicznych oraz molekularnych (WHO, 2014).

4.2.4.1. Diagnostyka molekularna

Tradycyjna diagnostyka krztuśca polega przede wszystkim na hodowli kolonii bakteryjnych na odpowiednim podłożu. Ze względu na to, że *B. pertussis* należy do bakterii długo rosnących (typowy czas wzrostu dla izolatu to 7 dni) coraz powszechniejsze stają się testy wykrywające DNA bakteryjne. Diagnostyka molekularna oparta o test *real-time* PCR nie jest najtańszą metodą, ale jest zdecydowanie bardziej czuła i znacznie szybsza niż hodowla kolonii bakteryjnych.

Jedną z sekwencji wykorzystywaną do diagnostyki krztuśca i identyfikacji bakterii jest sekwencja *IS481*, która występuje w genomie *B. pertussis* w liczbie około 50-200 kopii (Glare i in., 1990). Jednak ta sekwencja obecna jest również w genomie *B. holmesii* (8-10 kopii) oraz niektórych szczepów *B. bronchiseptica* (<5 kopii). Zastosowanie tylko jednej sekwencji może prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników w diagnostyce krztuśca (Tatti i in., 2008).

Na podstawie sekwencji *IS1001* można wykluczyć krztusiec powodowany przez *B. pertussis*. Sekwencja ta wykorzystywana jest do diagnostyki *B. parapertussis* (~20 kopii). Nie pozwala natomiast odróżnić *B. parapertussis* od *B. bronchiseptica* (1-7 kopii) (Tizolova i in., 2013; van der Zee i in., 1996). *B. holmesii* identyfikowana jest na podstawie sekwencji *h-IS1001* (1 kopia), która charakteryzuje się wysoką homologią do *IS1001* (Tatti i in., 2011).

Sekwencja *IS1002* obecna jest w genomie *B. parapertussis* (9 kopii), *B. pertussis* (4-9 kopii) oraz kilku szczepach *B. bronchiseptica* (1 kopia). *IS1002* nie jest obecna w genomie *B. parapertussis_{OV}* (van der Zee i in., 1996).

Sekwencja *recA* wykorzystywana jest jako sekwencja potwierdzająca identyfikację *B. holmesii* podobnie jak sekwencja *IS1002* potwierdzająca zakażenie *B. parapertussis* (Martini i in., 2017).

Sekwencja *ptxS1* kodująca podjednostkę S1 toksyny krztuścowej byłaby odpowiednim wyborem, aby na jej podstawie identyfikować bakterie, ponieważ *B. pertussis* jako jedyny gatunek z rodzaju *Bordetella* wytwarza toksynę krztuścową. Jednakże jak już wspomniano u *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* na skutek mutacji w regionie promotorowym geny kodujące toksynę krztuścową uległy wyciszeniu, ale są obecne. Bez poamplifikacyjnych analiz nie można tylko na tej podstawie odróżnić od

siebie tych gatunków (Tatti i in., 2008). Do identyfikacji poszczególnych gatunków nie wystarczy diagnostyka oparta o jedną lub dwie sekwencje. Potrzebny jest algorytm oparty o zestaw różnych sekwencji.

Tabela 2. Sekwencje docelowe w DNA klastra *B. bronchiseptica*

Sekwencja	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>
IS481	+	-	+ (niektóre szczepy)	+
IS1001	-	+	+ (niektóre szczepy)	-
h-IS1001	-	-	-	+
IS1002	+	+	+	-
ptxS1	+	+	+	-
recA	-	-	-	+

4.2.4.2. Diagnostyka bakterii techniką spektrometrii mas

W ciągu ostatnich lat w diagnostyce mikrobiologicznej coraz częściej stosowana jest metoda biotypowania bakterii oparta o spektrometrię mas (szerzej opisana w rozdz. 4.6.1). Biotypowanie techniką MALDI-TOF MS polega na analizie bakteryjnych profili białkowych, charakterystycznych dla danego gatunku. Bakterie identyfikuje się metodą bezpośrednią nanosząc kolonie bakteryjne bezpośrednio na płytkę stalową do analiz MALDI-TOF MS lub ekstrahując z bakterii białka rybosomalne. Ekstrakt białkowy również jest nanoszony na płytkę stalową i po wyschnięciu pokrywany roztworem matrycy HCCA. Uzyskane widma masowe porównuje się ze wzorami referencyjnymi zamieszczonymi w ciągle rozbudowywanej bazie danych (Bruker, Biotyper). Istotną zaletą tej metody w porównaniu do metod biochemicznych jest czas identyfikacji (30 min od pobrania kolonii) oraz niewielka ilość materiału potrzebna do przeprowadzenia biotypowania (1 kolonia). Metoda ta nadaje się do identyfikacji klasycznych *Bordetellae* (Zintgraff i in., 2018). Biotypowanie sprawdza się również w przypadku zakażeń mieszanych, a w warunkach laboratoryjnych technika ta jest wykorzystywana do kontroli „czystości” prowadzonych hodowli.

4.3. Antygeny *Bordetellae*

Antygeny *Bordetellae*, biorące udział w patogenezie krztuśca można podzielić na dwie kategorie: antygeny białkowe, które są składnikami szczepionek przeciwkrztuścowych oraz antygeny cukrowe (poli- i oligosacharydowe). Antygeny cukrowe nie wchodzi w skład bezkomórkowych szczepionek przeciwko *B. pertussis*.

Głównym białkowym czynnikiem wirulencji produkowanym wyłącznie przez *B. pertussis* jest toksyna krztuśca (*ang. pertussis toxin, PT*). To egzotoksyna, składająca się z sześciu podjednostek, które są uporządkowane w strukturze typu A - B. Składnik A

jest enzymatycznie aktywny i w przypadku PT składa się jedynie z podjednostki S1 (MW 26 024 Da). Składnik B jest częścią wiążącą receptor i składa się z podjednostek S2 (MW 21 924 Da), S3 (MW 21 873 Da), S5 (MW 11 013 Da) oraz dwóch podjednostek S4 (MW 12 058 Da) (Kaslow i Burns, 1992; Locht i Antoine, 1995; Tamura i in., 1982). Podjednostka S1 jest ADP- rybozylotransferazą, która przeprowadza rybozylację białka G. Inaktywacja tego białka prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznego AMP wewnątrz komórki i w efekcie prowadzi do zakłóceń w przekazywaniu sygnałów (Locht i Antoine, 1995). Geny kodujące PT zorganizowane są w operon *ptx*. Sekwencjonowanie genów kodujących toksynę krztuścową szczepów krążących obecnie i w przeszłości, ujawniło pewien polimorfizm tych genów (*ptx1*, *ptx2*, *ptx3*). Polimorfizm obserwowany jest również w regionie promotorowym (*ptxP*), co wpływa na zmienny poziom ekspresji toksyny (Mooi i in., 2009). Szczepy obecnie krążące są przeważnie typem *ptxP3* (Bart i in., 2014). *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* również posiadają geny PT w regionach kodujących oraz w regionie promotora. Mogą one kodować funkcjonalne białko, ale nie są transkrypcyjnie aktywne i w efekcie toksyna krztuścowa nie jest produkowana przez te bakterie (Aricò i Rappuoli, 1987).

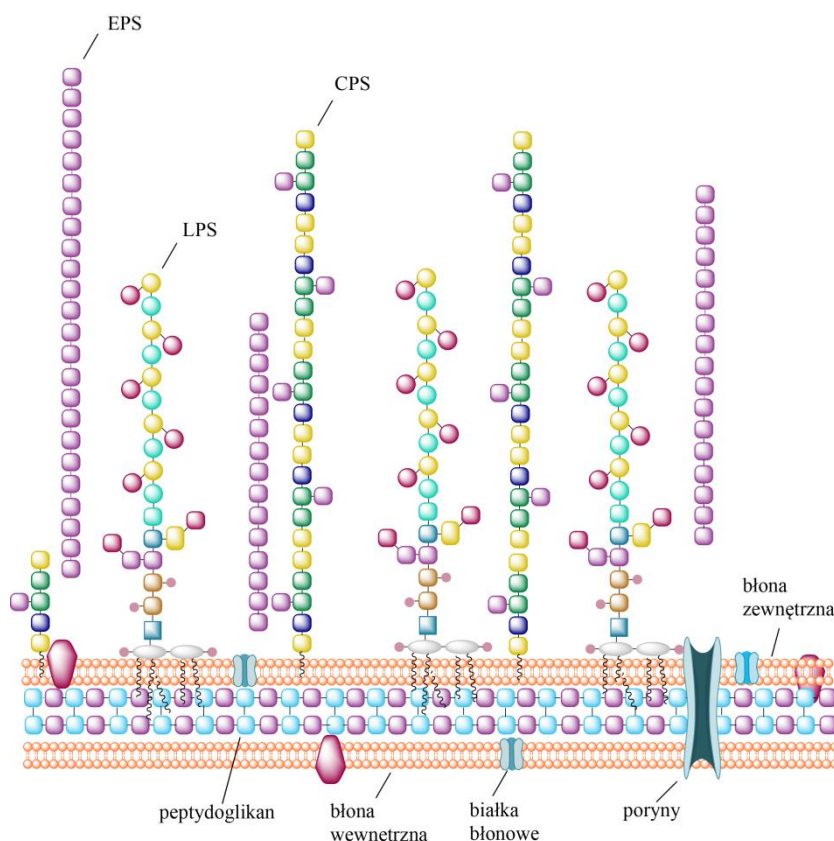
Do pozostałych antygenów białkowych należą hemaglutynina włókienkowa (ang. *filamentous hemagglutinin adhesin*, FHA), cyklaza adenylanowa (ang. *adenylate cyclase toxin*, ACT), toksyna dermonekrotyczna (ang. *dermonecrotic toxin*, DNT), pertaktyna (ang. *pertactin*, PRN), fimbrie (ang. *fimbriae*, FIM) oraz cytotoksyna tchawicza (ang. *tracheal cytotoxin*, TCT), (Guiso, 2015). Antygeny bakterii z klastra *B. bronchiseptica* zostały zebrane w Tabeli 3, wraz z uwzględnieniem ich obecności (+) lub braku (-) w poszczególnych gatunkach.

Tabela 3. Antygeny klastra *B. bronchiseptica*

Czynnik wirulencji	Składnik szczepionki		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>
	wP	aP				
PT	+	+	+	-	-	-
FHA	+	większość	+	+	+	-
ACT	+	-	+	+	+	-
DNT	+	-	+	+	+	-
PRN	+	część	+	+	+	-
FIM	+	część	+	-	+/-	-
TCT	+	-	+	+	+	-
LOS/LPS	+	-	+	+	+	+

4.3.1.1. Powierzchniowe bakteryjne antygeny cukrowe

Bakteryjne polisacharydy związane są z powierzchniową częścią osłon komórkowych bakterii (Ryc. 2). Najbardziej zewnętrzną strukturą są polisacharydy kapsularne (ang. *capsular polysaccharide*, CPS). CPS są polimerami zbudowanymi z powtarzających się oligosacharydowych podjednostek. Ich wielkość osiąga nawet 100 kDa. U bakterii Gram-ujemnych koniec redukujący związany jest z lipidem kotwiczącym CPS w błonie zewnętrznej. Jeżeli polisacharyd nie jest związany z komórką bakteryjną zostaje zaklasyfikowany jako egzopolisacharyd (ang. *exopolysaccharide*, EPS) (Wen i Zhang, 2015). Jednakże należy z rozwagą stosować uwalnianie z osłony komórkowej jako kryterium podziału na CPS i EPS. Zdarzają się CPS izolowane z pożywki uwolnione z komórki na skutek niestabilności wiązania fosfodiesterowego pomiędzy CPS, a lipidową kotwicą. Istnieją również EPS ściśle związane z powierzchnią komórki bakteryjnej, pomimo niewykrywania kotwicy lipidowej (Roberts, 1996). Antygenem cukrowym będącym integralnym składnikiem osłony bakterii Gram-ujemnych jest lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*, LPS). Podobnie jak CPS jego zewnętrzny region (antygen O) zbudowany jest z powtarzających się podjednostek, ale jego wielkość jest pięć razy mniejsza (Wen i Zhang, 2015).

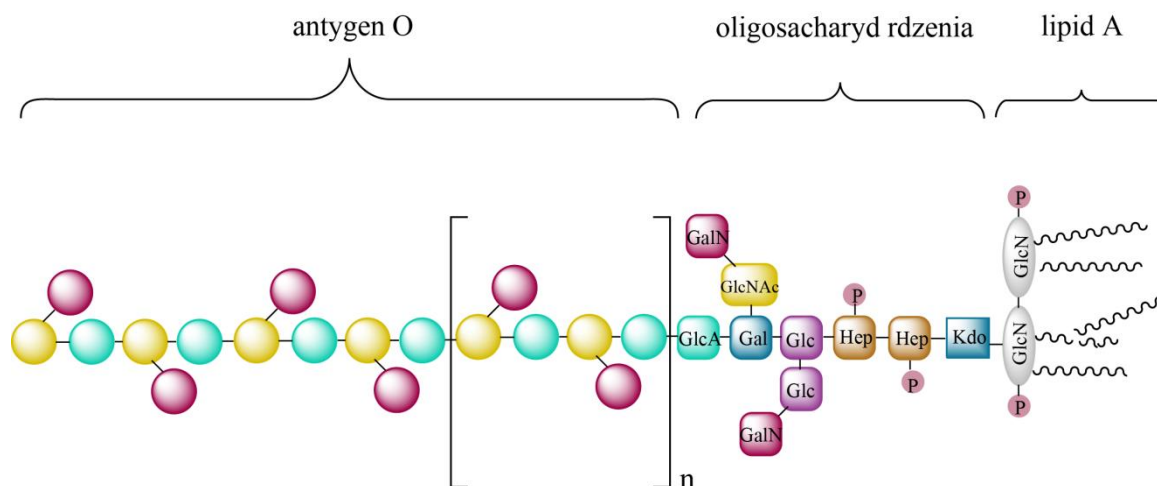


Ryc. 2. Budowa osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych

4.3.1.2. Lipopolisacharydy i lipooligosacharydy

Bakterie z rodzaju *Bordetellae* należą do bakterii Gram-ujemnych. Na swojej powierzchni posiadają lipopolisacharyd, który może stanowić nawet do 75% powierzchni bakterii, a więc jest głównym antygenem powierzchniowym. LPS jest endotoksyną, która stanowi amfifilowy, integralny składnik zewnętrznej błony komórkowej. To jeden z czynników chorobotwórczości i w zmiennych proporcjach jest on obecny w szczepionce pełnokomórkowej (DTwP), ale ze względu na toksyczność nie wchodzi w skład szczepionki bezkomórkowej (DTaP).

Typowy LPS składa się z hydrofobowej zakotwiczonej w zewnętrznej błonie osłony komórkowej części lipidowej oraz hydrofilowej zewnętrznej części cukrowej. Pod względem strukturalnym można w nim wyróżnić trzy główne regiony: lipid A, oligosacharyd rdzenia oraz antygen O (Ryc. 3).



Ryc. 3. Ogólna budowa lipopolisacharydu; P-reszty fosforanowe, Hep-heptoza, Kdo-kwas 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowy, GlcN-glukozamina, Glc-glukoza, GlcA-kwas glukuronowy, GlcNAc-N-acetyloglukozamina, Gal-galaktoza, GalN-galaktozamina

Lipid A kotwyczy całą cząsteczkę LPS w błonie zewnętrznej osłony komórkowej dzięki obecności hydrofobowych łańcuchów kwasów tłuszczowych. Lipid A warunkuje również integralność i sztywność całej błony zewnętrznej bakterii (Raetz i in., 2007). Struktura lipidu A wykazuje największą spośród wszystkich regionów LPS konserwatywność. Lipid A stanowi centrum toksyczności endotoksyny i warunkuje jej aktywność biologiczną poprzez oddziaływanie z kompleksem receptorów dla LPS. Lipid A zbudowany jest zazwyczaj z dwóch reszt glukozaminy $\rightarrow 6)-\beta\text{-D-GlcpN4P-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-GlcpN-(1-P}$, stanowiących szkielet cukrowy, podstawiony 10-16 węglowymi 3-hydroksy kwasami tłuszczowymi, połączonymi ze szkieletem cukrowym wiązaniami amidowymi

lub estrowymi. Grupy 3-hydroksylowe kwasów tłuszczowych są dodatkowo acylowane, a reszty GlcN podstawiane przez grupy fosforanowe. Wśród modyfikacji strukturalnych lipidu A wpływających na aktywność biologiczną LPS wymienić należy podstawniki, takie jak etanolamina (Etn) czy grupy pirofosforanowe (PP) (Caroff i in., 2002).

Oligosacharyd rdzeniowy – przyłączony jest do lipidu A kwasolabilnym wiązaniem ketozydowym, utworzonym między dystalną resztą kwasu 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo), a resztą glukozaminy lipidu A. W budowie oligosacharydu rdzenia wyróżnia się dodatkowo region wewnętrzny, tzw. heptozowy, zbudowany z typowych dla oligosacharydu rdzenia reszt heptopiranoz i Kdo oraz region zewnętrzny, heksozowy, złożony z glukozy (Glc), galaktozy (Gal), aminocukrów – glukozaminy (GlcN), N-acetyloglukozaminy (GlcNAc), galaktozaminy (GalN), N-acetylogalaktozaminy (GalNAc) i kwasów uronowych. Cząsteczki heptozy w większości scharakteryzowanych oligosacharydów rdzenia występują w konfiguracji *L-glicero-D-manno-piranozy* (L-D-Hepp) lub *D-glicero-D-manno-piranozy* (D-D-Hepp) (Holst, 2011). Dodatkowo, region rdzenia wewnętrznego zawierać może reszty heksozy i niecukrowe podstawniki - Etn, P i PP (Caroff i in., 2002). W strukturze LPS identyfikowane są również aminokwasy takie jak glicyna (Gamian i in., 1996).

Najbardziej zewnętrzną częścią cząsteczki LPS jest polisacharyd O-swoisty, określany również mianem antygeny O lub antygeny somatycznego. Tworzą go zwykle długie łańcuchy polisacharydowe zbudowane z powtarzających się podjednostek, w skład których wchodzi 1-7 reszt cukrowych. Polisacharyd O-swoisty jest jednocześnie regionem o największej zmienności. Jako antygen powierzchniowy determinujący swoistość serologiczną wykorzystywany jest do klasyfikacji serologicznej szczepów (serotypy O) i ma kluczową rolę w diagnostyce klinicznej. Obecność łańcuchów O-swoistych nie determinuje funkcji życiowych bakterii, w naturze występują bowiem również szorstkie mutanty nie syntezujące antygeny O, natomiast ochraniają one komórkę przed działaniem czynników antibakteryjnych, układu dopełniacza czy czynników środowiskowych (Rodas i in., 2011). Liczba powtarzających się podjednostek jest różna i zależy od warunków środowiskowych i fazy wzrostu danego szczepu (Bravo i in., 2008).

Szczepy syntetyzujące pełną cząsteczkę LPS, zawierającą antygen O, określa się mianem szczepów gładkich (S, *smooth*), a syntezowane przez nie lipopolisacharydy opisuje się symbolem S-LPS. Bakterie, których LPS pozbawiony jest antygeny O, a posiadają jedynie lipid A podstawiony oligosacharydem rdzenia określa się mianem

szczepów szorstkich (R, *rough*), a syntezowane przez nie lipopolisacharydy opisuje się skrótem R-LPS. LPS niektórych szczepów bakteryjnych, tzw. szczepów szorstko-gładkich (R-S), posiadają jedynie pojedynczą podjednostkę antygeny O (Greenfield i Whitfield, 2012).

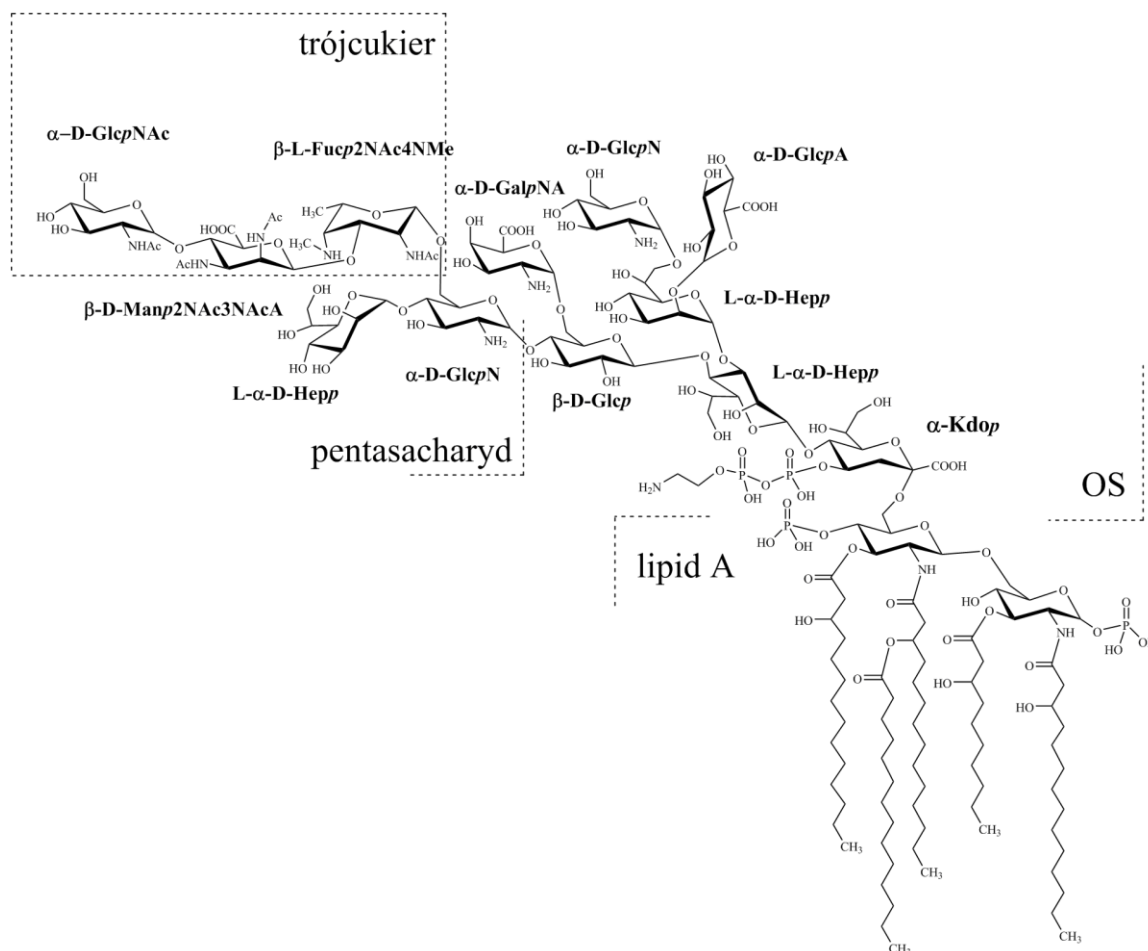
LPS *B. bronchiseptica* oraz *B. pertussis* jest jednym z czynników zjadliwości tych bakterii (Bouchez i in., 2017). Dlatego niezmiernie istotna jest analiza porównawcza wyizolowanych i oczyszczonych struktur endotoksyn bakterii z rodzaju *Bordetella*. Bakterie należące do klastra *B. bronchiseptica* są blisko ze sobą spokrewnione, ale syntetyzują różne lipopolisacharydy. Pod względem ogólnej budowy mają wspólne elementy, posiadają lipid A oraz rozgałęziony oligosacharyd rdzenia. Jednak pod względem strukturalnym pojawiają się dość znaczące różnice.

Lipid A bakterii z rodzaju *Bordetella* zbudowany jest z dwóch reszt glukozamin stanowiących szkielet cukrowy $\rightarrow 6)-\beta\text{-D-GlcpN4P-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-GlcpN-(1-P}$, podstawionych 10-16 węglowymi 3-hydroksy kwasami tłuszczowymi (Caroff i in., 1994; Caroff i in., 2001; El Hamidi i in., 2009).

Oligocukrowy region rdzeniowy (OS) *B. pertussis* jest dodekasacharydem. Zbudowany jest z reszt: kwasu 2-keto-3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowego (Kdo), 3,4-podstawionej L-glicero- $\alpha\text{-D-manno-heptozy}$ (3,4-L- $\alpha\text{-D-Hepp}$), 2,7-podstawionej L-glicero- $\alpha\text{-D-manno-heptozy}$ (2,7-L- $\alpha\text{-D-Hepp}$), $\alpha\text{-D-glukozaminy}$ ($\alpha\text{-D-GlcpN}$), kwasu $\alpha\text{-D-glukuronowego}$ ($\alpha\text{-D-GlcpA}$), kwasu $\alpha\text{-D-galaktozaminouronowego}$ ($\alpha\text{-D-GalpNA}$), 4,6-podstawionej $\beta\text{-D-glukozy}$ ($\beta\text{-D-Glcp}$), 4,6-podstawionej $\alpha\text{-D-glukozaminy}$ ($\alpha\text{-D-GlcpN}$) i L-glicero- $\alpha\text{-D-manno-heptozy}$ (L- $\alpha\text{-D-Hepp}$). Jego immunodominującym fragmentem jest dystalny trójcukier zbudowany z $\alpha\text{-D-N-acetyloglukozaminy}$ ($\alpha\text{-D-GlcpNAc}$) oraz dość rzadko spotykanych cukrów, czyli kwasu 2,3-diacetamido-2,3-dideoksymannouronowego ($\beta\text{-D-Manp2NAc3NAcA}$) oraz 2-acetamido-4-N-metylo-2,4,6-deoksygalaktozy ($\beta\text{-L-Fucp2NAc4NMe}$). Przyłączony jest do 4,6- $\alpha\text{-D-glukozaminy}$ rdzenia. Struktura LOS *B. pertussis* 1414 przedstawiona jest na Ryc. 4. Charakterystyczną cechą OS *Bordetellae* jest obecność tylko jednej cząsteczki Kdo, która wiąże OS z lipidem A (Caroff i in., 2000).

Oligosacharyd rdzenia *B. bronchiseptica* jest niemal identyczny jak OS *B. pertussis*. Największe różnice obserwuje się w podstawieniu grupami fosforanowymi na reszcie 2,7-L- $\alpha\text{-D-Hepp}$, braku terminalnej L- $\alpha\text{-D-Hepp}$ oraz częściowej metylacji reszty $\beta\text{-L-Fucp2NAc4NMe}$ (Preston i in., 2006).

W literaturze najkrótszy rdzeń opisano dla *B. parapertussis*, gdyż nie posiada dystalnego trójcukru, terminalnej reszty α -D-GalpNA oraz terminalnej L- α -D-Hepp (Preston i in., 2006).



Ryc. 4. Struktura LOS *B. pertussis* 1414 (Caroff i in., 2000)

Pierwszą cechą wyróżniającą LPS *B. pertussis* jest brak syntezy typowego antygeny O. Ponieważ lipopolisacharyd *B. pertussis*, w przeciwieństwie do pozostałych bakterii z rodzaju *Bordetella*, nie posiada polisacharydowego łańcucha O-swoistego, zbudowanego z powtarzających się podjednostek (RU), określany jest mianem lipooligosacharydu (LOS). Dystalny trójcukier występuje jako pojedyncza podjednostka, syntetyzowany jest, podobnie jak antygen O, na osobnym szlaku, a nie wraz z OS rdzenia (Burns i in., 2003).

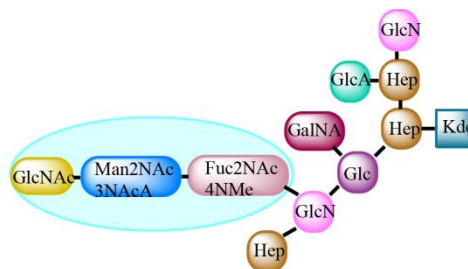
Czasami dystalny trójcukier wraz z antygenem O u *B. bronchiseptica* może zostać utracony. W nie do końca poznanym mechanizmie na skutek mutacji w genie *wlbH*, białko WlbH traci swoją zdolność do prawidłowego przyłączenia antygeny O do oligosacharydu rdzenia. Analogiczna mutacja w genie *wlbH* u *B. pertussis* skutkuje

przyłączeniem jedynie β -D-Manp2NAc3NAcA oraz β -L-Fucp2NAc4NMe do oligosacharydu rdzenia (Burns i in., 2003; Preston i in., 2006).

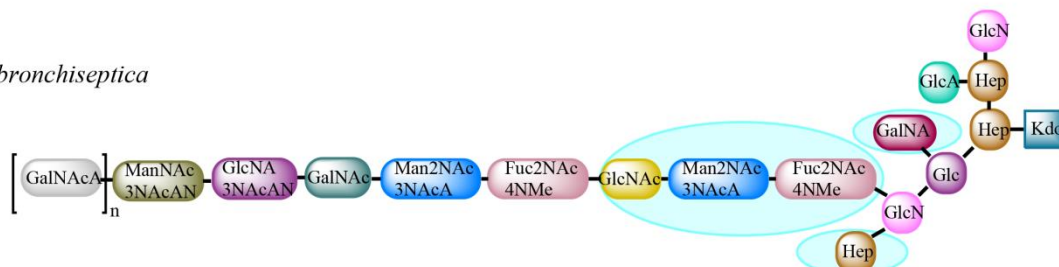
Opisane w literaturze polisacharydy O-swoiste *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* są homopolimerami kwasu 2,3-diacetamido- α -L-2,3-dideoksygalaktouronowego (α -L-GalpNAc3NAcA) (Di Fabio i in., 1992). Koniec nieredukujący O-PS *B. bronchiseptica*, w zależności od szczepu zawiera pochodną kwasu 2,3,4-triamino-2,3,4-trideoksy- α -galaktouronowego, która może być modyfikowana na dwa sposoby, na tyle odmienne, że poliklonalne przeciwciała przeciwko antygenom O1 i O2 uzyskane w wyniku immunizacji myszy nie rozpoznają krzyżowo polisacharydów O-swoistych (Buboltz i in., 2009). Innym rodzajem polisacharydu jest O3 PS *B. bronchiseptica*, który składa się z dwucukrowej powtarzającej się podjednostki, która na końcu nieredukującym również jest modyfikowana (Vinogradov i in., 2010). Na końcu redukującym może być przyłączone kilka różnych monosacharydów, stanowiących dodatkowy łącznik pomiędzy O-PS, a rdzeniem. Zidentyfikowano kwas 2,3-diacetamido-2,3-dideoksy- β -glukuronowy, kwas 2,3-diacetamido-2,3-dideoksy- β -mannouronowy oraz α , β -N-acetylogalaktozaminę (Preston i in., 2006). Zarówno u *B. bronchiseptica* jak i u *B. parapertussis* polisacharyd O-swoisty przyłączony jest do OS rdzenia poprzez pentasacharydowy łącznik \rightarrow 4)- β -D-ManpNAc3NAcAN-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc3NAcAN-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-ManpNAc3NAcA-(1 \rightarrow 3)- β -L-FucpNAc4NMe-(1 \rightarrow). Łącznik ten u *B. bronchiseptica* przyłączony jest do reszty α -D-GlcpNAc dystalnego trójcukru, natomiast u *B. parapertussis* do reszty α -D-glukozaminy rdzenia (Preston i in., 2006). Porównanie LPS omawianych gatunków przedstawiono na Ryc. 5., a zmienne fragmenty zaznaczono niebieskim kolorem.

Struktura rdzenia oraz antygeny O *B. holmesii* nie jest jeszcze poznana. Na podstawie rozdziału elektroforetycznego i porównania do znanych struktur LPS bakterii z rodzaju *Bordetella* można wysnuć wniosek, że powtarzająca podjednostka antygeny O składa się z więcej niż jednej reszty cukrowej, a oligosacharyd rdzenia jest zbliżony wielkością do OS rdzenia *B. pertussis* pozbawionego dystalnego trójcukru (Caroff i in., 2001).

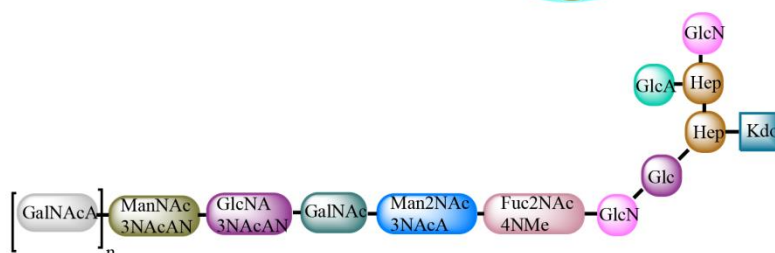
LOS *B. pertussis*



LPS *B. bronchiseptica*



LPS *B. parapertussis*



Ryc. 5. Porównanie LPS wybranych bakterii z rodzaju *Bordetella* wg Preston i wsp. 2006 oraz Vinogradov 2002, 2007

4.3.1.3. Inne polisacharydy bakteryjne CPS/EPS

Innymi wspomnianymi glikanami bakteryjnymi są kapsularne polisacharydy (CPS) i egzopolisacharydy (EPS). Kapsularne polisacharydy tworzą niezwykle różnorodną grupę molekuł. Zbudowane są z krótkich podjednostek, ale o większej liczbie powtórzeń niż LPS. Z powierzchnią komórki bakteryjnej związane są przez fosfolipid lub lipid A wiązaniem fosfodiesterowym. CPS niezwiązany z powierzchnią komórki klasyfikowany jest jako egzopolisacharyd (EPS) (Cooper i in., 2015). Rola polisacharydów kapsularnych polega na ochronie przed mechanizmami obronnymi gospodarza. Warstwa CPS jest mocno uwodniona i chroni komórkę bakteryjną przed wysuszeniem, umożliwiając transmisję bakterii. Stanowiąc jednocześnie fizyczną barierę, utrudnia rozpoznanie epitopów innych antygenów powierzchniowych obecnych na powierzchni osłony komórkowej przez układ odpornościowy gospodarza (Roberts, 1996). Polisacharydy kapsularne biorą także udział w adherencji bakterii do komórek gospodarza, w trakcie kolonizacji (Nwodo i in., 2012).

Egzopolisacharydy produkowane są przez bakterie z każdego rodzaju i mają szerokie zastosowanie w przemyśle. Ich wielkość osiąga niekiedy ~1000 kDa. Wśród EPS wyróżniamy homo- i heteropolimery. Homopolimery zbudowane są z α -D-Glc, β -D-

Glc, fruktanów i poligalaktanów. Heteropolimerowy EPS może być zbudowany z D-Glc, D-Gal, L-Rha i czasami GlcNAc, GalNAc oraz GlcA. W strukturze mogą być obecne niecukrowe podstawniki, takie jak glicerol, acetyle czy fosforany. EPS pełnią wiele funkcji: biorą udział w tworzeniu biofilmu, uczestniczą w adherencji do komórek gospodarza, agregacji bakterii, utrzymują strukturę przestrzenną biofilmu i są źródłem węgla, azotu i fosforu. Ich rola może również polegać na akumulowaniu składników odżywczych z otoczenia, ochronie przed wysychaniem oraz przed mechanizmami obronnymi układu odpornościowego gospodarza (Nwodo i in., 2012).

Dotychczas opisano dwa rodzaje egzopolisacharydów wytwarzanych przez *Bordetella spp.* Według doniesień literaturowych głównym polisacharydem bakteryjnym produkowanym przez *B. pertussis*, *B. parapertussis*, a także *B. bronchiseptica* jest Bps (ang. *Bordetella polysaccharide*). To polisacharyd podobny do polisacharydów produkowanych przez inne bakterie, jak na przykład PNAG zbudowany z poli- β -1,6-N-acetyloglukozaminy produkowany przez *Staphylococcus aureus*. Dokładna struktura nie została jeszcze określona, a ich podobieństwo oparte jest o reaktywność immunologiczną oraz enzymatyczną podatność na dyspersynę B (Cattelan i in., 2016; Conover i in., 2010; Parise i in., 2007). Bps jest niezbędny w początkowej fazie wytwarzania biofilmu. Odpowiada za jego stabilność oraz utrzymanie trójwymiarowej struktury. Odgrywa istotną rolę w procesie adhezji *B. pertussis* do nabłonkowych komórek w górnych drogach oddechowych, ale już nie w dolnych drogach oddechowych (Conover i in., 2010, 2012). Wytwarzanie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Bordetella* może być przyczyną nieskuteczności szczepionek DTaP, które nie zapewniają ochrony przed taką postacią bakterii (Cattelan i in., 2016). Szczepy *B. pertussis* obecnie krążące w populacji charakteryzują się większą zdolnością do tworzenia biofilmów niż laboratoryjne szczepy referencyjne. Może to być jedna ze strategii przetrwania pozwalająca na lepszą adhezję bakterii do komórek nabłonkowych, transmisję oraz cyrkulację u ludzi (Cattelan i in., 2017).

Innym opisanym dla *B. pertussis* egzopolisacharydem jest polisacharyd mikroksularny. Na podstawie homologii genów odpowiedzialnych za syntezę, transport oraz modyfikacje potranslacyjne wysnuto wniosek, że podobnie jak antygen Vi, może on być zbudowany z N-acetylowanego kwasu galaktozaminouronowego. Słabe reakcje serologiczne z surowicą anti-Vi, wg autorów publikacji, wskazują na krótkołańcuchowy charakter polisacharydu kapsularnego. Stąd wprowadzenie nazwy - mikroksula. Struktura mikroksuli nie została przedstawiona. Również jej rola nie jest jeszcze

poznana, ale prawdopodobnie bierze udział w patogenezie krztuśca. (Neo i in., 2010). Geny kodujące Bps oraz polisacharyd mikro kapsułarny są od siebie oddzielone i znajdują się pod kontrolą różnych systemów regulatorowych, więc CPS nie wpływa na tworzenie biofilmu (Hoo i in., 2014).

W powyższych doniesieniach literaturowych, brakuje bezpośredniego potwierdzenia struktury Bps oraz mikro kapsuły standardowo wykorzystywanymi technikami do analiz polisacharydów. Bps izolowany jest z bakterii zawieszonych w 0,5M EDTA i inkubowanych w temperaturze 100 °C przez 5 min. Supernatant po odwirowaniu bakterii traktowany jest pronazą przez 3 godz., w 37 °C i podgrzewany do 85 °C przez 15 min i ekstrahowany fenolem i chloroformem w celu inaktywacji enzymu i usunięcia kwasów nukleinowych i białkowych zanieczyszczeń (Conover i in., 2010, 2012). Informacje dotyczące struktur tych antygenów cukrowych oparte są jedynie o homologie genów lub reakcje enzymatyczne i serologiczne materiału traktowanego wieloma odczynnikami chemicznymi i enzymami. W wyniku przeprowadzanych analiz wyizolowany Bps może się znacznie różnić od natywnego egzopolisacharydu.

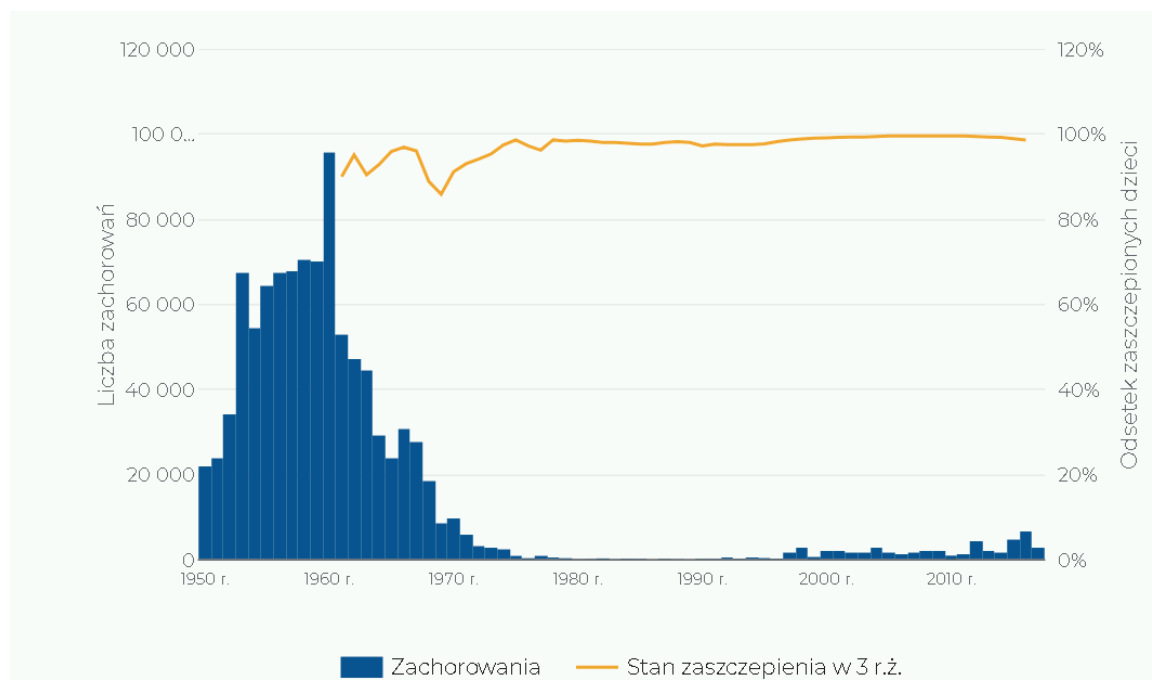
Wspomniany antygen Vi jest polisacharydem kapsułarnym po raz pierwszy wyizolowanym i opisanym u *Salmonella enterica* serowar Typhi (Felix i Margaret Pitt 1934). Jest to polimer $\rightarrow 4$ - α -D-GalpNAcA-(1 \rightarrow), częściowo O-acetylowany w pozycji 3 (Heyns i Kiessling 1967) i to właśnie grupy O-acetylowe tworzą immunodominujący epitop. Na końcu redukującym reszta HexNAc podstawiona jest 12-14 węglowymi 3-hydroksy kwasami tłuszczowymi i swoją budową częściowo przypomina lipid A. Antygen Vi wykorzystywany jest do produkcji polisacharydowej szczepionki przeciwko durowi brzuszemu. Ponieważ szczepionki polisacharydowe nie indukują powstawania komórek pamięci, szczepienia należy powtarzać co dwa lata. Nie jest to szczepionka rekomendowana dla dzieci poniżej 2 roku życia. Koniugatowe szczepionki zapewniają dwukrotnie dłuższą ochronę i są bezpieczne dla dzieci i niemowląt. Szczepionka koniugatowa wprowadzana jest w krajach gdzie dur brzuszny występuje endemicznie, ale na razie nie jest komercyjnie dostępna (Szu, 2013).

W genomach różnych *Bordetellae* zidentyfikowano geny odpowiedzialne za syntezę polisacharydów kapsułarnych, które są zwykle czynnikami wirulencji i biorą udział w hamowaniu zabijania zależnego od dopełniacza (Linz i in., 2016). Również antygen Vi bierze udział w hamowaniu mechanizmów obronnych gospodarza (Hart i in., 2016), a podobne geny, które u *Salmonella* Typhi odpowiedzialne są za syntezę polisacharydu Vi (*viaB*) znajdują się również w genomie *B. pertussis* (Liston i in., 2016).

Brak jest doniesień o obecności tych genów u pozostałych *Bordetella spp.* i oprócz doniesienia o mikrokapsule u *B. pertussis*, hipotetycznie strukturalnie podobnej do antygeny Vi, nie zidentyfikowano polisacharydów kapsułarnych dla bakterii z rodzaju *Bordetella*.

4.4. Szczepionki przeciwkrztuścowe

W okresie przed wynalezieniem szczepionki, każdego roku, na całym świecie, na krztusiec umierało 760 000 dzieci poniżej pierwszego roku życia (WHO, 2014). Wynalezienie w latach 40 XX wieku pełnokomórkowej szczepionki (skojarzona szczepionka przeciwko błonicy <ang. *Diphtheria*> powodowanej przez maczugowca błonicy, tężcowi <ang. *Tetanus*> wywoływanemu przez laseczkę tężca oraz krztuścowi <ang. *Pertussis*> wywoływanemu przez *B. pertussis*) oraz wprowadzenie obowiązku szczepień, pozwoliło znacząco zmniejszyć te liczby. W Polsce również zaobserwowano zmniejszoną zachorowalność na krztusiec po wprowadzeniu obowiązku szczepień (Ryc. 6).



Ryc. 6. Stan epidemiologiczny krztuśca w Polsce w latach 1950-2017 (Źródło danych: biuletyny roczne „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce” oraz „Szczepienia ochronne w Polsce” (wyd: NIZP-PZH, GIS). Data ostatniej aktualizacji 02.01.2020 <http://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/krztusiec/3/#jak-wiele-zachorowan-na-krztusiec-wystepuje-w-polsce>)

Obecnie dostępne są przeciwkrztuścowe szczepionki pełnokomórkowe oraz bezkomórkowe. Skojarzona pełnokomórkowa (ang. *whole-cell pertussis*; wP, DTwP, DTP) przeciwko błonicy, tężcowi oraz krztuścowi zawiera toksoid błonicy, toksoid

tężcowy oraz inaktywowane szczepy *B. pertussis*. Szczepionka bezkomórkowa (*ang. acellular pertussis*; aP, DTaP) zawiera toksoid błonicy, toksoid tężcowy oraz wybrane oczyszczone antygeny bakteryjne *B. pertussis*. Najczęściej w skład szczepionki wchodzi toksyna krztuścowa (PT), hemaglutynina włókienkowa (FHA), pertaktyna (PRN) oraz fimbrie. Proporcje antygenów białkowych zależne są od producenta.

Szczepionka pełnokomórkowa produkowana jest poprzez hodowlę wybranych szczepów *B. pertussis* na syntetycznym płynnym podłożu. Następnie bakterie są zabijane chemicznie bądź termicznie i po dostosowaniu do odpowiedniej gęstości, adsorbowane na solach glinu.

Szczepionka DTaP jest ściśle zdefiniowana przez producenta, w jej skład wchodzi od jednego do pięciu antygenów, natomiast DTwP zawiera ponad 3000 antygenów, z czego więcej niż 20 może mieć właściwości ochronne (Cherry, 2019). Ilość poszczególnych antygenów jest zmienna i zależy od hodowli lub /i od szczepu. W pojedynczej dawce szczepionki DTwP ilość toksyny krztuścowej waha się 0,02 µg do 0,68 µg, a hemaglutyniny włókienkowej 0-1,6 µg (Ashworth i in., 1983). Zmienna jest również zawartość LOS w szczepionce. Ilość tego antygeny waha się w granicach 0,9 – 2,8 µg/ml, z czego większość to LOS niezwiązany z komórką bakteryjną. Wraz z upływem czasu przechowywania szczepionki, uwalniane jest coraz więcej LOS do roztworu. Po około pół roku nawet 80% LOS może zostać uwolnione z komórki bakteryjnej (Ibsen i in., 1988).

Za reaktogenność szczepionek DTwP odpowiedzialny jest właśnie LOS. W miejscu podania może wywołać obrzęk, zaczerwienienie, bolesność. Miejscowe odczyny poszczepienne nie są długotrwałe, ale mogą powodować pewien dyskomfort. Do ogólnych obserwowanych odczynów należy wzrost temperatury powyżej 38 °C, senność, wymioty, uporczywy płacz (Fine i Clarkson, 1987). W latach 1960-1970, szczepionki DTwP zostały w wielu krajach zastąpione szczepionkami acelularnymi (DTaP) zawierającymi nie całe komórki bakterii (wraz z LOS), a wyizolowane i oczyszczone wybrane antygeny *B. pertussis*. Po podaniu szczepionki DTaP odczyny poszczepienne są rzadziej obserwowane (Decker i in., 1995; Edwards i in., 1995). Jednakże wraz z wiekiem dziecka i podaniem kolejnej dawki, reaktogenność szczepionki DTaP rośnie (Blennow i Granström, 1989). Dlatego też wprowadzono szczepionki dTap z obniżoną zawartością antygenów błonicy i krztuśca (pisane małymi literami dla odróżnienia od szczepionki DTaP). Szczepionki w tej wersji rekomendowane są dla starszych dzieci i dorosłych.

Miejscowe odczyny poszczepienne są niższe w przypadku kolejnych dawek (Scheifele i in., 2001) lub różnice pomiędzy odczynami nie są znaczące (Wei i in., 2011).

Szczepionki bezkomórkowe różnią się od komórkowych przede wszystkim typem wywoływanej odpowiedzi immunologicznej. W modelu badań przeprowadzonych na szympanсах wykazano, że DTaP indukuje limfocyty pomocnicze Th1 oraz Th2. Naturalna infekcja oraz zaszczepienie DTwP (w mniejszym stopniu) indukuje odpowiedź Th17 oraz Th1 (Warfel i Merkel, 2013).

Kolejną cechą, która odróżnia szczepionki pełnokomórkowe od bezkomórkowych jest ich efektywność. Po przeanalizowaniu wielu badań nad skutecznością obu rodzajów szczepionek określono ich efektywność na poziomie 85% dla DTaP oraz 94% dla DTwP (Fulton i in., 2016). Szczepionka DTaP, aby mieć podobną skuteczność jak szczepionka DTwP, musi zawierać przynajmniej 3 antygeny *B. pertussis*: PT, FHA oraz PRN (Jefferson i in., 2003). Działanie ochronne szczepionki DTwP może trwać nawet 12 lat (Jenkinson, 1988; Wendelboe i in., 2005), podczas gdy ochrona po zaszczepieniu DTaP dość szybko zanika i po upływie ok. 8 lat chronionych pozostaje jedynie 10% dzieci (McGirr i Fisman, 2015). W przypadku szczepionek dTap efekt ochronny zanika już po 4 latach z poziomu 68,8% do 8,9% (Klein i in., 2016). Przebycie infekcji zapewnia ochronę na maksymalnie 20 lat, w zależności od krążących szczepów (Wendelboe i in., 2005).

Obserwowany wzrost zachorowań pomimo powszechnych szczepień może być spowodowany przez kilka czynników. Pierwszym jest naturalnie zanikająca odporność, która może być kontrolowana poprzez szczepienia przypominające. Drugim jest stosowanie szczepionek bezkomórkowych. Na modelu zwierzęcym wykazano, że DTaP chroni przed rozwojem choroby, ale nie zapobiega transmisji i infekcji zwierząt nieszczepionych (Warfel i in., 2014). Znaczne ograniczenie liczby antygenów szczepionkowych stosowanych w DTaP wymusiło na bakterjach ekspresję zmienionych alleli (dryf antygenowy) i doprowadziło do powstania, coraz częściej izolowanych, szczepów bakteryjnych, które nie ekspresjonują antygenów obecnych w szczepionkach. Dotyczy to wszystkich antygenów szczepionkowych. Najczęściej obserwuje się zmiany w ekspresji pertaktyny. W Stanach Zjednoczonych stosujących tylko DTaP dominują szczepy niewytwarzające PRN (Pawloski i in., 2014). Podobne zmiany obserwuje się również w Polsce (Polak i in., 2018), gdzie obowiązujący kalendarz szczepień przewiduje czterokrotne zaszczepienie dziecka szczepionką DTwP (w 2, 3-4, 5-6 i 16-18 miesiącu życia) oraz dawką przypominającą w 6 roku życia szczepionką DTaP. Jednakże Polska jest jednym z niewielu europejskich krajów, w którym dzieci szczepione są jeszcze

szczepionką pełnokmórkową. Znacznie powszechniej, szczególnie w krajach wysokorozwiniętych, wykorzystuje się szczepionkę bezkomórkową. W Polsce dostępna jest szczepionka DTwP zawierająca toksoid błoniczy, toksoid tężcowy oraz inaktywowane bakterie *B. pertussis* szczepów 186, 606 oraz 629.

Niedoskonałość istniejących szczepionek bezkomórkowych powoduje wzrost zainteresowania szczepionkami pełnokomórkowymi, ale z nowym podejściem.

W Brazylii opracowywana jest szczepionka „Plow”. Jest to szczepionka DTwP, z której najbardziej reaktogenny antygen LOS, został chemicznie usunięty. Głównym powodem modyfikacji szczepionki DTwP, w celu obniżenia jej reaktywności, jest ponad 300 krotnie wyższy koszt wyprodukowania szczepionki DTaP (Dias i in., 2013). W pierwszej fazie badań klinicznych szczepionka „Plow” w porównaniu ze standardowo stosowaną szczepionką DTwP okazała się mniej reaktogenna, przy jednocześnie podobnym poziomie immunogenności i ochrony poszczepiennej (Dias i in., 2017).

Inną perspektywę wykazali się Locht i wsp. zmieniając sposób podania szczepionki. Francusko-amerykański zespół opracował szczepionkę BPZE1, w której żywe, ale atenuowane bakterie, podawane są donosowo. W wyniku genetycznych modyfikacji u *B. pertussis* inaktywowano toksynę krztuścową, obniżono poziom cytotoksyny tchawiczej i zupełnie usunięto toksynę dermonekrotyczną (Mielcarek i in., 2006). Wykazano skuteczność szczepionki w badaniach przeprowadzonych na szympanсах. BPZE1 chroniła przed rozwojem choroby oraz przed zakażeniem i kolonizacją w górnych drogach oddechowych zwierząt (Locht i in., 2017). Szczepionka ta jest w drugiej fazie badań klinicznych, które mają się zakończyć w czerwcu 2020. Badania prowadzone są przez Narodowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych w Stanach Zjednoczonych. Najnowsze wyniki wykazują, że jedna dawka szczepionki BPZE1 indukuje odpowiedź typu Th1, tak jak szczepionka komórkowa i w porównaniu ze szczepionką bezkomórkową indukuje powstawanie przeciwciał o szerszym zakresie działania (Lin i in., 2020).

4.5. Neoglikokoniugaty i szczepionki glikokoniugatowe

Szczepionki polisacharydowe rozwijane są od lat 1970-1980. Ich główną wadą jest to, że sam polisacharyd jest antygenem T – niezależnym, wywołującym słabą i krótkotrwałą odpowiedź immunologiczną. Skoniugowanie oczyszczonego słabo immunogenego polisacharydu z silnie immunogennym białkiem np. toksoidem tężcowym lub błoniczym, powoduje zwiększenie immunogenności polisacharydu.

Szczepionki glikokoniugatowe łączą w sobie właściwości antygenowe składników cukrowych oraz białkowych i nabierają cech antygenów T – zależnych. Powszechnie stosuje się szczepionki skoniugowane na polisacharydy otoczkowe (CPS) przeciwko meningokokom (*Neisseria meningitidis*), pneumokokom (*Streptococcus pneumoniae*) oraz pałeczkom hemofilnym typu b (*Haemophilus influenzae*) (Wen i Zhang, 2015).

Ze względu na fakt, że LPS jest integralnym składnikiem osłony komórkowej i indukuje powstawanie swoistych i często bakteriobójczych przeciwciał w wyniku immunizacji pełnymi komórkami bakteryjnymi (Rappuoli, 2004), wydaje się być idealnym antygenem szczepionkowym przeciwko infekcjom powodowanym przez Gram-ujemne bakterie. Jednak jego aktywność biologiczna oraz to, że stanowi główny czynnik wirulencji, wyklucza użycie LPS jako antygeny szczepionkowego w natywnej formie. Podstawowymi warunkami jakie muszą być spełnione przy wykorzystywaniu w szczepionkach tego typu antygenów to po pierwsze pozabawienie LPS toksycznych aktywności (lipid A) z zachowaniem struktury immunogennych epitopów, zdolnych do indukcji wytwarzania przeciwciał o antyendotoksynowej i bakteriobójczej aktywności, a po drugie zapewnienie takim modyfikowanym LPS cech antygenów T-zależnych, najczęściej przez koniugację z białkami. Indukowane przeciwciała powinny także neutralizować niepożądane biologiczne aktywności LPS.

Najbardziej stabilnym ewolucyjnie regionem LPS (poza toksycznym lipidem A) jest region oligosacharydu rdzenia. Kompletny OS *B. pertussis* jest dodekascharydem, zawierającym immunogeny dystalny trójcukier. W jego skład wchodzi rzadko spotykane cukry, dlatego ustalenie struktury izolowanego OS nie było łatwym zadaniem (Caroff i in., 2000). Zdefiniowanie struktury było bardzo pracochłonne i w międzyczasie inna grupa badawcza rozpoczęła prace nad chemiczną syntezą najbardziej immunogennego fragmentu. Zsyntetyzowanie pełnej cząsteczki okazało się niemożliwe, powstał natomiast disacharyd zbudowany z dwóch terminalnych cukrów α -D-GlcpNAc oraz β -D-Manp2NAc3NAcA (Nilsson i Norberg, 2000). Laboratorium posiada w swojej kolekcji koniugat tego disacharydu z HSA. W projektowaniu glikokoniugatów nasz zespół może pochwalić się pewnymi sukcesami. Na podstawie wcześniejszych doświadczeń, w których udowodniono, że koniugaty OS z toksoidem tężca indukują powstawanie specyficznych przeciwciał, rozpoznających epitopy LPS na powierzchni komórek bakteryjnych (Lugowski i in., 1996), przygotowano koniugat pentasacharyd-TTd. Metodą deaminacji z lipooligosacharydu *B. pertussis* 186 wyizolowano pentasacharydowy fragment zawierający dystalny trójcukier (Ryc. 4) i poddano

koniugacji z toksoidem tężca. Wykazano immunodominujący charakter dystalnego trójcukru LOS *B. pertussis* 186 (Niedziela i in., 2005). W kolejnych etapach zmieniono białko nośnikowe, na toksynę krztuścową, aby nowy glikokoniugat indukował powstawanie szerszego zakresu przeciwnkrztuścowych przeciwciał. Stworzono koniugat pentasacharyd-PT (penta-PT) oraz koniugat na pełny oligosacharydowy fragment LOS, oligosacharyd-PT (OS-PT). Dowiedziono, że uzyskane przeciwciała mają właściwości bakteriobójcze, a w trakcie koniugacji, toksyna krztuścowa traci swoją aktywność biologiczną (Koj i in., 2015). Glikokoniugaty fragmentów oligosacharydowych wyizolowanych z LOS *B. pertussis* i PT chronione są patentem na terenie Europy oraz Stanów Zjednoczonych (Koj i in., 2018, 2019).

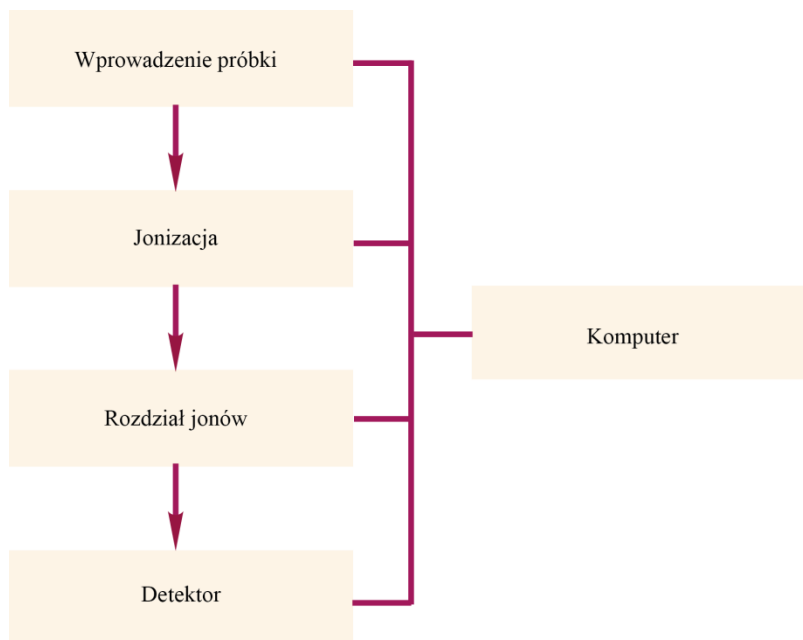
4.6. Główne techniki stosowane w analizie antygenów cukrowych i glikokoniugatów

4.6.1. Spektrometria mas

Jedną z instrumentalnych technik analitycznych jest spektrometria mas. Jest to technika oparta na pomiarze stosunku masy do ładunku (m/z) jonów wytworzonych w trakcie jonizacji analizowanych cząsteczek. Aby możliwe było wykonanie pomiaru badanego związku lub substancji musi on zostać zjonizowany, a utworzone jony (dodatnie lub ujemne) zostają rozdzielone w analizatorze ze względu na różne wartości m/z . Istnieje kilka metod jonizacji oraz rozdziału jonów, ale działanie wszystkich spektrometrów ma wspólny schemat blokowy (Ryc. 7).

Próbka zazwyczaj wprowadzana jest bezpośrednio do komory jonizacyjnej. Proces jonizacji zachodzi na początkowym etapie pomiaru w źródle jonów, gdzie w zależności od użytej metody cząsteczki analizowanych substancji uzyskują ładunek elektryczny. W trybie jonów dodatnich utworzenie ładunku następuje najczęściej poprzez przyłączenie protonów $[M+nH]^{n+}$ oraz jonów metali takich jak sód $[M+nNa]^{n+}$, potas lub ich kombinacje. W trybie jonów ujemnych najczęściej obserwuje się cząsteczki pozbawione określonej liczby protonów, czyli jony typu $[M-nH]^{n-}$. Metody jonizacji dobiera się w zależności od rodzaju badanych substancji. Wśród metod jonizacji wyróżnia się jonizację elektronami (*electron impact*, EI), jonizację chemiczną (*chemical ionization*, CI), desorpcję polem (*field desorption*, FD), bombardowanie szybkimi atomami (*fast atom bombardment*, FAB), desorpcję plazmową (*plasma desorption*, PD), termosprej (*thermospray*, TSI), elektrosprej (*electrospray*, ESI), desorpcję/jonizację laserem oraz desorpcję/jonizację laserem wspomaganą matrycą (*matrix-assisted laser*

desorption/ionization, MALDI) (Silverstein i in., 2012; Zaia, 2004). Obecnie w powszechnym użyciu najczęściej jako metodę jonizacji stosuje się EI, ESI oraz MALDI.



Ryc. 7. Schemat blokowy pomiaru za pomocą spektrometru masowego

Cząsteczki obdarzone ładunkiem oddziałują z polem magnetycznym, przez co możliwe jest kierowanie ich ruchem w warunkach wysokiej próżni, co ma miejsce w elementach optyki jonowej, takich jak soczewki, kwadrupole czy multipole. W zależności od rodzaju spektrometru, na etapie transferu jonów ze źródła do analizatora możliwa jest selekcja wybranych jonów oraz ich fragmentacja. Następnie naładowane cząsteczki analitów trafiają do analizatora mas, który umożliwia rozdzielenie jonów ze względu na stosunek masy do ładunku (m/z) i otrzymanie widma mas. Stosowane są różne rodzaje analizatorów mas, takie jak kwadrupol, pułapka jonowa (*ion trap*, IT), analizator czasu przelotu jonów (*time-of-flight*, TOF) oraz analizator rezonansu cyklotronowego (*ion cyclotron resonance*, ICR). Jony, po opuszczeniu analizatora mas, trafiają do detektora zliczającego, którym najczęściej jest powielacz diodowy, a sygnał uzyskany z detektora jest następnie rejestrowany przez jednostkę sterującą. Oprócz wykonania widma mas dającego informację o masie cząsteczkowej badanych związków, możliwa jest również analiza fragmentacyjna, w której analizowane jony są izolowane, a następnie fragmentowane na mniejsze jony składowe. Stosowane mogą być różne metody fragmentacji, przy czym najczęściej stosowaną metodą jest dysocjacja indukowana zderzeniowo (*collision induced dissociation*, CID), w której jony

analizowanych substancji zderzają się z cząsteczkami gazu, np. azotu czy argonu. Powstałe fragmenty są następnie analizowane ponownie w analizatorze mas (Lang i in., 2014). Analiza fragmentacyjna daje informacje na temat budowy fragmentowanych jonów. Do analizy danych niezbędne jest specjalne oprogramowanie, zazwyczaj udostępnione przez producenta, pozwalające na przypisanie poszczególnym sygnałom na widmie masowym ładunku, co umożliwi obliczenie masy cząsteczkowej jonu (Silverstein i in., 2012; Zaia, 2004).

4.6.1.1. Technika MALDI-TOF MS

W jonizacji typu MALDI z detekcją typu TOF analizowane są substancje wykrystalizowane w obecności drobnocząsteczkowych związków nazywanych matrycami. Matryca pochłania energię impulsu laserowego, która jest następnie przekazywana cząsteczkom analitu powodując ich jonizację. Najczęściej stosowanymi matrycami są kwasy organiczne zawierające grupę fenolową. Do analizy poli- i oligosacharydów stosuje się zazwyczaj kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB) i 2,4,6-trihydroksyacetonfenon (THAP). W identyfikacji bakterii i analizie peptydów stosuje się kwas α -cyjano-hydroksycynamonowy (HCCA). Białka takie jak toksyna krztuścowa analizowane są z wykorzystaniem kwasu synapinowego (SA) jako matrycy. Do analizy cząstek o masach do 2 000 Da można stosować desorpcję laserową bez wspomaganie matrycą. Obecnie do jonizacji typu MALDI stosuje się lasery azotowe, Nd:YAG emitujący promieniowanie w zakresie UV o długości fali $\lambda = 266$ nm, oraz zmodyfikowany laser Nd:YAG – Smartbeam II[®]. Różnica potencjałów pomiędzy stalową płytką a wewnątrz źródła powoduje transfer jonów do wnętrza spektrometru.

4.6.2. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR

NMR (*nuclear magnetic resonance*) jest powszechnie stosowaną nieniszczącą metodą analityczną opierającą się na oddziaływaniu jąder atomowych z silnym polem magnetycznym. Jądra atomowe takich pierwiastków jak ^1H , ^{13}C , ^{15}N , czy ^{31}P posiadają niezerowy spin magnetyczny, dzięki któremu w polu magnetycznym atomy te mogą występować w dwóch stanach energetycznych. Impuls elektromagnetyczny o określonej energii umożliwia przejście atomów na wyższy stan energetyczny. Energia potrzebna do wzbudzenia danego jądra atomowego jest nazwana jego częstością rezonansową i zależy od otoczenia chemicznego, w jakim znajduje się dane jądro atomowe. Ponieważ energia potrzebna do wzbudzenia jądra atomowego jest proporcjonalna do zastosowanego pola magnetycznego, częstość rezonansową określa się w wartościach „przesunięcia

chemicznego” w stosunku do sygnału odniesienia (Jacobsen, 2007). Obecnie stosuje się spektroskopy NMR wykorzystujące transformację Fouriera (FT-NMR) zbudowane z magnesu z układem wprowadzania próbki i sondą pomiarową, konsoli z układem wzmacniaczy sygnału i elektroniką transformującą sygnał oraz komputera sterującego. Zastosowanie silnego pola magnetycznego zwiększa czułość i rozdzielczość, dlatego stosuje się silne elektromagnesy nadprzewodzące pracujące w temperaturze ciekłego helu. Przyjęto oznaczać typ stosowanego magnesu poprzez częstość rezonansową jądra protonu ^1H , przykładowo magnes nadprzewodzący wytwarzający pole magnetyczne 14,1 T umożliwia wzbudzenie jądra protonu przy częstościach ok. 600 MHz.

Użyteczne sondy pomiarowe stosowane w analizie cukrów to dwukanałowa sonda szeroko pasmowa (BBI, *double resonance broadband probe*), umożliwiająca obserwację takich jąder atomowych jak ^1H i ^{13}C oraz poczwórna inwersyjna kriosonda pomiarowa (QCI, *quadruple resonance CryoProbe*), która charakteryzuje się w przybliżeniu 4- i 10-krotnie większą czułością odpowiednio dla atomu ^{13}C i ^1H niż standardowe sondy, typu BBI, co umożliwia analizowanie znacznie mniejszych ilości próbki, często poniżej 0,5 mg. W przypadku małych ilości materiału, szczególnie przydatna jest mikrosonda, TXI, w której stosuje się probówki o średnicach od 1 do 2,5 mm i objętości próbki $\leq 50 \mu\text{l}$.

W przypadku analizy oligo- czy polisacharydów dane uzyskane metodą NMR mogą dostarczyć cennych informacji na temat liczby i rodzaju składników cukrowych, anomerii wiązań glikozydowych, sekwencji reszt cukrowych oraz obecności podstawników, takich jak grupy O-acetylowe (OAc), fosforanowe (P), aminokwasy czy etanolamina (Etn) (Duus i in., 2000). Do uzyskania wymienionych informacji wykorzystuje się następujące dane:

- Przesunięcie chemiczne – pozycja obserwowanego sygnału w widmie NMR, wyrażana w częściach na milion, ppm (*part per milion*). Przesunięcie chemiczne jest wartością charakterystyczną dla danego jądra atomowego w określonym otoczeniu chemicznym. Poprzez porównanie wartości przesunięcia chemicznego badanego związku z danymi literaturowymi można wnioskować o obecności charakterystycznych grup chemicznych.
- Stałe sprzężenia (J) – parametr określający oddziaływanie pomiędzy spinami magnetycznymi co najmniej dwóch jąder atomowych. Stała ta jest zależna od typów oddziałujących jąder atomowych oraz od ich wzajemnej orientacji przestrzennej. W przypadku protonów przy sąsiadujących atomach węgla

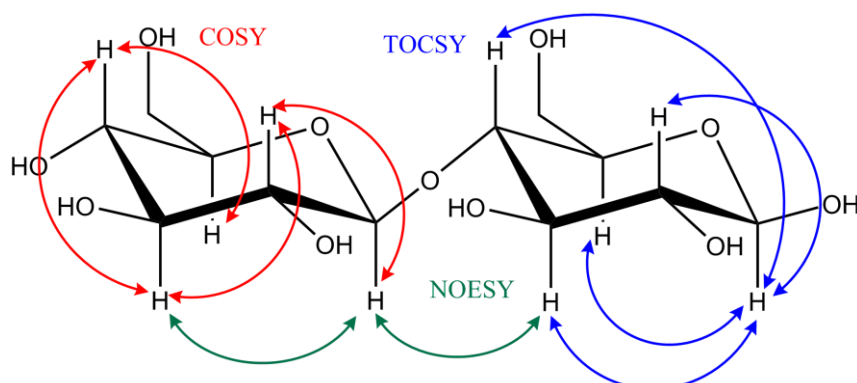
(atomach wicynalnych) stała ta przyjmuje różne wartości w zależności od izomerii rozmieszczenia tych protonów. W przypadku orientacji ekwatorialno-ekwatorialnej stała J przyjmuje wartości $\sim 1-3$ Hz, ekwatorialno-aksjalnej $\sim 1-6$ Hz, a dla aksjalno-aksjalnej $\sim 7-12$ Hz.

- Intensywność sygnału – na widmach jednowymiarowych (^1H NMR) jest wprost proporcjonalna do liczby jąder atomowych dających sygnał. Dla widm dwuwymiarowych jest to trudniejsze ponieważ wymaga przeprowadzenia integracji objętości „szczytu”. Dane na temat względnej intensywności danych sygnałów można wykorzystać do oznaczenia liczby składników cukrowych oraz podstawników.

Dwuwymiarowe eksperymenty NMR umożliwiają obserwację korelacji pomiędzy atomami tego samego pierwiastka (tzw. eksperymenty homojądrowe) lub różnych pierwiastków (eksperymenty heterojądrowe). W zależności od typu wykonywanego eksperymentu obserwowane są korelacje pomiędzy atomami będącymi w odpowiednich relacjach – strukturalnych bądź przestrzennych. Do najczęściej wykorzystywanych eksperymentów dwuwymiarowych NMR w analizie oligosacharydów należą:

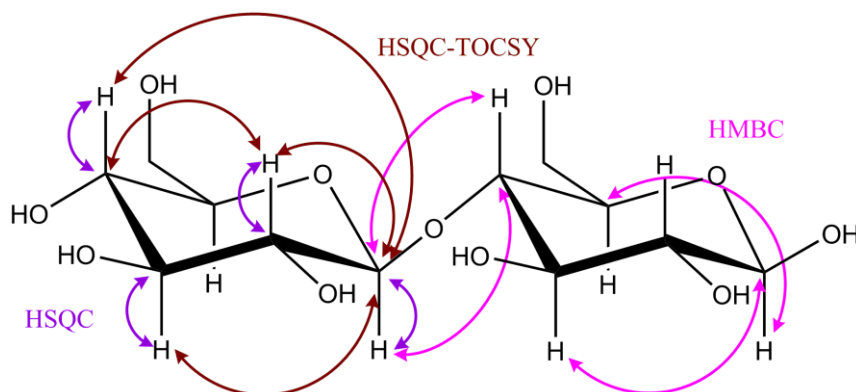
- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (*correlation spectroscopy*) – homojądrowy eksperyment spektroskopii korelacji, w którym obserwuje się korelacje pomiędzy protonami związanymi z sąsiadującymi atomami węgla (sprzężenia przez maksymalnie trzy wiązania chemiczne), np. protonem anomerycznym a protonem przy drugim atomie węgla (H1-H2).
- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY (*total correlation spectroscopy*) – analogiczny do COSY eksperyment homojądrowy, w którym obserwuje się dodatkowo sprzężenia pomiędzy protonami odległymi o 3 i więcej wiązań, np. H1-H3, H1-H4 itd. Transfer magnetyzacji i tym samym liczba obserwowanych korelacji zależy od parametru określanego jako „czas mieszania spinów” (*mixing time*) oraz wartości stałej sprzężeń (J) pomiędzy poszczególnymi protonami w danej reszcie cukrowej.
- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*) – homojądrowy eksperyment, w którym obserwuje się korelację pomiędzy protonami w wyniku transferu magnetyzacji przez przestrzeń, przez jądrowy efekt Overhausera. Dzięki temu możliwe jest obserwowanie korelacji pomiędzy protonami odległymi o wiele wiązań, a także korelacji między protonami reszt cukrowych będących w bliskim

sąsiedztwie na skutek utworzenia wiązania glikozydowego, lub określonej dla danej konfiguracji orientacji przestrzennej.



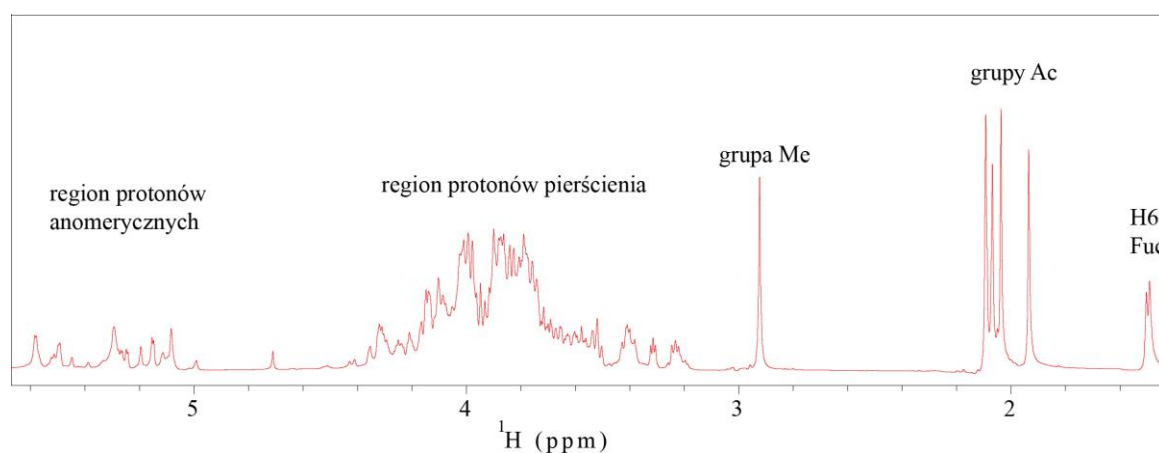
Ryc. 8. Przykładowe korelacje możliwe do zaobserwowania na dwuwymiarowych widmach protonowych podczas analizy poli- i oligosacharydów. Kolorem czerwonym zaznaczono korelacje dla eksperymentu COSY, niebieskim dla TOCSY, a zielonym dla NOESY

- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) – eksperyment heterojądrowy, w którym obserwuje się korelacje pomiędzy atomami węgla, a przyłączonymi do nich bezpośrednio protonami, np. proton związany z atomem węgla anomerycznego (C1-H1). Eksperyment ten umożliwia przyporządkowanie wartości przesunięcia chemicznego atomom węgla połączonym ze zidentyfikowanym uprzednio sygnałem protonu.
- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) – eksperyment heterojądrowy umożliwiający obserwowanie korelacji pomiędzy atomem węgla, a protonami odległymi o 2, 3 wiązania chemiczne. Umożliwia obserwację korelacji pomiędzy atomami dwóch systemów spinowych (reszt cukrowych), poprzez korelację atomów w obrębie wiązań glikozydowych, co wykorzystuje się do identyfikacji miejsca podstawienia, identyfikacji segmentów dwucukrowych i sekwencji reszt cukrowych w poli- i oligosacharydach.
- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY – kombinacja eksperymentów typu HSQC i TOCSY, w którym obserwuje się korelacje pomiędzy atomem węgla, a protonami z danego systemu spinowego, np. C1-H2, C1-H3, itd. Eksperyment ten umożliwia opis sygnałów w złożonych systemach spinowych z wieloma nakładającymi się sygnałami rezonansowymi.



Ryc. 9. Przykładowe korelacje możliwe do zaobserwowania na dwuwymiarowych widmach protonowo - węglowych podczas analizy oligosacharydów. Kolorem fioletowym zaznaczono korelacje dla eksperymentu HSQC, różowym dla HMBC, a brązowym dla HSQC-TOCSY

Na podstawie jednowymiarowych widm NMR nie można ustalić struktury analizowanego polisacharydu. Można natomiast zidentyfikować sygnały o przesunięciach chemicznych, których obecność wskazuje na składniki polisacharydów i pośrednio na strukturę. Na jednowymiarowych widmach NMR analizowanych polisacharydów można zaobserwować trzy grupy sygnałów. Te rezonujące w zakresie 3,2-3,9 ppm są sygnałami pochodzącymi od protonów pierścienia. Sygnały o przesunięciach chemicznych wyższych od 3,9 ppm i niższych od 3,2 ppm nazywane są sygnałami strukturalnych grup reporterowych. Do tej grupy należą: protony anomeryczne, H2 Man, H3-H4 Gal, H5-H6 Fuc, H2-H5 GalNAc, protony grup alkilowych, acylowych, metylowych, acetylowych i glikolowych oraz protony o innych przesunięciach chemicznych wywołanych podstawieniem grup fosforanowych, siarczanowych i acylowych (Vliegthart i Kamerling 2007). Przykładowe widmo ^1H NMR oligosacharydu z zaznaczonymi strukturalnymi grupami reporterowymi przedstawiono na Ryc. 10.



Ryc. 10. Profil jednowymiarowego widma ^1H NMR oligosacharydu

5. CEL PRACY

Światowa Organizacja Zdrowia już pod koniec lat 90. zakwalifikowała krztusiec jako jedną z nawracających chorób o niebagatelnym potencjale epidemiologicznym. Pomimo szeroko rozpowszechnionych szczepień ochronnych odnotowuje się coraz więcej zachorowań, nie tylko wśród najbardziej wrażliwej grupy, czyli noworodków, ale również wśród zaszczepionych nastolatków i dorosłych. Globalnie prowadzone szczepienia wywołały u bakterii dryf antygenowy. Zmianie ulegają zarówno struktury jak i ilości wytwarzanych przez *B. pertussis* antygenów białkowych stosowanych w szczepionkach. Zidentyfikowano nowe gatunki wywołujące podobne objawy chorobowe, niewytwarzające większości białkowych czynników wirulencji jak *B. holmesii*. W porównaniu z antygenami białkowymi powierzchniowe antygeny cukrowe *B. pertussis* są ewolucyjnie stabilne (LPS, LOS), a struktury te mają konserwatywny charakter u różnych przedstawicieli *Bordetellae*. Niewiele wiadomo natomiast o antygenach typu kapsularnego i egzopolisacharydach wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Bordetella* i ich potencjalnych zastosowaniach szczepionkowych.

Głównym celem powstania tej pracy było zidentyfikowanie w powierzchniowych strukturach antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* wspólnych elementów, których wyizolowane formy mogłyby zostać wykorzystane przy zaprojektowaniu nowej uniwersalnej szczepionki przeciwkrztuścowej. Szczepionka taka zapewniałaby ochronę, nie tylko przed zakażeniem *B. pertussis*, ale również przed innymi bakteriami z rodzaju *Bordetella*. Do analiz wybrano gatunki, które wywołują krztusiec (*B. pertussis*), parakrztusiec (*B. parapertussis*, *B. holmesii*) oraz choroby układu oddechowego (*B. bronchiseptica*).

6. MATERIAŁY I METODY

6.1. Szczepy *Bordetella* i warunki hodowli

Bordetella pertussis 186 i *Bordetella pertussis* 606 uzyskano z Zakładu Profilaktyki Zakazań i Zakazań Szpitalnych Narodowego Instytutu Leków w Warszawie. *Bordetella parapertussis* PCM 529 (ATCC 15311), *Bordetella bronchiseptica* PCM 530 (ATCC 19395) i *Bordetella bronchiseptica* PCM 1943 (ATCC 4617) pochodziły z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN we Wrocławiu. *Bordetella holmesii* (DSM 13416; ATCC 51541), *Bordetella hinzii* (DSM 11333; ATCC 51783) oraz *Bordetella petrii* (DSM 12804) pozyskano z Leibniz-Institut DSMZ GmbH w Niemczech. *B. hinzii* oraz *B. petrii* nie należą do klasycznych *Bordetellae*, ani nie są czynnikiem etiologicznym krztuśca, dlatego nie analizowano ich pod kątem podobieństwa struktur LPS. Do badań nad egzopolisacharydami zostały dołączone w celu sprawdzenia, czy gatunki spoza klastra *B. bronchiseptica* również wytwarzają EPS.

Wymienione szczepy są przechowywane w objętości 1,5 ml w temp. -70 °C jako zawiesiny bakteryjne w PBS z zawartością 20% glicerolu. Bakterie namnażano na agarowych podłożach węglowych z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi baraniej (GRASO Biotech) w 37 °C przez 96 godzin. W przypadku *B. bronchiseptica* czas ten jest znacznie krótszy, a *B. holmesii* wymaga niższej temperatury oraz atmosfery wzbogaconej o CO₂. Szczegółowe warunki wzrostu podano w Tabeli 4.

Tabela 4. Warunki wzrostu bakterii z rodzaju *Bordetella*

Bakterie	Czas wzrostu na płytce	Temperatura	Warunki atmosferyczne	Wytwarzanie pigmentu
<i>B. pertussis</i>	3-4 dni	37 °C	21% O ₂	-
<i>B. parapertussis</i>	2-3 dni	37 °C	21% O ₂	brązowy
<i>B. holmesii</i>	3-4 dni	35 °C	21% O ₂ 5% CO ₂	brązowy
<i>B. bronchiseptica</i>	1 dzień	37 °C	21% O ₂	-
<i>B. hinzii</i>	1 dzień	37 °C	21% O ₂	-
<i>B. petrii</i>	1-2 dni	30 °C	21% O ₂	-

Hodowle płynne *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* prowadzone były na syntetycznej pożywce Stainer–Scholte (skład pożywki opisano w Tabeli 5) z wytrząsaniem (37 °C, 120 rpm, Infors HT Ecotron). Dla lepszego wzrostu bakterii do wszystkich pożywek syntetycznych, niezależnie od gatunku, dodawane były czynniki

wzrostu. Hodowle prowadzono przez 72 godz. (*B. pertussis*, *B. parapertussis*) oraz 24 godz. (*B. bronchiseptica*, *B. hinzii* oraz *B. petrii*).

Hodowla płynna *B. holmesii* prowadzona była w pożywce z wyciągiem mózgowo-sercowym (Brain-Heart Infusion, BHI) oraz alternatywnie w pożywce Stainer–Scholte i zmodyfikowanych mediach Stainer–Scholte ze zwiększonym stężeniem L-glutaminianu sodu¹ oraz L-proliny² (Dehottay i in., 2017) i Stainer–Scholte z dodatkiem ryboflawiny (Odanaka i in., 2017).

Gęstość optyczną bakterii (OD) w hodowlach płynnych mierzono densytometrem DEN-1 (BioSan) przy długości fali $\lambda = 560$ nm, w jednostkach McFarlanda (MFU ang. *McFarland units*). Zakres jednostek McFarlanda to 0,3-5,0 MFU, co odpowiada zakresowi 100×10^6 - 1500×10^6 komórek bakteryjnych w 1 ml.

Tabela 5. Składy pożywek do hodowli bakterii z rodzaju *Bordetella*

Pożywki	Odczynniki	g/L
Stainer–Scholte pH 7,9	L-glutaminian sodu	10,72
	¹ L-glutaminian sodu	20
	L-prolina	0,24
	² L-prolina	1,04
	KHPO ₄	0,5
	NaCl	2,5
	KCl	0,2
	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,1
	CaCl ₂	0,02
	Tris	6,1
	ryboflawina	0,01
	heptakis	1
agar węglowy	lab lemco powder	10
	pepton	10
	skrobia	10
	węgiel	4
	NaCl	5
	kwas nikotynowy	0,001
	agar	12
BHI	hydrolizat tkanki zwierzęcej (wyciąg sercowo-mózgowy)	27,5
	D(+)-glukoza	2
	NaCl	5
	Na ₂ HPO ₄	2,5
czynniki wzrostu	kwas nikotynowy	0,004
	L-cysteina HCl H ₂ O	0,04
	zredukowany glutation	0,15
	kwas L-askorbinowy	0,4
	FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,01

Hodowla płynna zakładana była poprzez zawieszenie bakterii na płycie z odpowiednim podłożem i przeniesieniu ich do pożywki płynnej. Objętość inokulum stanowiła około 4% (1,6-2,0 MFU). Hodowle bakteryjne w objętości 1 L (4 x 250 ml) prowadzone były z wytrząsaniem (Infors HT Ecotron 120 rpm) oraz zastosowaniem odpowiedniej temperatury (35 °C lub 37 °C). Alternatywnie hodowle bakteryjne prowadzono w bioreaktorze Biostat A plus (Sartorius) w objętości 4 L, inokulum 1%, z mieszaniem 120 rpm i względnym ciśnieniu przy napowietrzaniu 1,0 bar.

W celu izolacji egzopolisacharydów bakteryjnych hodowle płynne *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii* oraz *B. petrii* prowadzone były w objętości 250 ml, w medium hodowlanym Stainer–Scholte z dodatkiem ryboflawiny przez 72 godz.

Hodowle bakteryjne na podłożach płynnych przerywano przez dodanie 90% roztworu fenolu do końcowego stężenia 1% i inkubację przez 1 godz. Zawiesinę bakteryjną wirowano przez 30 min, przy $4000 \times g$, w temp. 4 °C (Sorvall Lynx 6000), po czym osad zawieszano w wodzie mQ i liofilizowano.

6.2. Metody preparatywne

6.2.1. Izolacja i oczyszczanie lipopolisacharydów oraz lipooligosacharydów

LPS bakterii z rodzaju *Bordetella* otrzymywano zmodyfikowaną metodą ekstrakcji wodno-fenolowej według Westphala i Janna (Westphal i Jann, 1965). Zabite i zliofilizowane bakterie zawieszano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,4 i dodawano porcjami lizozym (E.C. 3.2.1.17, aktywność specyficzna ≥ 40000 U/mg) w ilości 10 mg/g suchej masy bakteryjnej (Johnson i Perry, 1976). Zawiesinę homogenizowano sondą ultradźwiękową (Bandelin Sonoplus GM 2070, w cyklach 10 s, z max. mocą 70 W, temp. <40 °C) do uzyskania jednolitej zawiesiny i pozostawiono z mieszaniem przez 18 godz. w temp. 25 °C. Do mieszaniny dodawano roztwór 90% fenolu w objętości równej objętości użytego buforu, uzyskując ostatecznie zawiesinę bakterii w 45% fenolu. Zawiesinę ogrzewano do temperatury 65 °C i intensywnie mieszano przez 15 min, a następnie ochładzano w łaźni lodowej do 4 °C i wirowano (30 min, $3000 \times g$, 4 °C, Sorvall Lynx 6000). Zbierano oddzieloną frakcję wodną. Zawiesinę uzupełniano porcją wody o objętości zebranej fazy wodnej i powtarzano ekstrakcję. Zbierano wszystkie fazy. Fazę wodną, międzyfazę oraz fazę fenolową umieszczano w osobnych workach dializacyjnych Zellu Trans T3 (Roth, Niemcy) o granicy

przepuszczania cząsteczek o masie do 10 kDa, intensywnie dializowano do wody destylowanej przez 3 dni, aż do zaniku zapachu fenolu. Preparaty po dializie odwirowywano (20 min, $3000 \times g$, $4^\circ C$, Sorvall Lynx 6000), supernatant filtrowano z użyciem sączków bibułowych Whatmann 3. Dializat liofilizowano. Uzyskane preparaty LPS oczyszczano od białek i kwasów nukleinowych poprzez trzykrotne ultrawierowanie (6 godz., $105000 \times g$, $4^\circ C$, Sorvall WX+). Supernatant po każdorazowym ultrawierowaniu zlewano, a osad LOS/LPS zawieszano sondą ultradźwiękową w wodzie mQ i liofilizowano.

6.2.2. Otrzymywanie poli- i oligosacharydów z LPS

Otrzymany LPS poddawano łagodnej hydrolizie 1,5% kwasem octowym w $100^\circ C$ przez 30 min w celu zerwania kwasolabilnego wiązania między resztą Kdo oligocukru rdzenia a lipidem A. Powstały osad lipidu A usuwano przez wirowanie na wirówce szybkoobrotowej (30 min, $13000 \times g$, $4^\circ C$, Sorvall Lynx 6000), a supernatant zawierający rozpuszczalne w wodzie polisacharydy (PS) i oligosacharydy (OS) zliofilizowano.

6.2.3. Izolacja egzopolisacharydów bakteryjnych

Egzopolisacharydy izolowane były z liofilizowanych mediów pochodzących, *B. pertussis* 186, *B. pertussis* 606, *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* 530, *B. bronchiseptica* 1943, *B. holmesii*, *B. hinzii* oraz *B. petrii*. Hodowle bakteryjne prowadzono przez 72 godz. na syntetycznej pożywce Stainer–Scholte z ryboflawiną. Po odwirowaniu masy bakteryjnej (30 min, $4000 \times g$, $4^\circ C$, Sorvall Lynx 6000) supernatant liofilizowano. Zliofilizowany supernatant rozpuszczano w 0,05 M kwasie octowym i rozdzielano w systemie HPLC metodą filtracji żelowej na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 30 prep grade (30 mm x 124 cm, wielkość ziarna $34 \mu m$, GE Healthcare, USA). Frakcje po rozdzieleniu liofilizowano.

6.2.4. Redukcja egzopolisacharydów

Egzopolisacharydy izolowane z medium po hodowli *B. holmesii* oraz *B. pertussis* 186 (odpowiednio 2,2 mg, 3,5 mg) poddano reakcji redukcji przy zastosowaniu borowodorku sodu ($NaBH_4$, 11 mg). Reakcję prowadzono w obj. 2 ml w pH 8,0 przez 18 godz. w temp. $37^\circ C$, a następnie reakcję zatrzymano przez obniżenie pH do 5 - 6 przy zastosowaniu 99% kwasu octowego. Produkty reakcji oczyszczano od soli przy użyciu systemu HPLC na kolumnie typu TSKgel G3000PW. Zebrane frakcje liofilizowano.

6.2.5. Utlenianie oligosacharydów

Analizowane oligosacharydy poddano reakcji łagodnego utleniania w obecności 10 mM nadjodanu sodu (NaIO_4). W warunkach tych dochodzi do utlenienia reszt cukrowych zawierających wicynalne grupy hydroksylowe poza pierścieniem i utworzenia reaktywnych grup aldehydowych. Dla oligosacharydów izolowanych z LPS ilość stosowanego NaIO_4 dobiera się molowo z dwukrotnym nadmiarem względem oligosacharydu, aby utlenieniu uległa reszta Kdo i ewentualnie reszta heptozy w regionie wewnętrznego rdzenia (jeśli są obecne w OS) lub inne pochodne zawierające wicynalne grupy hydroksylowe (np. po redukcji). Reakcję prowadzono przez 1 godz., w ciemności, w temp. 25 °C. Równolegle przygotowano kontrolę stanowiącą roztwór 0,01 M NaIO_4 . Postęp reakcji monitorowano spektrofotometrycznie śledząc zmianę absorpcji przy długości fali $\lambda = 225$ nm dla 200-krotnie rozcieńczonej mieszaniny reakcyjnej w wodzie mQ. Po 1 godz. dodawano glikolu etylenowego (30 μl), w celu zatrzymania reakcji i inkubowano kolejną godzinę. Utlenione oligosacharydy oczyszczano od glikolu etylenowego i soli przy użyciu systemu HPLC na kolumnie typu TSKgel G3000PW. Uzyskane frakcje oligocukrowe liofilizowano.

6.2.6. Uzyskanie monomerycznej frakcji toksoidu tężca

Preparat toksoidu tężca (2030 Lf/ml, Biomed, Kraków) oczyszczano z użyciem systemu HPLC na kolumnie TSKgel G3000SW w PBS. Główną frakcję zawierającą monomeryczny toksoid tężca (TTd) zagęszczono w koncentratorach wirówkowych Amicon[®] 30 K (Merck Milipore, Niemcy). Stężenie toksoidu tężca wyznaczano na podstawie wartości absorbancji przy długości fali $\lambda = 280$ nm, stosując współczynnik absorbancji $\epsilon_{\text{TTd}} = 1,229 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Lockyer i in., 2015). Pomiary absorbancji przeprowadzono na czytniku Multilabel Reader EnSpire 2300 (PerkinElmer, USA).

6.2.7. Otrzymywanie neoglikokoniugatów

Oligocukry z reaktywną grupą aldehydową otrzymane w wyniku utleniania (rozdz. 6.2.5) rozpuszczano w 0,2 M buforze boranowym (pH 9,0) i dodawano białko nośnikowe toksoid tężca. Inkubowano przez 1 godz. w 37 °C. Następnie dodawano 160 μl 1 M roztworu NaCNBH_3 (Sterogene, USA) oraz 1 kroplę chloroformu (konserwant) i pozostawiano na 14 dni w 37 °C. W piątym i dziesiątym dniu reakcji dodawano kolejne porcje NaCNBH_3 (160 μl). Po 14 dniach inkubację przerywano, a mieszaninę rozdzielano za pomocą HPLC na kolumnie TSKgel G3000SW. Frakcje zawierające glikokoniugat połączono i zagęszczono w koncentratorach wirówkowych

Amicon[®] 30 K (Merck Milipore, Niemcy). Koniugaty przechowywano w 4 °C z dodatkiem 0,02% mertiolatu jako konserwantu. Zawartość białka w zagęszczonej frakcji oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 280$ nm.

6.3. Metody immunochemiczne

6.3.1. Stosowane glikokoniugaty i surowice

W reakcjach immunoenzymatycznych zastosowano neoglikokoniugaty oraz surowice, uzyskane w czasie realizacji zadania badawczego „Szczepionki przeciwbakteryjne nowej generacji. Otrzymywanie, charakterystyka immunochemiczna, właściwości ochronne”, wykonywanego w ramach projektu POIG.01.01.02-02-003/08-00 pn.: „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, Oś priorytetowa 1 „Badania i rozwój nowoczesnych technologii”, Działanie 1.1 „Wsparcie badań naukowych dla budowy gospodarki opartej na wiedzy” („Projekt BioMed”).

Jako antygeny cukrowe zastosowano oligosacharyd (OS) wyizolowany z LOS *B. pertussis* 186 uzyskany w wyniku hydrolizy 1,5% kwasem octowym oraz jego dystalny pentasacharydowy (penta) fragment otrzymywany w wyniku procesu deaminacji metodą jak opisano poprzednio (Niedziela i in., 2005). Jako białka nośnikowe wykorzystano toksynę krztuścową (PT) oraz toksoid tężca (TTd). W pracy wykorzystano koniugaty znajdujące się w kolekcji Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN:

- koniugat oligosacharydu z toksyną krztuśca (OS-PT),
- koniugat pentasacharydu z toksyną krztuśca (penta-PT),
- koniugat oligosacharydu z toksoidem tężca (OS-TTd),
- koniugat pentasacharydu z toksoidem tężca (penta-TTd)
- koniugat syntetycznego disacharydu z ludzką albuminą (disach-HSA). Fragment cukrowy zbudowany jest z α -D-N-acetyloglukozaminy oraz kwasu α -D-2,3-diacetamido-2,3-dideoksymannouronowego będących fragmentem dystalnego trójcukru. (Nilsson i Norberg, 2000).

Koniugaty OS-PT i penta-PT są ściśle zdefiniowane i chronione patentem na terenie UE (EP 3003389 B1) i USA (US 9878051 B2) (Koj i in., 2018, 2019). Nowo zsyntetyzowanym glikokoniugatem jest koniugat BOS z toksoidem tężca (BOS-TTd).

W reakcjach identyfikujących wybrane polisacharydy korzystano również z komercyjnie dostępnego polisacharydu kapsularnego Vi, wyizolowanego z *Citrobacter freundii* (NIBSC).

Wykorzystane w pracy surowice anty-glikokoniugatowe pochodziły z kolekcji surowic Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek:

- Surowica anty-penta-PT (surowica nr 9) – otrzymana poprzez immunizację królików glikokoniugatem pentasacharydu oraz toksyny krztuścowej.
- Surowica anty-OS-PT (surowica nr 3382) – uzyskana w wyniku immunizacji królików glikokoniugatem pentasacharydu oraz toksyny krztuścowej.
- Surowica anty-OS-TTd (surowica nr 7) – uzyskana w wyniku immunizacji królików glikokoniugatem oligosacharydu oraz toksoidu tężca.
- Surowica anty-penta-TTd (surowica nr 778) – otrzymana w wyniku immunizacji królików glikokoniugatem pentasacharydu oraz toksoidu tężcowego.
- Surowica poliklonalna zawierająca przeciwciała przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym *B. pertussis* 186 (surowica nr 782) - anty-SM Bp 186.
- Surowica poliklonalna – anty-SM Bp miks (surowica nr 285, 289) zawierająca królicze przeciwciała skierowane przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym 4 szczepów *B. pertussis* 186/576/606/629.
- Surowica anty-disach-HSA (surowica nr 63) uzyskana w wyniku immunizacji królików glikokoniugatem syntetycznego disacharydowego fragmentu z dystalnego trójcukru LOS *B. pertussis* 186 z ludzką albuminą (HSA).
- Surowica anty-Vi do aglutynacji szkiełkowej bakterii *Salmonella* dla powierzchniowego antygeny Vi (Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella „Immunolab”).
- Surowica poliklonalna anty-LPS *P. shig* 78/89 zawierająca przeciwciała przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym *P. shigelloides* 78/89.

W formulacji szczepionkowej dla glikokoniugatów penta-PT, OS-PT i OS-TTd jako adiuwantu użyto MPL, a dla koniugatów penta-TTd i disach-HSA użyto kompletnego adiuwantu Freund. Immunizacje pełnymi komórkami bakteryjnymi przeprowadzono zawiesiną bakterii w PBS zabitych 0,2% formaldehydem. Do immunizacji wykorzystano szczep *B. pertussis* 186 (namnażanych w pożywce płynnej Stainer-Scholte) oraz mieszaninę czterech szczepów *B. pertussis* 186/576/606/629 (hodowanych na płytkach z agarem węglowym).

6.3.2. Elektroforeza w warunkach denaturujących i immunoblotting

6.3.2.1. Elektroforeza SDS-PAGE

Rozdział elektroforetyczny lipopolisacharydów w warunkach denaturujących SDS-PAGE prowadzony był w 15% żelu poliakrylamidowym według Laemmliego (Laemmli, 1970). Skład żeli poliakrylamidowych przedstawiono w Tabeli 6. Skład buforów używanych do elektroforezy oraz immunoblotingu podano w Tabeli 7. Wodne roztwory LPS o stężeniu 1 mg/ml homogenizowano sondą ultradźwiękową (Bandelin Sonoplus GM 2070) następnie mieszano z buforem denaturującym w stosunku 1:1 i inkubowano w łaźni wodnej w temp. 100 °C przez 20 min. Próbkę (1,25 µg) nanoszono do studzienek w objętości 2,5 µl. Elektroforeza prowadzona była w buforze do rozdzielania przy natężeniu prądu 20 mA na płytkę (wymiary 100 x 80 x 1 mm), do momentu wejścia próbki w żel rozdzielający, a następnie przy natężeniu 40 mA przez ok. 40 min, do chwili kiedy niskocząsteczkowy barwnik (błękit bromofenolowy) zaczynał opuszczać żel. Rozdzielone lipopolisacharydy wybarwiano metodą srebrną lub analizowano w immunoblottingu.

Tabela 6. Skład żeli elektroforetycznych stosowanych w elektroforezie preparatów LPS

Składnik	15% żel rozdzielający	2,5% żel zagęszczający
rozwór akrylamid : bisakrylamid w mQ (30% : 0,8%)	15 ml	2,5 ml
3 M bufor Tris-HCl, pH 8,8	3,75 ml	5 ml
woda mQ	9,45 ml	11,3 ml
10% SDS	0,3 ml	0,2 ml
1,5% nadsiarazan amonu	1,5 ml	1 ml
TEMED	15 µl	15 µl

Tabela 7. Skład buforów stosowanych w elektroforezie preparatów LPS oraz w teście immunoblotingu

Bufor denaturujący	65 mM Tris
	30% glicerol
	2% SDS
	0,6 M DTT
	0,001% błękit bromofenolowy
Bufor do rozdzielania pH 8,3	25 mM Tris
	192 mM glicyna
	0,1% SDS
Bufor do transferu pH 8,3	25 mM Tris
	192 mM glicyna
	20% metanol
Bufor do blotu pH 9,6	50 mM Tris-Cl

	0,85% NaCl
	1 mM MgCl ₂

6.3.2.2. Wybarwienie lipopolisacharydów metodą srebrową

Lipopolisacharydy rozdzielone w żelu elektroforetycznym barwiono srebrem według procedury opisanej przez Tsai i Frasch (Tsai i Frasch, 1982). Żel po elektroforezie przeniesiono do roztworu 25% izopropanolu z 7% kwasem octowym i inkubowano w 25 °C przez 18 godz. Następnie żel przeniesiono do 0,7% roztworu kwasu nadjodowego (HIO₄) na 5 min z mieszaniem. Po trzykrotnym płukaniu wodą przez 15 min, żel inkubowano w amoniakalnym roztworze azotanu srebra (250 ml roztworu zawierającego 28 ml 1 M NaOH, 2 ml 35% NH₄OH, 5 ml 20% AgNO₃ i 115 ml H₂O), przez 10 min z mieszaniem. Żel płukano wodą mQ (3 x 10 min). Następnie przeprowadzano reakcję barwną dodając do krystalnicy z żelem, roztworu 0,26 mM kwasu cytrynowego z 125 µl 35% formaldehydu. Inkubację przerywano po pojawieniu się wyraźnych barwnych prążków. W celu zahamowania reakcji żel odpłukiwano kilkakrotnie wodą mQ, a następnie archiwizowano wykonując zdjęcia.

6.3.2.3. Immunoblotting

Po elektroforezie żel płukano przez 20 min w buforze do transferu. Transfer rozdzielonych frakcji lipopolisacharydów z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową (GE Healthcare, USA) prowadzono przy natężeniu prądu 100 mA przez 1 godz. w buforze do transferu. Nitrocelulozę blokowano przez 30 min w temp. 37 °C w 2% roztworze kazeiny w TBS po czym płukano jednokrotnie TBS i poddawano reakcji z odpowiednią surowicą w rozcieńczeniu 1 : 200 w TBS zawierającym 0,2% kazeinę. Reakcje prowadziło przez 18 godz. z wytrząsaniem w temp. 25 °C. Niezwiązane przeciwciała odpłukano jednokrotnie wodą mQ oraz trzykrotnie buforem TBS z mieszaniem (składy buforów podano w Tabeli 7). Membrana była następnie inkubowana z wytrząsaniem przez 90 min, w temp. 37 °C z roztworem kozich przeciwciał skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (AP) (rozcieńczenie 1 : 2000 w 0,2% kazeinie w TBS) skierowanych przeciwko króliczym IgG (Bio-Rad, USA). Następnie niezaadsorbowane przeciwciała trzykrotnie odpłukano TBS. Reakcję wywoływano przez dodanie roztworu substratów – BCIP (2,5 mg) oraz NBT (5 mg) w buforze do blotu (20 ml) i inkubowano do momentu pojawienia się wybarwionych frakcji. Reakcję przerywano przez umieszczenie membrany w mieszaninie etanol/woda/kwas octowy 4,5 : 4,5 : 1 oraz kilkakrotne płukanie wodą mQ (Petersson i in., 1997).

6.3.2.4. Dot-blotting

Na membranę nitrocelulozową nakładano punktowo wodne roztwory glikokoniugatów, frakcji EPS, zawieszonych bakterii, oraz LPS i LOS w stężeniu 1mg/ml w ilości 2 µl. Następne etapy blokowania membrany oraz inkubacja z odpowiednimi przeciwciałami są takie same jak w procedurze immunoblottingu (rozdział 6.3.2.3).

6.4. Metody analizy chemicznej

6.4.1. Częściowa hydroliza polisacharydów w kontrolowanych warunkach

W celu ustalenia wielkości podjednostki, długie łańcuchy polisacharydowe poddano częściowej hydrolizie w 48% kwasie fluorowodorowym. Do 0,2 mg polisacharydu dodano 200 µl roztworu HF i dokładnie wymieszano. Rozpipetowano po 10 µl do 20 próbek Eppendorf i umieszczono w temp. -20 °C. Każdego dnia do kolejnej próbki dodawano 0,5 ml wody mQ do MALDI-TOF MS i po zamrożeniu liofilizowano. Materiał z każdego kolejnego dnia rozpuszczano w 1 µl wody mQ do MALDI-TOF MS i po zmieszaniu z matrycą DHB w stosunku 1:1 i nałożeniu na płytkę stalową postęp hydrolizy monitorowano przez pomiary widm MALDI-TOF MS oceniając stopień degradacji badanego polisacharydu.

6.4.2. Analiza cukrowa polisacharydów

Analizę cukrową przeprowadzono metodą Janssona i wsp. (Jansson i in., 1976) Materiał hydrolizowano (0,4 mg) w 2 M kwasie trójfluorooctowym (CF₃COOH, TFA) w zamkniętej próbówce przez 2 godz. w temp. 120 °C. Roztwór TFA odparowano strumieniem powietrza, a uwolnione cukry zredukowano wodnym roztworem borowodoru sodu (NaBH₄, 8 mg) przez 18 godz. w 37 °C. Mieszaninę reakcyjną zakwaszono stężonym CH₃COOH do uzyskania pH ~5-6, a powstały w tej reakcji kwas borny (CH₃O)₃B usuwano rozpuszczając materiał w roztworze metanol/ 5% kwas octowy (9:1) i odparowując lotne estry metylowe kwasu bornego. Procedurę powtarzano pięciokrotnie. Uzyskane alditole acetylowano bezwodnikiem kwasu octowego w pirydynie (1:1) w 100°C przez 1 godz.

6.4.3. Analiza metylacyjna polisacharydów

Analizę metylacyjną przeprowadzono według metody Ciucanu'ego i Kereka (Ciucanu i Kerek, 1984). Próbkę materiału (0,5 mg) rozpuszczono w 0,5 ml bezwodnego DMSO, szczelnie zamknięto i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 15 min. Następnie dodawano bezwodny NaOH (3-4 mg) i umieszczono na łaźni ultradźwiękowej

na 5 min. Mieszaninę schłodzono do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i dodano 1 ml jodku metylu (CH_3I). Reakcję metylacji prowadzono przez 20 min w łaźni ultradźwiękowej. Permetylowany materiał pięciokrotnie ekstrahowano w układzie woda/chloroform/1M kwas octowy (7,5:10:2,5). Zebraną frakcję chloroformową odparowano. Otrzymaną w ten sposób próbkę poddano hydrolizie 2 M TFA ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 godz.). Po hydrolizie próbki odparowano. Uzyskane metylowe pochodne monosacharydów poddano takiej samej procedurze jak w wyżej opisanej analizie cukrowej, z wyjątkiem etapu redukcji, w którym zamiast borowodorku sodu zastosowano borodeuterek sodu (NaBDH_3).

6.4.4. Redukcja estrów metylowych kwasów uronowych

Redukcję grup estrowych obecnych w zmetylowanych próbkach przy użyciu jodku metylu przeprowadzono dodając 2 ml 1 M roztworu $\text{LiB}(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{D}$ w tetrahydrofuranie (Super-deuteride, SuperD) według metody Bhat i wsp. (Bhat i in., 1991) Reakcję przeprowadzono przez 18 godz., a następnie nadmiar SuperD neutralizowano dodając żywicę jonowymienną Dowex 50WX 8 H^+ (Bio- RAD). Jonowymieniacz przemywano wodą mQ oraz trzykrotnie metanolem. Frakcje połączono i odparowano. Zredukowany materiał oczyszczano od kwasu bornego poprzez kdestylację z metanolem. Otrzymane pochodne poddano hydrolizie i acetylacji jak w rozdziale 6.4.2.

6.4.5. N-Acetylacja grup aminowych heksozamin

OS (5 mg) rozpuszczono w 2 ml nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu. W łaźni lodowej w odstępie 10 min trzy razy dodawano 100 μl bezwodnika octowego. Po 30 minutach od ostatniego dodania $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ próbkę zamrożono i zliofilizowano (Niedziela i in., 2002).

6.4.6. Analiza absolutnej konfiguracji składników cukrowych techniką NMR

Wybrane standardy cukrowe oraz analizowane polisacharydy i egzopolisacharydy poddano analizom absolutnej konfiguracji monosacharydów techniką spektroskopii ^1H NMR przez przeprowadzenie ich w pochodne *O*-(*S*)-2-metylomaślanu (York i in., 1997). Jako standardy zastosowano D-Glc, D-GlcA, D-GlcN, D-GlcNAc, D-Gal, D-GalA, D-GalN, D-GalNAc, L-Glc, L-Rha, L-Fuc.

Egzopolisacharydową fr. III zawierającą BOS (1,5 mg) oraz PS (0,2 mg) *B. holmesii* hydrolizowano w 2 M TFA przez 90 min w temp. $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. TFA odparowano. Do zhydrolizowanego BOS, PS oraz do standardów dodano 100 μl (*S*)-(+)-2-

metylomaślanu (Sigma) oraz 100 µl bezwodnej pirydyny. Reakcję prowadzono przez 4 godz. w 121 °C. Po inkubacji próbki odparowywano do sucha, rozpuszczono w toluenie i ponownie odparowano. Następnie dodano CH₂Cl₂ i przeprowadzono trzykrotną ekstrakcję do roztworu 2M Na₂CO₃ w wodzie oraz jednokrotną do wody mQ. Frakcję z chlorkiem metylenu przeniesiono do nowej próbówki i zagęszczono. Próbkę osuszone poprzez dodanie 2-propanolu i odparowanie. Do analiz NMR próbki rozpuszczano w deuterowanym acetonie (aceton-d₅, 160 µl) i przeniesiono do probówek NMR o średnicy 3mm.

6.5. Metody instrumentalne

6.5.1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Rozdziały chromatograficzne polisacharydów, oligosacharydów, białek nośnikowych, glikokoniugatów, oraz izolacje frakcji z mediów pochodowlanych prowadzono przy użyciu półpreparatywnego systemu chromatograficznego HPLC UltiMate 3000 (Dionex, USA) składającego się z degazera, pompy podwójnej, detektora UV, automatycznego kolektora frakcji (Dionex, USA) oraz dodatkowego detektora refraktometrycznego (Shodex, Japonia). Wszystkie stosowane bufony przygotowywano z wykorzystaniem wody mQ, filtrowano (0,45 µm) i odgazowano. Wszystkie próbki przed nałożeniem na kolumny przefiltrowano przez filtr 0,22 µm. Postęp rozdziału rejestrowano refraktometrycznie za pomocą detektora Shodex RI-102 (Showa-Denko) oraz detektora UV przy długościach fal $\lambda=190$ nm, $\lambda=206$ nm i $\lambda=280$ nm.

Polisacharydy, oligosacharydy oraz ich zredukowane i utlenione formy oczyszczano na kolumnie TSKgel G3000PW (21,5 mm × 60 cm, wielkość ziarna 12 µm, Tosoh Bioscience, Japonia) zrównoważonej wodą mQ. Prędkość przepływu fazy nośnej wynosiła 6 ml/min, objętość nastrzyku 1 ml, objętość zbieranych frakcji wynosiła 6 ml.

Polisacharydy oraz media pochodowlane oczyszczano na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 30 prep grade (30 mm x 124 cm, wielkość ziarna 34 µm, GE Healthcare, USA). Rozdziały prowadzono w 0,05 M kwasie octowym. Prędkość przepływu fazy nośnej wynosiła 1 ml/min, objętość nastrzyku 2 ml, objętość zbieranych frakcji 1 ml.

Do oczyszczania glikokoniugatów oraz TTd stosowano kolumnę TSKgel G-3000SW (21,5 mm × 30 cm, wielkość ziarna 13 µm, Tosoh Bioscience, Japonia) zrównoważonej PBS. Prędkość przepływu fazy nośnej wynosiła 6 ml/min, objętość nastrzyku 1 ml, objętość zbieranych frakcji wynosiła 3 ml.

6.5.2. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Pochodne cukrów (octany alditoli i częściowo zmetylowane octany alditoli) analizowano przy użyciu spektrometru masowego Thermo ITQ™ 1100 GC-Ion Trap sprzężonego z chromatografem gazowym Trace™ 1310 (Thermo Scientific™). Do analizy, próbki rozpuszczano w 30 µl octanu etylu, z czego na kolumnę HP-5MS (30 m, ID=0,25 mm, d_F=0,25 µm) (Agilent Technologies, USA) nanoszono 1 µl roztworu. Jako gaz nośnikowy wykorzystano hel przy stałym przepływie 1,8 ml/min (program temperatury 150°C–270°C, 8 °C/min).

6.5.3. Spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez jonizację typu elektrosprej (ESI)

Pomiary metodą spektrometrii mas z użyciem jonizacji typu elektrosprej zostały wykonane na aparacie amaZon SL (Bruker Daltonics, Niemcy) wyposażonym w pułapkę jonową jako detektor. Analizowane oligosacharydy rozpuszczano w mieszaninie acetonitryl/woda, 1:1. Stężenie próbki wynosiło 50 µg/ml. Widma rejestrowano w zakresie *m/z* 200-2000 (pomiar w trybie jonów ujemnych). Aparat kalibrowano stosując odczynnik ESI-L Tuning Mix (Agilent Technologies, USA) w trybie jonów dodatnich. Dla źródła jonów zastosowano następujące parametry: przepływ próbki 3 µl/min, temp. źródła 200°C, przepływ gazu nośnego (azot) 5 L/min przy ciśnieniu 8 psi.

6.5.4. Spektrometria mas z wykorzystaniem jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy z detekcją czasu przelotu jonów MALDI-TOF

Pomiary metodą spektrometrii mas z jonizacją typu MALDI zostały wykonane na aparacie UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Niemcy) z detektorem TOF. Analizy wykonywano w trybach liniowym i reflektromu z jonizacją dodatnią i ujemną. Dane analizowano w programie FlexAnalysis dołączonym przez producenta spektrometru. Widma kalibrowano w zakresie mas od ~1000 do 3500 *m/z* stosując Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics).

6.5.4.1. Biotypowanie bakterii

Hodowane bakterie identyfikowano metodą bezpośrednią nanosząc bakterie eżą mikrobiologiczną na płytkę stalową do analiz MALDI lub izolując z nich białka powierzchniowe i rybosomalne. Kolonie bakteryjne pobierano eżą bezpośrednio z podłoża stałego lub 10 µl z podłoża płynnego. Zebraną masę bakteryjną inaktywowano 80% etanolem (1,2 ml) przez 2 min. Następnie zawiesinę bakterii odwirowywano (2 min,

13000 × g) i supernatant odrzucano. Osad poddawano ekstrakcji zawieszając bakterie w roztworze 70% kwasu mrówkowego (50 µl) i acetonitrylu (50 µl). Po odwirowaniu zawiesiny (2 min, 13000 × g) uzyskano ekstrakt białkowy w supernatancie oraz masę bakteryjną w osadzie. Ekstrakt białkowy наносzono na płytkę stalową i pozostawiano do wyschnięcia. Przygotowywano matrycę, nasycony roztwór HCCA w wodnym roztworze 50% ACN z 2,5% TFA i roztworem matrycy (1 µl) pokrywano próbki. Dla ekstraktu zawierającego głównie białka rybosomalne, wykonywano analizy MALDI-TOF MS w trybie liniowym, w polaryzacji dodatniej, w zakresie mas (m/z) od 2000 do 20000 Da. Uzyskiwano molekularny profil białkowy umożliwiający identyfikację bakterii na podstawie analizy porównawczej ze wzorami referencyjnymi w bazie danych z zastosowaniem oprogramowania MALDI Biotyper. Zastosowana metoda nadaje się do identyfikacji klasycznych *Bordetellae* (Zintgraff i in., 2018).

6.5.4.2. Identyfikacja bakterii na podstawie profilu endotoksynowego

Alternatywną metodą biotypowania bakterii jest analiza widm profilów endotoksynowych. Preparaty bakteryjne do określania profilu endotoksynowego przygotowywano jak w rozdziale 6.5.4.1. Odwirowaną po ekstrakcji masę bakteryjną наносzono na płytkę stalową do analiz MALDI i pozostawiano do wyschnięcia. Przygotowywano matrycę DHB (10 mg/ml) w 50% roztworze ACN. Próbkę masy bakteryjnej pokrywano roztworem matrycy DHB. Preparaty analizowano w trybie liniowym, w jonizacji ujemnej, w zakresie mas od 700 do 4000 Da. Metodą tą uzyskiwano profil endotoksynowy *B. pertussis* 186 (Koj i in., 2014). Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było uzyskanie widm z profilem endotoksynowym charakterystycznych dla każdego gatunku i szczepu bakterii z rodzaju *Bordetella*.

6.5.4.3. Analiza MALDI-TOF MS preparatów cukrowych

Preparaty LPS, LOS, EPS, OS i PS do analizy metodą spektrometrii mas MALDI-TOF przygotowywano jako roztwory wodne o stężeniu 1 mg/ml, a następnie (1 µl) mieszano z roztworem matrycy w stosunku 1 : 1. Jako matryce stosowano: (1) DHB (10 mg/ml) w 50% wodnym roztworze ACN; (2) DHB (10 mg/ml) w 50% wodnym roztworze metanolu z 0,1 M kwasem cytrynowym oraz (3) THAP (10 mg/ml) z 80 mM cytrynianem amonu w ACN. Preparaty analizowano w trybie liniowym (LPS, LOS, EPS) oraz w trybie reflektrometrii (OS, PS, BOS) polaryzacji dodatniej i ujemnej, w zakresie mas 700-10000 Da.

6.5.5. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Próbki przeznaczone do analiz metodami spektroskopii NMR liofilizowano dwukrotnie z wody deuterowanej D₂O (99,9%, Sigma), a następnie rozpuszczano w 160 µl lub 460 µl D₂O (99,96%, Sigma). Pomiary wykonywano w probówkach o średnicy 3 mm lub 5 mm w temp. 298 K przy użyciu spektroskopu NMR Avance III 600 MHz (Bruker Biospin, Szwajcaria) wyposażonego w kriosondę CryoQCI 5 mm. Wartości przesunięć chemicznych wyznaczano w eksperymentach jedno- i dwuwymiarowych, takich jak ¹H,¹H COSY, ¹H,¹H TOCSY, ¹H,¹³C HSQC-DEPT, ¹H,¹³C HSQC-TOCSY, ¹H,¹³C HMBC oraz ¹H,¹H NOESY. Eksperymenty ¹H,¹H TOCSY rejestrowano z wartościami czasów mieszania 30, 60 i 100 ms, a eksperymenty ¹H,¹H NOESY 100 ms. Wartość opóźnienia w eksperymentach ¹H,¹³C HMBC wynosiła 60 ms. Dane procesowano i wstępnie analizowano przy pomocy oprogramowania TopSpin 3.5pl6 (Bruker BioSpin). Adnotację sygnałów i wyznaczenie korelacji pomiędzy systemami spinowymi wykonywano w programie NRMFAM-SPARKY (Lee i in., 2015).

6.6. Analiza mikroskopowa *B. holmesii* ATCC 51541

Hodowle bakteryjne *B. holmesii* w celu pobrania materiału i wykonania analizy mikroskopowej prowadzono przez 24 godz. na stałym podłożu oraz w podłożu płynnym na pożywce Stainer-Sholte z ryboflawiną. Bakterie zaadsorbowano na kryształy krzemowy poprzez przyłożenie krzemu do widocznych drobnych kolonii oraz poprzez nakropienie pożywki na krzem. Dla zapewnienia stabilności preparatów, bakterie utrwalano 2% paraformaldehydem (EMS, USA) przez 10 min. w temp. pokojowej. Próbki odwodniono w szeregu rozcieńczeń alkoholu metylowego 25%-100% i następnie zamieniono metanol na ciekły dwutlenek węgla stosując automatyczne suszenie w punkcie krytycznym (Leica Microsystem). Analiza została wykonana metodą niskonapięciowej skaningowej mikroskopii elektronowej z emisją pola LV-FESEM (*ang. Low-Voltage Field-Emission Scanning Electron Microscopy*) (Drab i in., 2016) z użyciem mikroskopu typu cross-beam Zeiss Auriga 60 Cryo z systemem mikroanalizy energodispersyjnej EDX w Pracowni Interakcji Nanostruktur Biologicznych, IITD PAN. Próbki mikroskopowe zostały przygotowane oraz zanalizowane przez operatora mikroskopu dr hab. n. med. Marka Draba specjalisty z zakresu technik analitycznych oraz skaningowej mikroskopii elektronowej, który poświęcił swój czas na przygotowanie preparatów i przeprowadzanie analizy, za co serdecznie dziękuję.

7. WYNIKI

W pierwszych etapach pracy przeprowadzono analizę porównawczą głównego antygeny cukrowego, czyli heteropolisacharydowej części LPS wśród wybranych przedstawicieli *Bordetellae*. LOS *B. pertussis* jest wyjątkowo stabilnym komponentem osłony komórkowej i uzyskane z niego oligosacharydowe fragmenty wydawały się odpowiednie do poszukiwania wspólnych antygenów szczepionkowych pośród LPS innych *Bordetellae*. Do analiz wybrano gatunki, które wywołują krztusiec – *B. pertussis* (w badaniach wykorzystano dwa polskie szczepy szczepionkowe 186 i 606), parakrztusiec – *B. parapertussis* oraz choroby układu oddechowego – *B. bronchiseptica*. Do strukturalnych badań heteropolisacharydowych fragmentów LPS dołączono referencyjny szczep *B. holmesii* ATCC 51541. *B. holmesii* również jest czynnikiem etiologicznym krztuśca, ale struktury części heteropolisacharydowej LPS tej bakterii są zupełnie nieznanymi. W trakcie poszukiwań uniwersalnych antygenów cukrowych wśród *Bordetellae*, postanowiono też sprawdzić, czy istnieją wspólne egzopolisacharydy, które mogą być w prosty sposób izolowane z medium hodowlanego. Zarówno egzopolisacharydy (EPS) jak i będące składnikiem osłony komórkowej polisacharydy kapsularne (CPS), biorą udział w adhezji bakterii do komórek gospodarza i opsonizacji bakterii. Zastosowanie tego rodzaju antygenów cukrowych jako składników szczepionkowych mogłoby wywoływać pełniejszą odpowiedź immunologiczną i ograniczyć transmisję bakterii. W literaturze jak już wcześniej wspomniano, istnieją doniesienia o dwóch rodzajach egzoglikanów produkowanych przez niektóre *Bordetellae*. Zalicza się do nich „Bps” – polisacharyd, o niepotwierdzonej strukturze biorący udział w tworzeniu biofilmu, oraz polisacharyd mikrokapsularny, którego ani struktura, ani funkcja nie jest znana.

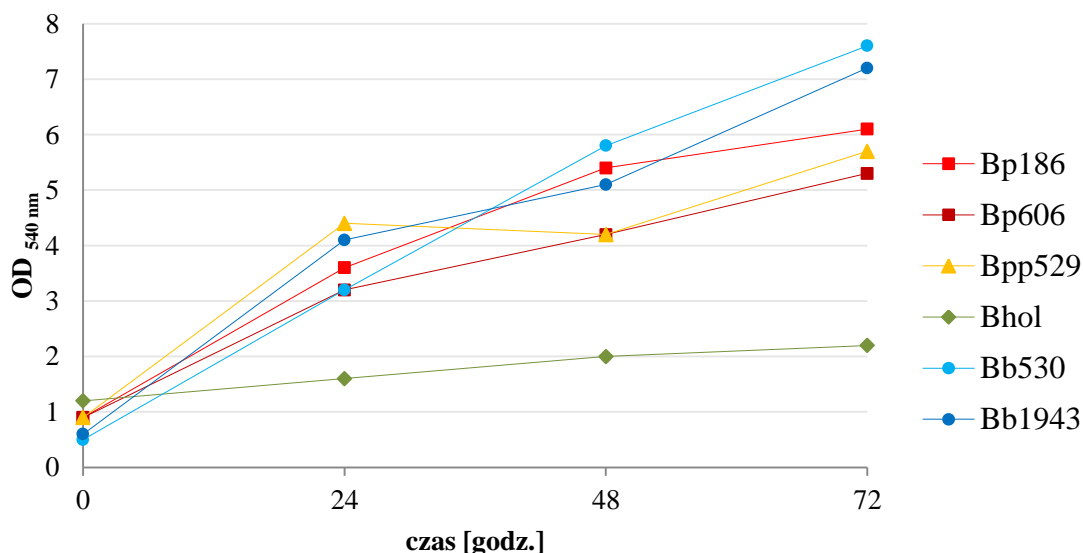
7.1. Szczepy *Bordetella* i warunki hodowli

Ogólna struktura lipopolisacharydów *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* jest dość dobrze poznana, więc badania szczepów posiadanych przez laboratorium, miały charakter konfrontujący wiedzę literaturową z analizą nowych szczepów. LOS szczepu *B. pertussis* 186 poddawano wcześniejszym analizom przy okazji badań neoglikokoniugatów, natomiast struktury LOS *B. pertussis* 606 i LPS *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* szczepy 530 i 1943, a także *B. holmesii* ATCC 51541 nie zostały zdefiniowane.

WYNIKI

Przeprowadzono hodowle wymienionych gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella*, na pożywce Stainer–Scholte standardowo używanej do hodowli szczepionkowych szczepów pałeczki krztuśca. Hodowle prowadzone były w celu nagromadzenia masy bakteryjnej potrzebnej do izolacji lipopolisacharydów.

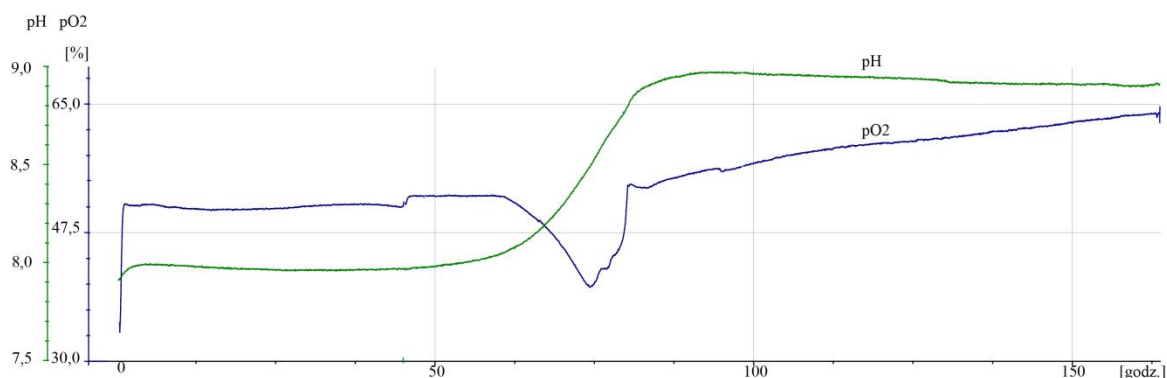
Wyzwaniem okazało się uzyskanie odpowiedniej ilości masy bakteryjnej *B. holmesii*, która jest bakterią wolno-rosnącą i charakteryzuje się wzrostem arytmetycznym, a nie logarytmicznym jak większość bakterii. W zestawieniu z pozostałymi gatunkami z rodzaju *Bordetella*, *B. holmesii* jest najslabiej rosnącą bakterią, co przedstawiono na Ryc. 11, porównując gęstość optyczną hodowli bakteryjnych w probówkach typu Schott, na pożywce Stainer–Scholte z dodatkiem wit. B₂. Jej hodowle wymagały dodatkowych optymalizacji.



Ryc. 11. Gęstość optyczna [OD] hodowli bakteryjnych *B. pertussis* 186 (Bp186), *B. pertussis* 606 (Bp606), *B. parapertussis* 529 (Bpp529), *B. holmesii* (Bhol), *B. bronchiseptica* 530 (Bb530), *B. bronchiseptica* 1943 (Bb1943) prowadzonych przez 72 h w probówkach typu Schott

Hodowla płynna *B. holmesii* prowadzona była początkowo w pożywce z wyciągiem mózgowo-sercowym (Brain-Heart Infusion, BHI) zgodnie z zaleceniami DSMZ. Część hodowli prowadzono w bioreaktorze na pożywce BHI, w celu obserwacji charakterystyki wzrostu (Ryc. 12). Jego zahamowanie następuje po 72 godz., gdy obserwuje się alkalizację medium z pH 7,9 do pH 9,0 i spadek natlenowania z 51% do ~40%. Obserwowany wzrost natlenowania podłoża po upływie 75 godz. wynika z ustawień programu fermentora Biostat A plus, który zwiększa mieszanie ze spadkiem natlenowania podłoża.

WYNIKI



Ryc. 12. Wzrost *B. holmesii* na pożywce BHI w bioreaktorze. Wskaźniki pomiarowe – pH i poziom natlenienia medium pO₂ [%]

Aby uniknąć wprowadzenia do dalszych analiz dodatkowych antygenów pochodzących od pożywki zamieniono medium hodowlane BHI na pożywkę Stainer–Scholte, dedykowaną do produkcji szczepionek przeciwkrtuscowych. Wzrost *B. holmesii* na standardowo używanym dla *B. pertussis* syntetycznym podłożu Stainer–Scholte był słaby i charakteryzował się bardzo niską wydajnością, dlatego modyfikowano skład podłoża oraz metodę zakładania hodowli. Po zwiększeniu stężenia L-glutaminianu sodu oraz L-proliny obserwowano lepszy wzrost, ale nie był on zadowalający. Z niedawno opublikowanych badań wynika, że dodatek ryboflawiny (10 µg/ml) w przypadku niskiej gęstości *B. pertussis* stymulował jej wzrost (Odanaka i in., 2017). W tak zmodyfikowanym podłożu uzyskano lepszy wzrost *B. holmesii*, co przedstawiono w Tabeli 8.

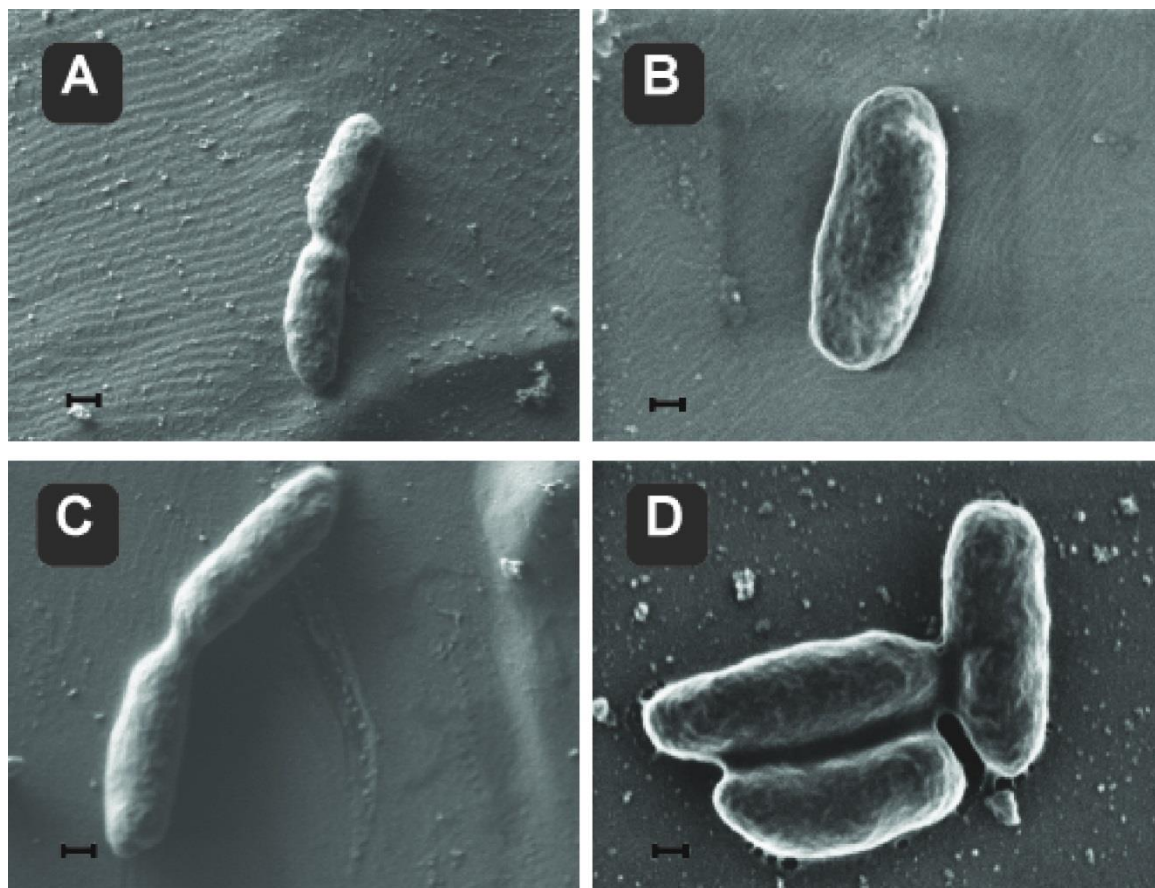
Tabela 8. Porównanie wzrostu *B. holmesii* na syntetycznych mediach hodowlanych (250 ml)

Medium hodowlane	OD początkowe	OD po 24 h	OD po 72 h	Masa bakteryjna [g] (liofilizat)
Stainer–Scholte	1,3	4,8	4,6	0,1
Stainer–Scholte + L-glutaminian sodu + L-prolina	1,2	3,6	4,8	0,1
Stainer–Scholte + ryboflawina	1,1	4,6	5,6	0,2

W celu zwiększenia przyrostu masy bakteryjnej zwiększono także objętość inokulum. Po 24 h od założenia hodowli obserwowano podwojenie gęstości optycznej. Po 48 h i 72 h nie obserwowano zmian OD oraz przyrostu masy. Hodowla płynna zakładana była w objętości 100 ml (10% inokulum) i po podwojeniu wartości OD całość pasażowano do objętości 1 L. Wykonywano maksymalnie trzy pasaże.

WYNIKI

Z wybranej 24-godzinnej hodowli na podłożu płynnym Stainer–Sholte z ryboflawiną (Ryc. 13 C i D) oraz podłożu stałym z płytki węglowej, (Ryc. 13 A i B) pobrano bakterie, które zaadsorbowano na kryształach krzemowym i analizowano w warunkach próżniowych pod mikroskopem elektronowym cross-beam Zeiss Auriga 60 Cryo. Na wypreparowanym materiale wykonano zdjęcia *B. holmesii* ATCC 51541 (Ryc. 13). Zaprezentowanie obrazów analizy mikroskopowej było możliwe dzięki uprzejmości dr hab. n. med. Marka Draba.



Ryc. 13. *B. holmesii* ATCC 51541. Ryc. A i C szerokość pola widzenia FOV 2,8 μm , powiększenie 100 000x, wskaźnik skali 200 nm, detektor Everhard - Thornley. Ryc. B i D szerokość pola widzenia FOV 2,0 μm , powiększenie 150 000x, wskaźnik skali 100 nm, detektor InLens SE1

7.2. Analiza heteropolisacharydowych fragmentów LPS u *Bordetellae*

7.2.1. Izolacja lipopolisacharydów *Bordetellae*

Lipopolisacharydy bakterii z rodzaju *Bordetella* oczyszczone od białek i kwasów nukleinowych uzyskano w wyniku ekstrakcji wodno-fenolowej z zawiesiny zliofilizowanych bakterii. Wydajność ekstrakcji, względem liofilizatu bakterii, była różna dla poszczególnych gatunków i szczepów: *B. pertussis* 186 (0,39%), *B. pertussis* 606 (0,45%), *B. parapertussis* 529 (1,25%), *B. holmesii* (0,48%-1,25%), *B. bronchiseptica* 530 (0,85%), *B. bronchiseptica* 1943 (1,25%).

W trakcie hodowli *B. holmesii* przetestowano trzy podłoża: BHI, Stainer–Scholte ze zwiększoną zawartością proliny i glutaminianu sodu oraz Stainer–Scholte z dodatkiem ryboflawiny. Z każdego rodzaju pożywki zbierano masę bakteryjną i wykonywano ekstrakcję wodno - fenolową. W późniejszych rozdziałach kolejne ekstrakcje i wyizolowane LPS opisano jako Bhol_2017 (BHI), Bhol_2018 (Stainer-Scholte + prolina+ glutaminian sodu) oraz Bhol_2019 (Stainer-Scholte+ ryboflawina).

7.2.2. Analiza serologiczna lipopolisacharydów wybranych bakterii z rodzaju *Bordetella*

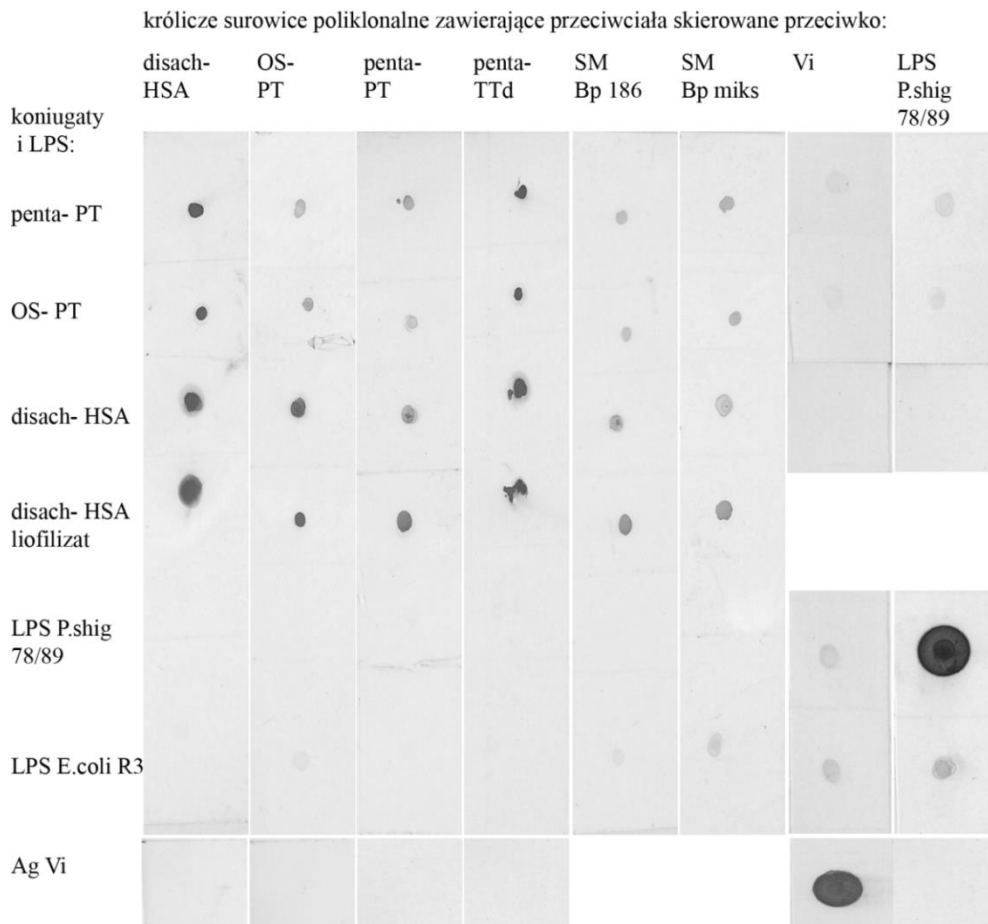
LOS/LPS analizowano w teście dot blot (Ryc. 15), wykorzystując królicze surowice skierowane przeciwko zdefiniowanym antygenom cukrowym lub ich glikokoniugatom. Wykorzystane surowice zostały scharakteryzowane w rozdziale „Materiały i metody” (podrozdział. 6.3.1).

- anty–disach-HSA
- anty–penta-PT
- anty–penta-TTd
- anty–OS-PT
- anty–SM Bp 186
- anty–SM Bp miks (szczepy 186/576/606/629)
- anty–Vi

W reakcjach serologicznych używano koniugatu disach-HSA, który zawiera ściśle zdefiniowany, syntetyczny, terminalny dwucukrowy epitop wspólny z dystalnym trójcukrem obecnym w LOS *B. pertussis* 186. W analizach korzystano z wcześniej przygotowanych glikokoniugatów penta-PT i penta-TTd zawierających pentasacharydowy terminalny fragment wyizolowany z LOS *B. pertussis* 186, w którego skład wchodzi dystalny trójcukier oraz koniugat OS-PT, którego antygenem cukrowym jest pełna cząsteczka oligosacharydu rdzenia *B. pertussis* 186. W badaniach

WYNIKI

wykorzystywano również komercyjnie dostępny polisacharyd kapsularny Vi wyizolowany z *Citrobacter freundii* oraz surowicę anti-Vi do aglutynacji szkiełkowej bakterii *Salmonella* dla powierzchniowego antygeny Vi. Antygen Vi jest homopolimerem N-acetylowanego kwasu galaktozaminouronowego. Doniesienia literaturowe sugerują, że polisacharyd kapsularny (tzw. mikrokapsuła) produkowany przez *B. pertussis* także może być N-acetylowanym kwasem galaktozaminouronowym.

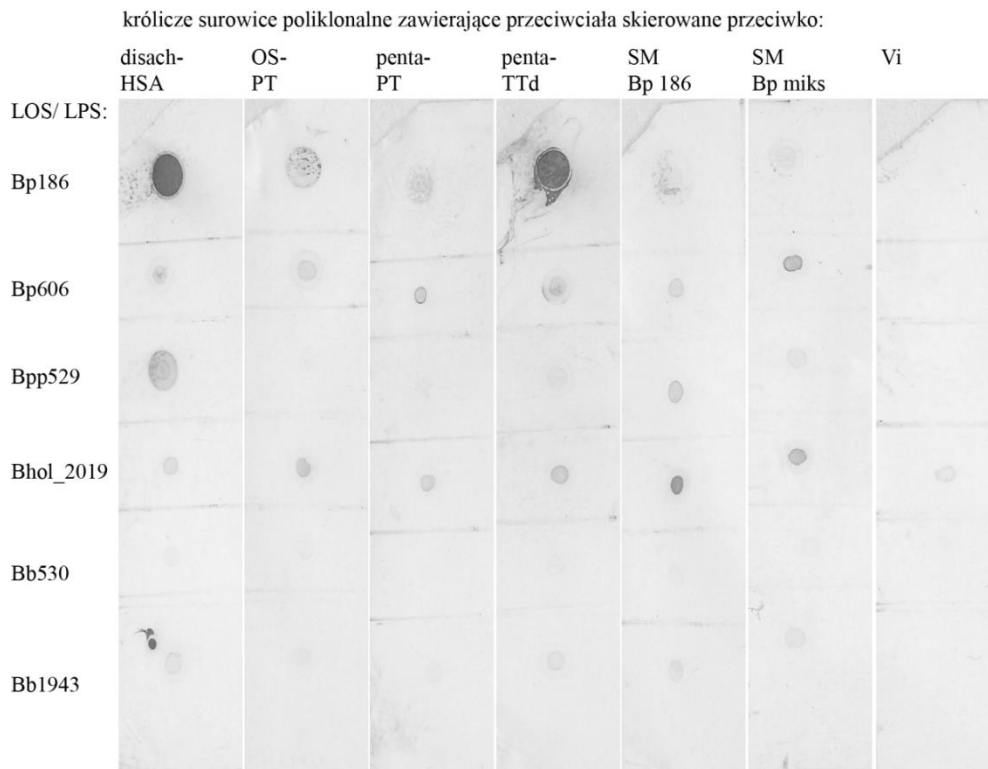


Ryc. 14. Analiza reaktywności przeciwciał z wybranymi glikokoniugatami (penta-PT, OS-PT, disach-HSA), LPS *P. shigelloides* 78/89, LPS *E. coli* R3 oraz antygenem Vi

Preparaty nanoszono na nitrocelulozę w ilości 2 µg. Surowice rozcieńczano 1: 200 z wyjątkiem surowicy anti-Vi do aglutynacji szkiełkowej, której rozcieńczenie było 10 krotnie mniejsze. Oprócz LPS bakterii z rodzaju *Bordetella* (Ryc. 15) analizowano również antygen Vi, a także LPS *Plesiomonas shigelloides* 78/89 (P.shig 78/89) oraz LPS *Esherichia coli* R3 jako kontrole negatywne (Ryc. 14). LPS *E. coli* posłużył dodatkowo jako kontrola w układzie homologicznym dla surowicy anti-Vi, która może krzyżowo reagować z antygenami powierzchniowymi innych bakterii niż *Salmonella* Typhi. Kontrolę dla anti-glikokoniugatowych króliczych surowic poliklonalnych, stanowiły

WYNIKI

glikokoniugaty penta-PT, OS-PT oraz disach-HSA. Reakcje glikokoniugatów, LPS *P.shig* 78/89, LPS *E. coli* R3 oraz antygenu Vi z poszczególnymi surowicami zestawiono na Ryc. 14. Przeciwciała z surowic anti-glikokoniugatowych (anti-penta-PT, anti-penta-TTd, anti-OS-PT i anti-disach-HSA) oraz przeciwciała poliklonalne przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym (anti-SM Bp 186 i anti-SM Bp miks) rozpoznają wspólne epitopy cukrowe glikokoniugatów wytworzonych z oligosacharydowych fragmentów LOS *B. pertussis* 186. Nie rozpoznają natomiast polisacharydowych struktur powierzchniowych innych bakterii, a także antygenu Vi.



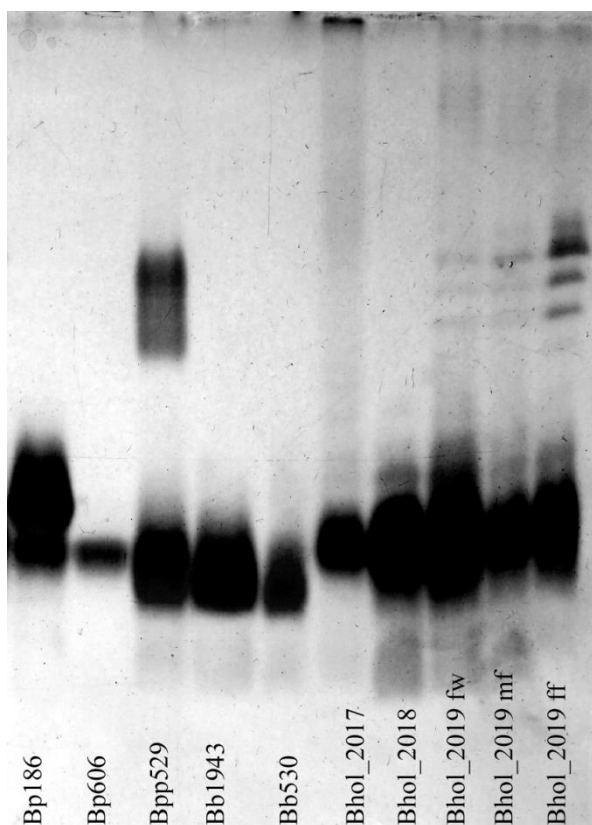
Ryc. 15. Reakcja króliczych surowic anti-glikokoniugatowych z LPS wybranych bakterii z rodzaju *Bordetella*

W teście dot blot analizowanych LOS/LPS *Bordetellae* zaobserwowano porównywalne reakcje krzyżowe surowic anti-glikokoniugatowych (anti-penta-PT, anti-penta-TTd, anti-OS-PT i anti-disach-HSA) oraz poliklonalnych surowic na pełne komórki bakteryjne *B. pertussis* 186 (SM Bp 186) i *B. pertussis* miks (SM Bp miks) z lipopolisacharydami *B. pertussis* 606 i *B. holmesii*. Surowica na pełne komórki bakteryjne *B. pertussis* 186 krzyżowo reaguje również z LPS *B. parapertussis* 529. Na podstawie silnej reakcji surowicy anti-disach-HSA, która zawiera przeciwciała na ściśle zdefiniowany epitop cukrowy oraz reakcji z surowicą penta-TTd można przypuszczać, że w budowie LPS *B. parapertussis* 529 znajdują się elementy strukturalnie podobne do

WYNIKI

dystalnego trójcukru. Reakcje surowic anty-glikokoniugatowych z LPS *B. bronchiseptica* 530 i 1943, były znacznie słabsze niż dla pozostałych *Bordetellae*. Przeciwciała swoiste dla immunodominującego epitopu, jakim jest dystalny trójcukier, nie rozpoznają tego fragmentu w LPS *B. bronchiseptica* 530 i 1943. Najintensywniejsze reakcje krzyżowe odnotowano dla surowic z przeciwciałami skierowanymi przeciwko koniugatowi disach-HSA oraz penta-TTd. Zaobserwowano również słabą reakcję krzyżową surowicy anty-Vi z lipopolisacharydem *B. holmesii*.

Wyizolowane lipopolisacharydy bakterii z rodzaju *Bordetella* rozdzielano elektroforetycznie w warunkach denaturujących w 15% żelu poliakrylamidowym metodą Laemmliego (Laemmli, 1970) (Ryc. 16).



Ryc. 16. Rozdział elektroforetyczny LPS bakterii z rodzaju *Bordetella*. Od lewej: *B. pertussis* 186 (Bp186), *B. pertussis* 606 (Bp606), *B. parapertussis* 529 (Bpp529), *B. bronchiseptica* 1943 (Bb1943), *B. bronchiseptica* 530 (Bb530), *B. holmesii* (Bhol_2017, Bhol_2018, Bhol_2019 faza wodna – fw, międzyfaza – mf oraz faza fenolowa – ff)

Rozdział elektroforetyczny pełnego LOS *Bordetella pertussis* charakteryzuje się obecnością dwóch prążków określanych w literaturze jako prążek B (migrujący szybciej) oraz prążek A (migrujący wolniej). Prążek A to pełna struktura LOS składająca się z lipidu A, oligosacharydu rdzenia oraz dystalnego trójcukru. Prążek B to niekompletny

lipooligosacharyd, który zawiera lipid A, oligosacharyd rdzenia, ale pozbawiony jest terminalnego trójcukru. Pełna cząsteczka oligocukru określana jest mianem dodekasacharydu, a pozbawiona dystalnego trójcukru nazywana jest nonasacharydem. Na przedstawionym rozdziale elektroforetycznym obserwujemy obecność obu prążków w miejscu rozdziału LOS *B. pertussis* 186. Posiadany szczep *B. pertussis* 186 produkuje dwa typy LOS. Na rozdziale LOS *B. pertussis* 606 obecny jest tylko prążek B co jest potwierdzeniem, że *B. pertussis* 606 jest szczepem szorstkim, produkującym tylko jeden typ LOS i nie posiada w strukturze dystalnego trójcukru.

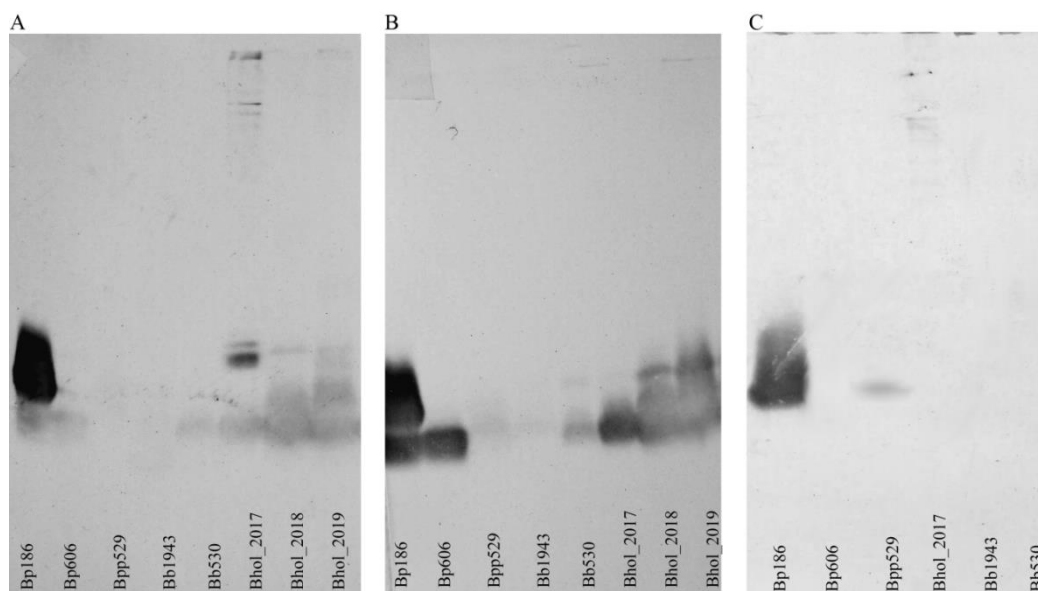
Według danych literaturowych *B. parapertussis* posiada gładki typ LPS, a polisacharyd O-swoisty jest homopolimerem kwasu 2,3-dideoksy-2,3-di-N-acetylogalaktouronowego. Na żelu poliakrylamidowym dla ścieżki LPS *B. parapertussis* 529 obserwujemy grupę niezbyt odległych od siebie prążków w regionie wolno wędrujących frakcji, w których segment lipid A i OS rdzenia jest podstawiony łańcuchem O-swoistym oraz szybciej wędrujący prążek w regionie lipidu A i rdzenia oligosacharydowego niepodstawionego antygenem O.

W doniesieniach literaturowych również LPS *B. bronchiseptica* charakteryzuje się strukturą typową dla szczepów gładkich. Posiada podobną, jak *B. parapertussis* powtarzającą się podjednostkę antygeny O, która jest homopolimerem 2,3-di- α -D-GalpNAcA. Z drobnymi modyfikacjami rdzeń zbudowany jest podobnie jak u *B. pertussis* 186. Na żelu przedstawiającym rozdzielanie elektroforetyczne LPS wyizolowanych ze szczepów *B. bronchiseptica* 530 oraz 1943 obserwujemy jedynie obecność prążków odpowiadających niskiej masie cząsteczkowej LOS w regionie lipidu A i OS rdzenia. Nie obserwowane są prążki odpowiadające antygenowi O. Na podstawie tylko rozdzielania elektroforetycznego można stwierdzić, że oba szczepy *B. bronchiseptica* 530 oraz 1943 są szczepami szorstkimi, nieposiadającymi łańcucha O-swoistego.

B. holmesii posiada LPS typu gładkiego. Obserwujemy prążek w regionie lipidu A i rdzenia oraz prążki odpowiadające kolejnym powtarzającym się przyłączonym podjednostkom łańcucha O-swoistego. Obraz rozdzielania lipopolisacharydów pochodzących z trzech preparacji, wygląda dosyć nietypowo. Obserwowana jest tu pewna heterogenność, która może wynikać z rodzaju zastosowanej pożywki. Obserwowane różnice wynikają prawdopodobnie ze zmian ilościowych (przewaga łańcucha O-swoistego zbudowanego z mniejszej liczby podjednostek dla Bhol_2019 w porównaniu z Bhol_2017), a nie strukturalnych. Właściwy gatunek potwierdzano pobierając bakterie w trakcie hodowli i przeprowadzając biotypowanie bakterii metodami spektrometrii mas

oraz wykonując widma MALDI-TOF MS wyizolowanego lipidu A, co przedstawiono w dalszej części pracy (Ryc. 30).

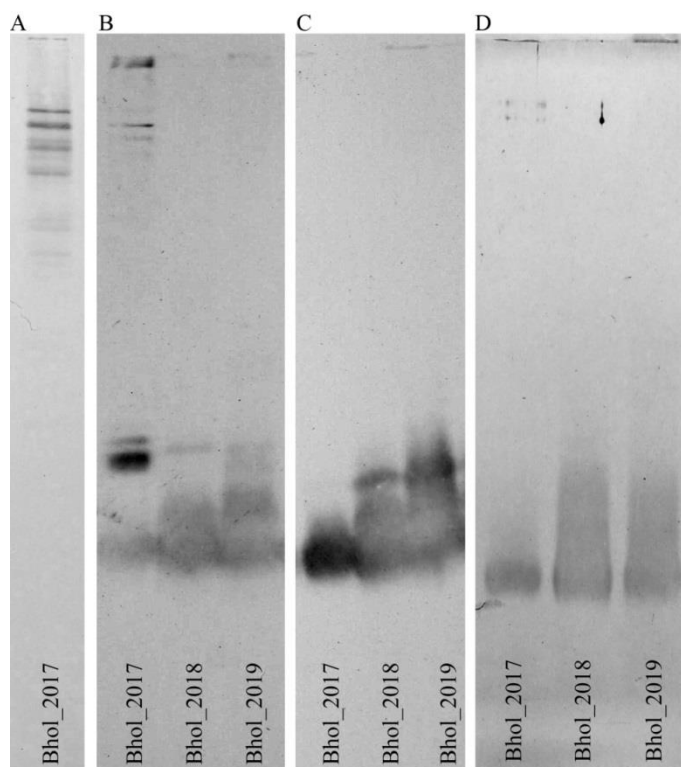
W celu sprawdzenia czy przeciwciała z surowic anti-glikokoniugatowych o znanych swoistościach w stosunku do strukturalnie zdefiniowanych antygenów cukrowych reagują krzyżowo z LPS badanych bakterii z rodzaju *Bordetella*, i w jakich regionach, rozdzielone heteropolisacharydy inkubowano z króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko glikokoniugatom penta-PT i OS-PT. W tym teście immunoblotingu surowica zawierająca przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko glikokoniugatowi OS-PT rozcieńczona była 1:100, aby lepiej uwidocznić reakcje. Badano również reakcje krzyżowe surowic poliklonalnych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym różnych szczepów *B. pertussis* (186/576/606/629).



Ryc. 17. Zestawienie blotów po rozdziale elektroforetycznym i transferze na membrany nitrocelulozowe inkubowanych z surowicami: anti-Bp miks (A), anti-OS-PT (B) oraz anti-penta-PT (C)

LPS *B. parapertussis* 529 reaguje krzyżowo z króliczą surowicą zawierającą przeciwciała skierowane przeciwko glikokoniugatom penta-PT, oraz OS-PT, ale nie jest rozpoznawany przez surowice uzyskane na pełne komórki bakteryjne *B. pertussis* miks (szczepy 186/576/606/629). Prawie nieobserwowane są reakcje krzyżowe z powyższymi surowicami anti-glikokoniugatowymi oraz surowicami poliklonalnymi na SM-Bp „miks” z lipopolisacharydami *B. bronchiseptica* 530 oraz *B. bronchiseptica* 1943. Reakcje LPS *B. holmesii* (Bhol_2017, Bhol_2018 oraz Bhol_2019) zestawiono na osobnym rysunku (Ryc. 18).

WYNIKI



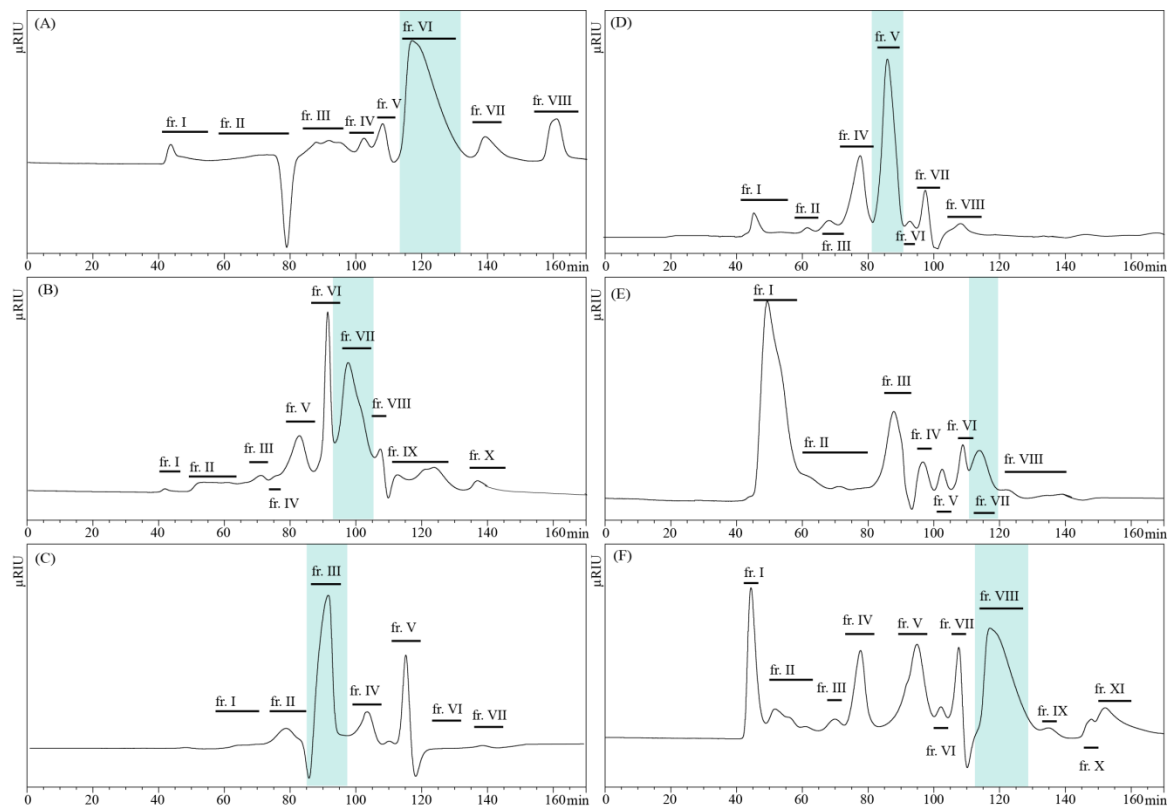
Ryc. 18. Zestawienie blotów po rozdziale elektroforetycznym LPS *B. holmesii* inkubowanych z poliklonalnymi surowicami króliczymi: anti-SM Bp186 (A), anti-SM Bp miks (B), anti-OS-PT (C) oraz anti-penta-PT (D)

LPS *B. holmesii* ATCC 51541 w regionie lipidu A i OS rdzenia reaguje krzyżowo z króliczymi surowicami zawierającymi przeciwciała skierowane przeciwko glikokoniugatom penta-PT oraz OS-PT (obie surowice w rozc. 1:100), a także z króliczymi surowicami zawierającymi przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym szczepu *B. pertussis* 186, oraz mieszaninie szczepów *B. pertussis* 186/576/606/629. Analizy elektroforetyczne i serologiczne wskazują, że struktura oligosacharydu rdzenia *B. holmesii* może wykazywać podobieństwo do struktury OS *B. pertussis* 606, który jest niepodstawiony dystalnym trójcukrem. LPS *B. holmesii* (LPS Bhol_2017), który wyizolowany został z bakterii hodowanych na bogatym medium BHI wykazuje pewne różnice. Reaguje z obiema surowicami na pełne komórki (anti-SM Bp186 oraz anti-SM Bp miks) oraz surowicą na koniugat penta-PT w regionie wysokich mas cząsteczkowych, które w rozdziale elektroforetycznym obserwuje się jako smugę bez wyraźnych prążków. Antygen O *B. holmesii* w swojej strukturze może posiadać wspólne elementy z terminalnym pentasacharydem, które mogą być również rozpoznawane przez przeciwciała obecne w surowicach poliklonalnych na pełne komórki bakteryjne. W przypadku tych surowic obserwowane reakcje krzyżowe

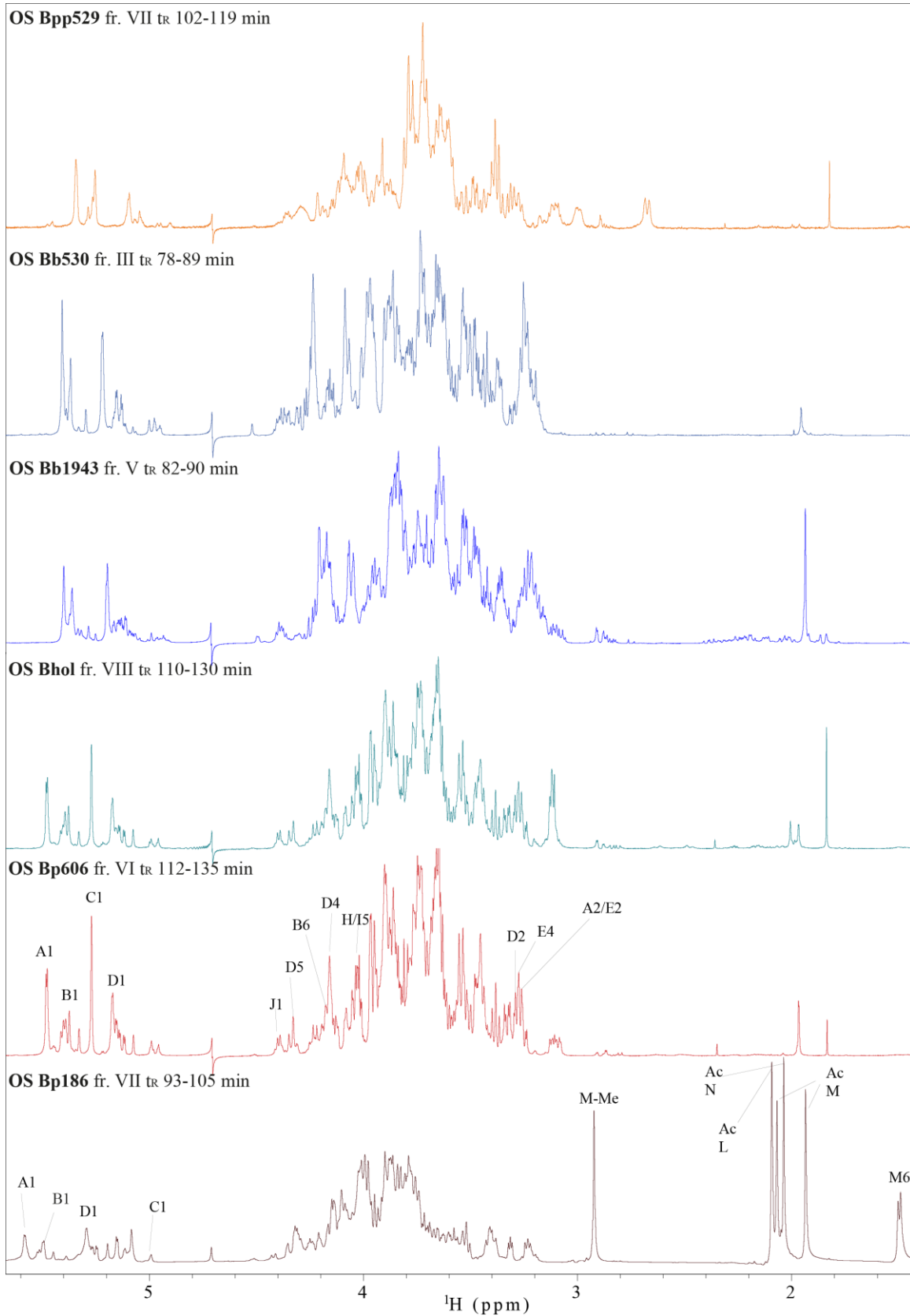
mogą też pochodzić, od innych niż LPS, składników osłony komórkowej np. od polisacharydów kapsularnych.

7.2.3. Oligosacharydy *Bordetellae* – strukturalne grupy reporterowe

W celu zidentyfikowania minimalnego OS wspólnego dla analizowanych *Bordetellae*, wyizolowano fragmenty polisacharydowe z lipopolisacharydów bakterii z rodzaju *Bordetella*. LPS hydrolizowano 1,5% kwasem octowym. Po odwirowaniu lipidu A, hydrolizaty heteropolisacharydów rozdzielano metodą filtracji żelowej na kolumnie chromatograficznej HiLoad 16/600 Superdex 30 pg (Ryc. 19). Dla polisacharydów i oligosacharydów rdzenia *B. pertussis* 186, *B. pertussis* 606, *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943 przeprowadzano porównawcze analizy głównych frakcji technikami spektroskopii NMR (Ryc. 20).



Ryc. 19. Rozdział hydrolizatów heteropolisacharydów bakterii z rodzaju *Bordetella*: *B. pertussis* 606 (A), *B. pertussis* 186 (B), *B. bronchiseptica* 530 (C), *B. bronchiseptica* 1943 (D), *B. parapertussis* 529 (E) i *B. holmesii* ATCC 51541 (F) na kolumnie filtracji żelowej Superdex 30 pg. Chromatogramy rejestrowano refraktometrycznie. Niebieskim kolorem zaznaczono główne frakcje OS rdzenia



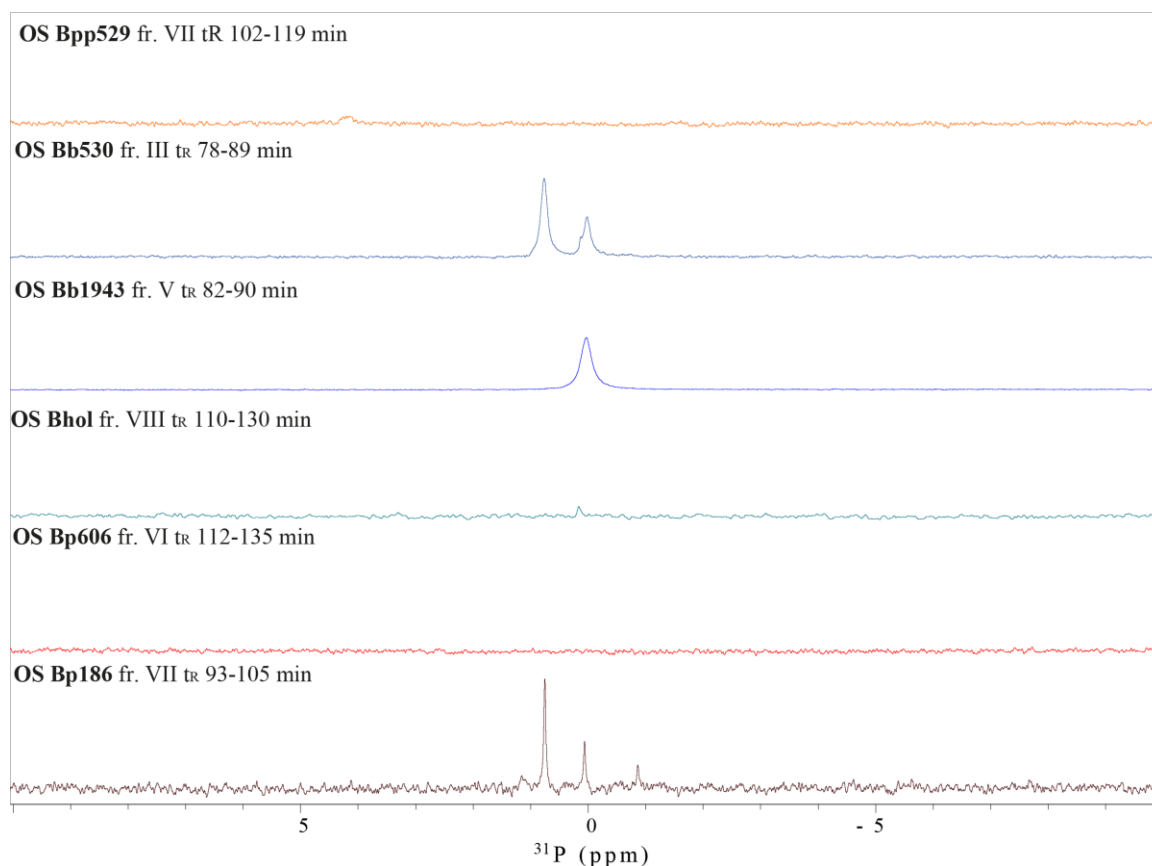
Ryc. 20. Porównanie profili jednowymiarowych widm NMR dla głównych oligosacharydowych frakcji analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*

Poszczególne wyizolowane frakcje oligosacharydów rdzenia po rozdzielach chromatograficznych (Ryc. 19) analizowano metodami spektroskopii NMR. Wykonywano pomiary jednowymiarowych widm protonowych ^1H NMR oraz serię eksperymentów dwuwymiarowych: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY oraz $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY. Aby umożliwić przypisanie poszczególnych sygnałów na widmach do odpowiednich atomów reszt cukrowych w cząsteczce, każdej reszcie nadano symbol literowy. Odpowiadające sobie reszty monosacharydowe zidentyfikowane we wszystkich OS oznaczono tym samym symbolem. Cyfra występująca po symbolu literowym reszty cukrowej oznacza kolejny atom węgla (lub przyłączony do niego proton), zaczynając od węgla anomerycznego. Do analiz porównawczych oligosacharydów rdzenia wybrano główne frakcje, których ilości pozwalały na uzyskanie dobrej jakości widm NMR.

Przed pełnymi analizami techniką spektroskopii NMR rejestrowano jednowymiarowe widma protonowe ^1H NMR (Ryc. 20). Profile takich widm dostarczają informacji o pewnych grupach reporterowych w strukturach oligosacharydów. Łatwą do zidentyfikowania grupą reporterową jest sygnał od grupy metylowej (na Ryc. 20 opisana jako M-Me) podstawiającej β -L-Fucp2NAc4NMe. Brak tego sygnału jak również sygnału węgla C6 fukozy (zaznaczony jako M6) wskazuje na brak β -L-Fucp2NAc4NMe wchodzącej w skład dystalnego trójcukru. Również bezpośrednio związane z nią reszty α -D-GlcpNAc, i β -D-Manp2NAc3NAcA będą nieobecne. Podobnych informacji dostarczają podobieństwa i różnice w obrębie sygnałów anomerycznych, które pochodzą od składników poszczególnych OS. Na podstawie takich grup można wstępnie określić podobieństwo strukturalne nieznanymi OS. Podobieństwo profilu OS *B. holmesii* ATCC 51541 w regionie protonów anomerycznych wskazuje na wspólne elementy strukturalne z OS *B. pertussis* 606. Strukturalnie podobne są również profile 1D NMR oligosacharydów *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943. Profil 1D NMR OS *B. parapertussis* 529 różni się od pozostałych profili.

Dodatkowo dla każdej analizowanej frakcji wykonano jednowymiarowe widma ^{31}P (Ryc. 21) oraz widma korelacji $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ w których określono miejsce podstawienia grupą fosforanową. Dla OS rdzenia *B. pertussis* 606 (fr. VI), *B. parapertussis* 529 (fr. VII) oraz *B. holmesii* ATCC 51541 (fr. VIII) nie zidentyfikowano sygnałów pochodzących od grup fosforanowych na widmach jednowymiarowych ^{31}P ani na widmach korelacji $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$. Dla OS rdzenia *B. pertussis* 186 (fr. VII), *B. bronchiseptica* 530 (fr. III) oraz *B. bronchiseptica* 1943 (fr. V) zidentyfikowano na jednowymiarowych

widmach ^{31}P sygnały od grup fosforanowych. Na korelacyjnych widmach $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ ustalono, że grupy fosforanowe podstawiają 2,7-Hepp (reszta B) w pozycji 4.

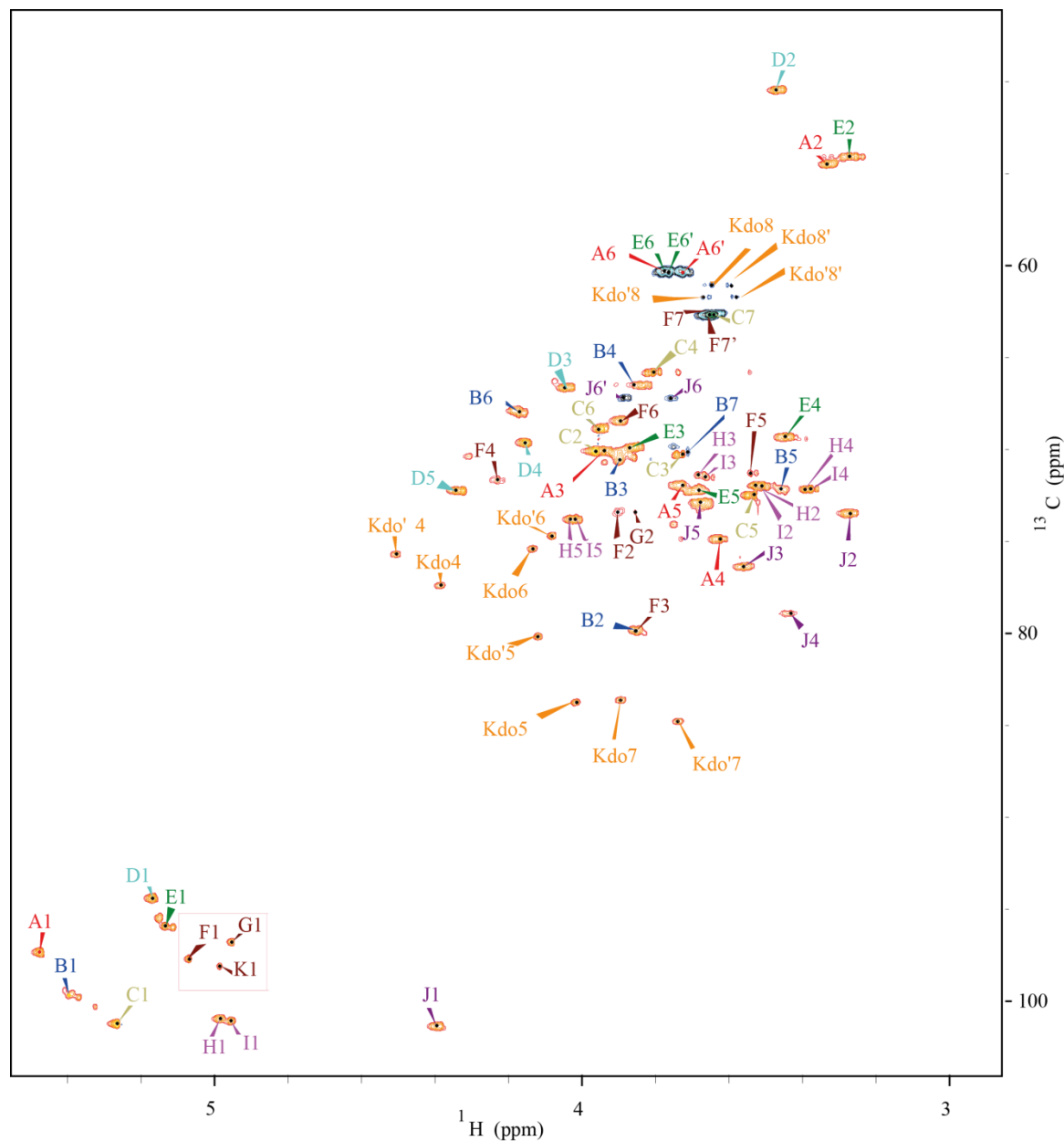


Ryc. 21. Jednowymiarowe widmo ^{31}P dla głównych oligosacharydowych frakcji analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*

Jak już wcześniej wspomniano *B. pertussis* produkuje dwa typy LOS. Pełna cząsteczka OS to dodekasacharyd, w którego skład wchodzi dystalny trójcukier, a niepełna cząsteczka OS jest go pozbawiona. Wartości przesunięć chemicznych dla *B. pertussis* 186 zostały opisane i są zgodne z danymi opublikowanymi dla szczepu *B. pertussis* 1414 (Caroff i in., 2000). Szczep *B. pertussis* 606 produkuje tylko jeden typ LOS. Jego OS jest nonasacharydem. Struktury oligosacharydów innych gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella*, zostały określone na podstawie podobieństwa wartości przesunięć chemicznych, poszczególnych reszt cukrowych, do odpowiadających im monosacharydów w strukturze rdzenia OS *B. pertussis* 606. Do analiz wybrano największe frakcje o odpowiadających sobie czasach retencji w chromatografii typu sączenia molekularnego.

WYNIKI

Główna oligosacharydowa frakcja rdzenia *B. pertussis* 606 (frakcja VI) ma czas retencji (t_R) 112-135 min (Ryc. 19, A). W pracy po raz pierwszy opisano przesunięcia chemiczne poszczególnych reszt cukrowych dla szczepu *B. pertussis* 606 (Ryc. 22).



Ryc. 22. Fragment widma $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT głównej frakcji (fr. VI) po rozdziale hydrolizatu OS *B. pertussis* 606

Zebrane uśrednione wartości przesunięć chemicznych poszczególnych reszt cukrowych dla analizowanych gatunków z rodzaju *Bordetella* przedstawiono w Tabeli 9. W załączonej na końcu pracy Tabeli S 1 zestawiono wartości przesunięć chemicznych dla wszystkich analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Połączenia pomiędzy resztami cukrowymi dla OS *B. pertussis* 606 ustalono w eksperymentach $^1\text{H},^1\text{H}$ NOESY oraz $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HMBC (Tabela 10).

WYNIKI

Tabela 9. Wartości średnie ^1H , ^{13}C przesunięć chemicznych monosacharydowych składników OS analizowanych *Bordetellae* w tym samym otoczeniu

Reszta		C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6	C7 H7	C8 H8
Kdo	4,7-anhKdof		202,7	42,8	77,3	83,7	75,4	83,7	61,1
				3,12	4,37	4,01	4,14	3,89	3,65 3,58
Kdo'	4,7-anhKdof'		202,9	38,9	75,6	80,1	74,6	84,7	61,8
				3,10	4,51	4,12	4,08	3,73	3,66
A	4,(6*)- α -D-GlcpN	97,9	54,6	71,2	73,1	72,5	60,4*		
		5,44	3,22	3,85	3,55	3,74	3,83		
B	2,7-L- α -D-Hepp	99,8	79,3	70,3	68,3 [^]	71,8	67,9	69,8	
		5,37	3,96	3,94	4,05	3,54	4,21	3,72	
C	L- α -D-Hepp	101,2	70,2	71,0	65,6	72,4	68,3	62,5	
		5,19	3,96	3,72	3,82	3,55	3,95	3,62 3,62	
D	α -D-GalpNA	94,6	50,4	66,5	69,5	71,9	174,2		
		5,18	3,47	4,05	4,19	4,40			
E	α -D-GlcpN	95,9	54,1	70,0	69,4	72,4	60,2		
		5,12	3,24	3,83	3,43	3,74	3,78 3,72		
F	3,4-L- α -D-Hepp	97,8	73,3	79,0	72,5	71,4	68,5	62,7	
		5,07	3,90	3,95	4,16	3,57	3,98	3,67 3,64	
H	α -D-GlcpA	100,8	71,8	72,1	72,1	73,1	175,3		
		4,99	3,51	3,70	3,41	4,10			
I	α -D-GlcpA	100,9	72,0	72,0	72,1	73,2	175,7		
		4,96	3,51	3,69	3,40	4,09			
J	4,6- β -D-Glcp	102,0	73,4	76,2	77,5	71,8	67,2		
		4,38	3,27	3,50	3,46	3,52	3,80 3,87		
#L	4- β -D- Manp2NAc3NAcA	99,6	51,4	53,1	78,5	70,4	174,7		
		4,959	4,214	4,184	3,812	3,855			
#M	3- β -L- Fucp2NAc4NMe	100,6	50,7	78,1	62,2	67,7	16,4		
		4,49	3,66	4,08	3,67	3,95	1,36		
#N	α -D-GlcpNAc	96,6	53,4	70,4	69,4	71,7	59,8		
		5,02	3,73	3,59	3,39	3,62	3,73 3,68		
#E' Bb530	α -D-GlcpN	95,3	54,1	69,9	69,4	72,2			
		5,15	3,3	3,86	3,42	3,69			
#E' Bb1943	α -D-GlcpN	95,2	54,1	69,9	69,4	72,2			
		5,14	3,30	3,84	3,41	3,66			
#S Bpp529	α -D-GlcpN	96,6	54,9	72,6	70,1	71,6	60,5		
		4,90	2,67	3,71	3,28	3,63	3,78 3,71		

* dla *B. pertussis* 186 wartości przesunięć chemicznych C6/H6 reszty A są inne ze względu na podstawienie dystalnym trójczukrem (δ_{C} 67,0/ δ_{H} 3,98 ppm)

[^] dla *B. bronchiseptica* 530 wartości przesunięć chemicznych C4/H4 reszty B są inne ze względu na podstawienie grupą fosforanową (Bb 530 δ_{C} 71,2/ δ_{H} 4,35 ppm)

[#] Reszty L, M, N obecne są jedynie w OS *B. pertussis* 186; Reszta S obecna jest w OS *B. parapertussis* 529, a reszta E' w OS *B. bronchiseptica* 530 i 1943

Pełna Tabela S 1 przedstawiająca wartości przesunięć chemicznych dla poszczególnych reszt cukrowych OS wszystkich analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella* znajduje się w załączniku na końcu pracy

Tabela 10. Połączenia między resztami cukrowymi obserwowane w eksperymentach ^1H , ^1H NOESY i ^1H , ^{13}C HMBC dla OS *B. pertussis* 606

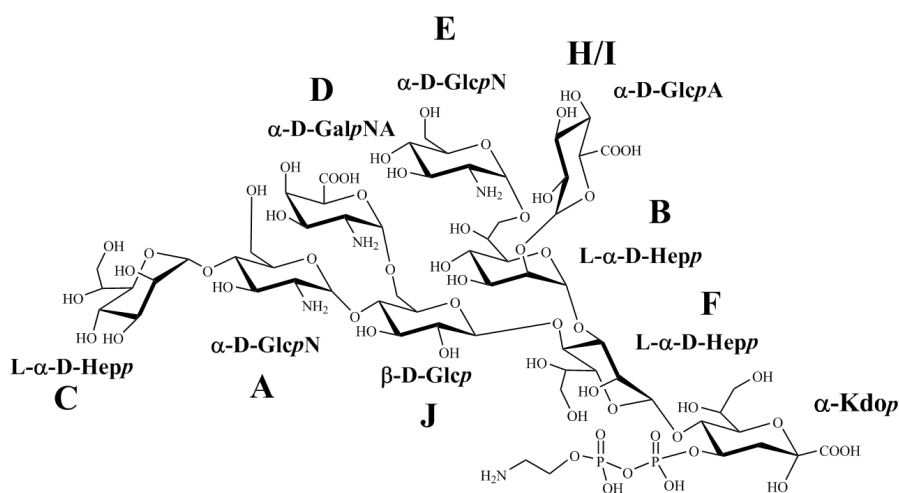
Symbol literowy	Atom C1/ H1	Korelacja z sygnałem $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$	Połączenie
A	97,4/ 5,47	78,9/ 3,44	C4, H4 reszty J
B	99,7/ 5,38	79,9/ 3,84	C3, H3 reszty F
C	101,2/ 5,27	74,9 3,63	C4, H4 reszty A
D	94,5/ 5,15	67,2/ 3,76 3,89	C6, H6 reszty J
E	96,0/ 5,12	70,3/ 3,70	C7, H7 reszty B
F	97,7/ 5,07	83,7/ 4,02	C5, H5 reszty Kdo
H	101,0/ 4,97	79,9/ 3,86	C2, H2 reszty B
I	101,1/ 4,96	79,9/ 3,85	C2, H2 reszty B
J	101,4/ 4,39	71,7 4,23	C4, H4 reszty F

Absolutną konfigurację składników cukrowych OS *B. pertussis* 606 przyjęto na podstawie podobieństwa wartości przesunięć chemicznych poszczególnych grup monosacharydów do scharakteryzowanych wcześniej reszt oligosacharydu *B. pertussis* 186. Grupa monosacharydów o podobnych wartościach przesunięć chemicznych, w podobnym otoczeniu, nie będzie się różnić absolutną konfiguracją. Na podstawie powyższych wyników oraz danych literaturowych dla struktury OS *B. pertussis* 186, ustalono strukturę OS szczepu *B. pertussis* 606. Oligosacharyd *B. pertussis* 606 jest nonasacharydem i zbudowany jest z reszt: kwasu 4,7-anhydro-3-deoksy-D-manno-2-oktulofuranozonowego (główna forma Kdo w kwasowych warunkach), 3,4-L-glicero- α -D-manno-heptozy (3,4-L- α -D-Hepp), 2,7-L-glicero- α -D-manno-heptozy (2,7-L- α -D-Hepp), α -D-glukozaminy (α -D-GlcpN), kwasu α -D-glukuronowego (α -D-GlcpA), kwasu α -D-galaktozaminouronowego (α -D-GalpNA), 4,6- β -D-glukozy (4,6- β -D-Glcp), 4- α -D-glukozaminy (4- α -D-GlcpN) i L-glicero- α -D-manno-heptozy (L- α -D-Hepp). Strukturę OS *B. pertussis* 606 przedstawiono na Ryc. 23.

We wszystkich zaprezentowanych na rycinach strukturach OS bakterii z rodzaju *Bordetella* resztę Kdo przedstawiono w pełnej natywnej ufosforylowanej formie opisanej w literaturze. Hydroliza LPS oraz rozdziały chromatograficzne przeprowadzone były odpowiednio w 1,5% i 0,05 M kwasie octowym, dlatego na dwuwymiarowych widmach ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT obserwujemy różne formy kwasu 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego opisanego jako: Kdo i Kdo'. W niskim pH Kdo jest niestabilny i dochodzi do jego konwersji w kwas 4,7-anhydro-3-deoksy-D-manno-2-oktulofuranozowy, 4,8-anhydro-3-deoksy-D-manno-2-oktulofuranozowy (Volk i in., 1972), 2,7-anhydro-3-deoksy-D-manno-2-oktulofuranozowy oraz kwas 5-(D-erythro-1,2,3-trihydroksypropylo)-2-furanokarboksylowy (McNicholas i in., 1987). W przypadku

podstawienia Kdo przez grupy fosforanowe przy węglu C4 dochodzi do β -eliminacji z wytworzeniem kwasu 4,7-anhydro-3-deoksy-D-manno-2-oktulofuranozowego, którego sygnały obserwowane są na widmach NMR, co jest potwierdzeniem obecności grup fosforanowych w natywnych OS *Bordetellae*.

Oprócz różnych wariantów Kdo na przedstawionych widmach w regionie węgla anomerycznego opisano dodatkowe sygnały (G1 i K1), których jednak nie udało się jednoznacznie zidentyfikować przez krótki system spinowy. Ich przesunięcia chemiczne są podobne do przesunięć chemicznych protonów H1 i H2 3,4-L- α -D-Hepp. Sygnały opisane jako G i K mogą być 3,4-L- α -D-Hepp z rdzenia wewnętrznego, w innym otoczeniu spowodowanym obecnością różnych form Kdo, dlatego na Ryc. 22, Ryc. 24, Ryc. 26, Ryc. 27, Ryc. 28 i Ryc. 34 sygnały F1, G1, K1 zostały zaznaczone ramką.

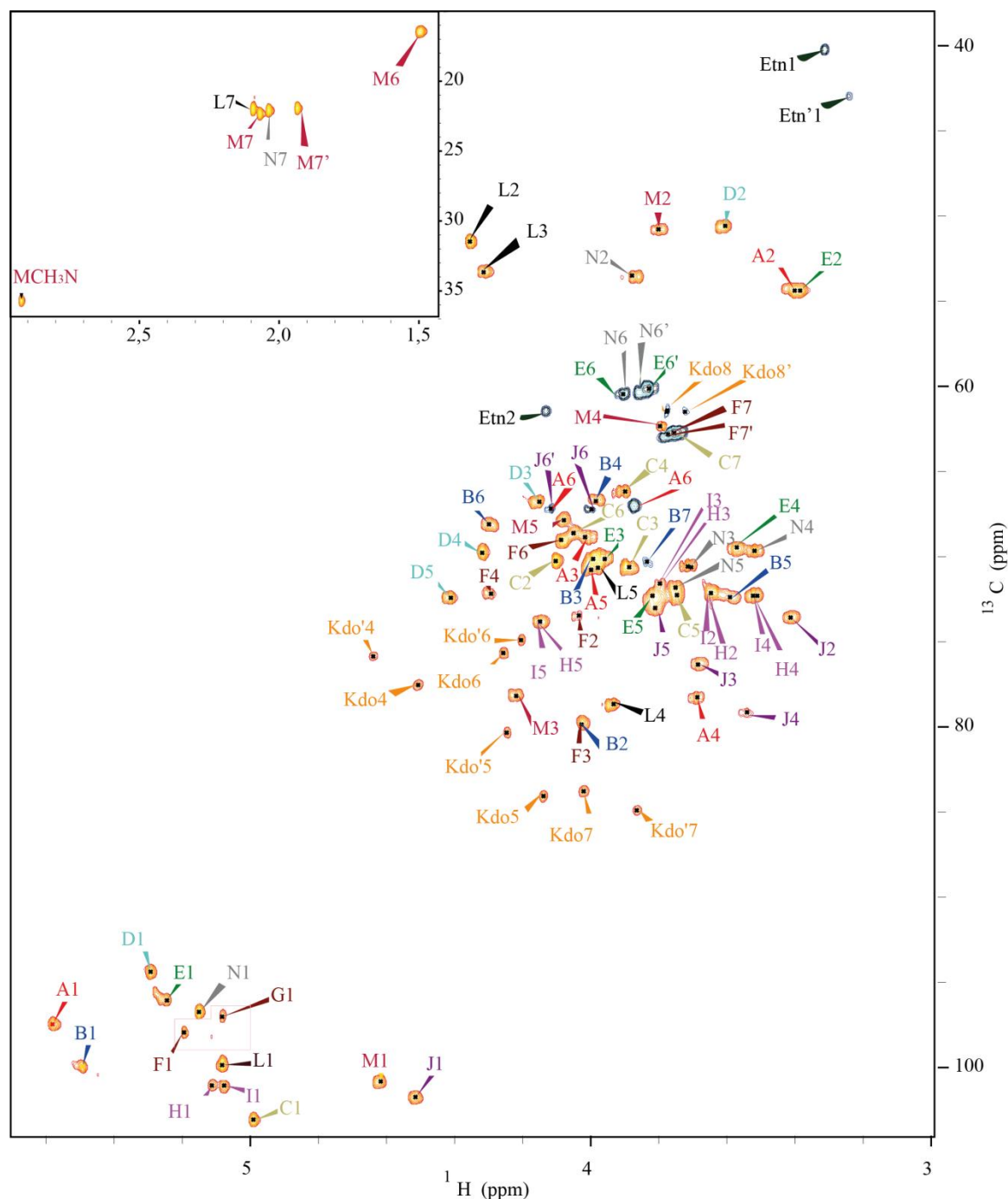


Ryc. 23. Struktura OS *B. pertussis* 606

W kolejnym etapie przeprowadzono rozdział OS *B. pertussis* 186. Czas retencji głównej frakcji VII (Ryc. 19, B) to ok. 93-105 min. i dla tej frakcji przeprowadzono analizy metodami spektroskopii NMR. Sygnały od pełnego oligosacharydu pojawiają się już we frakcji IV (t_R 73-78min). Struktura cukrowa OS w poszczególnych frakcjach tego rozdziału jest niezmienna, różnice w czasach retencji wynikają z obecności podstawników takich jak fosforany (P), pirofosforany (PP) czy etanolamina (Etn). Obecność takich niecukrowych podstawników zwiększa masę cząsteczkową izolowanego oligosacharydu, modyfikuje jego całkowity ładunek i wpływa na czas retencji. Fragment widma $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT zarejestrowanego dla fr. VII przedstawiono poniżej na Ryc. 24, a przesunięcia chemiczne reszt cukrowych OS *B. pertussis* 186 przedstawiono w Tabeli 9. Przesunięcia chemiczne porównywano z przesunięciami chemicznymi dla OS

WYNIKI

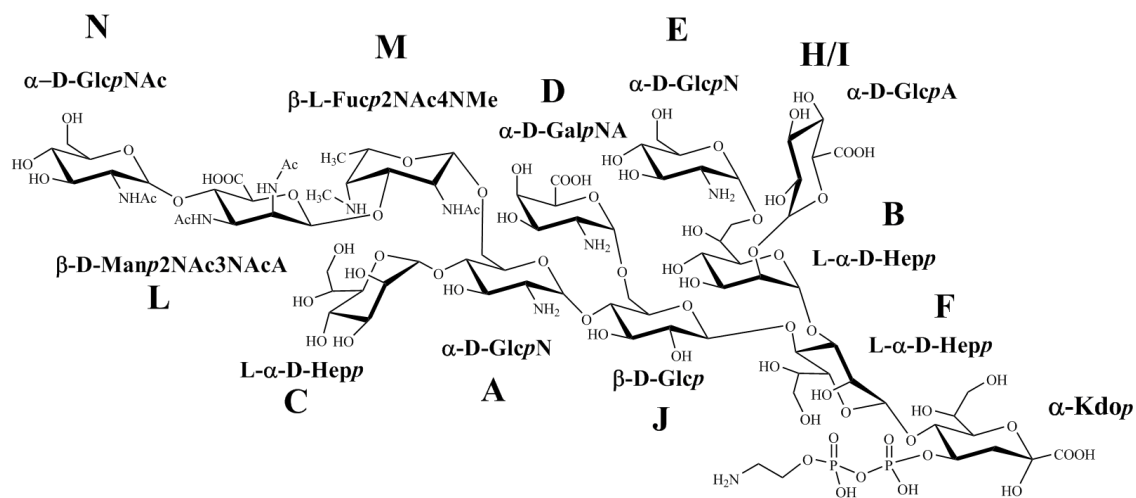
B. pertussis 606 oraz z opublikowanymi przez Caroff i wsp. przesunięciami dla OS szczepu *B. pertussis* 1414 (Caroff i in., 2000).



Ryc. 24. Fragmenty widma ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT frakcji VII po rozdzieleniu hydrolizatu OS *B. pertussis* 186

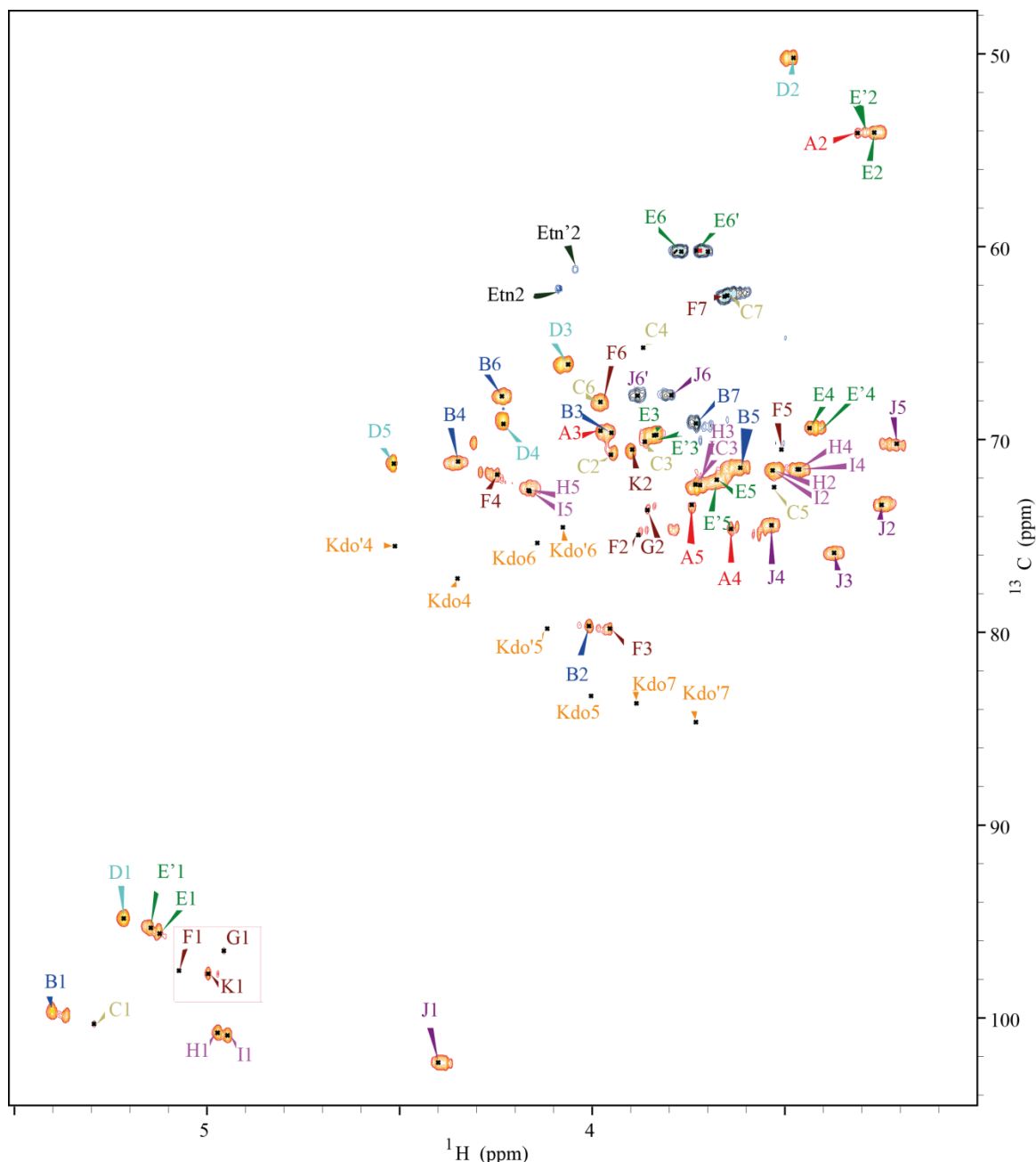
Oligosacharyd wyizolowany z LOS *B. pertussis* 186 jest dodekasacharydem. W porównaniu z rdzeniem szczepu *B. pertussis* 606, zawiera trzy dodatkowe reszty cukrowe: α -D-GlcpNAc, β -D-Manp2NAc3NAcA oraz β -L-Fucp2NAc4NMe. Dane o połączeniach w obrębie dystalnego trójcukru są zgodne z opublikowanymi

przesunięciami chemicznymi (Niedziela i in., 2005). Strukturę pełnej cząsteczki oligosacharydu rdzenia *B. pertussis* 186 przedstawiono na Ryc. 25.



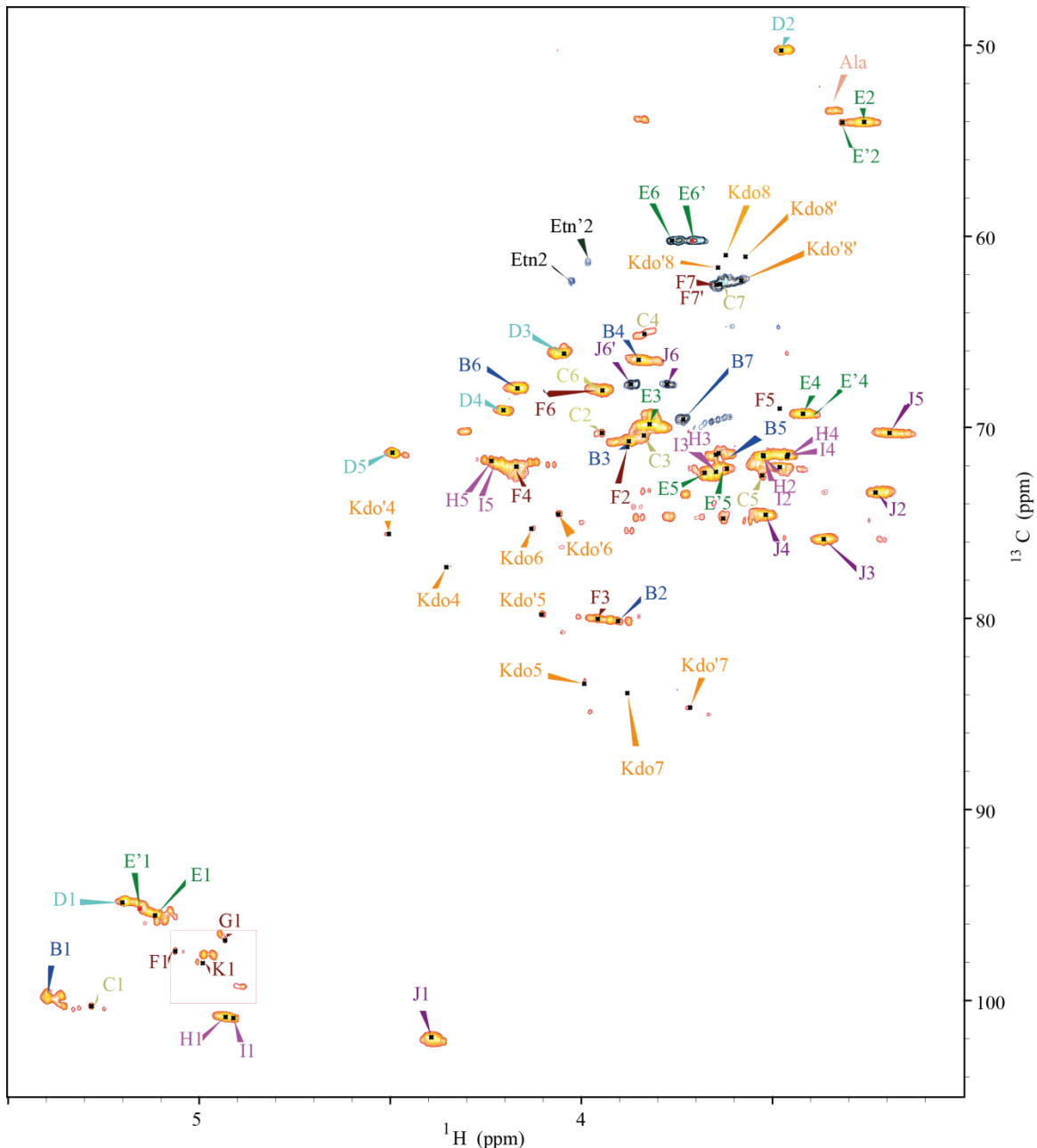
Ryc. 25. Struktura OS *B. pertussis* 186

W kolejnych etapach analizowano OS rdzenia pozostałych wybranych szczepów z kolekcji. Chromatogram po rozdzieleniu hydrolizatu heteropolisacharydu *B. bronchiseptica* 530 (Ryc. 19, C) potwierdza początkowe przypuszczenia, że jest to szczep szorstki. Nieobserwowane są szczyty o $t_R \sim 40$ min, które wskazywałyby na obecność długołańcuchowych polisacharydów. Pełne analizy metodami spektroskopii NMR przeprowadzono dla głównej oligosacharydowej frakcji III o czasie retencji 78-89 min. Fragment widma $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT przedstawiono poniżej na Ryc. 26, a przesunięcia chemiczne reszt cukrowch przedstawiono w Tabeli 9. Zaprezentowany rozdział elektroforetyczny (Ryc. 16) LPS *B. bronchiseptica* 530 i rozdział chromatograficzny (Ryc. 19, C) wyizolowanego OS, wskazują na to, że LPS *B. bronchiseptica* 530 pozbawiony jest łańcucha O-swoistego. Na widmach NMR nie zidentyfikowano sygnałów charakterystycznych dla dystalnego trójcukru (reszta L, M, N), dodatkowo terminalnej L- α -D-Hepp (reszta C) i 4,6- α -D-GlcpN (reszta A). W OS *B. bronchiseptica* 530 obserwowana jest pewna heterogenność. Utrata reszt A i C nie jest całkowita, na widmach pojawiają się sygnały od wspomnianych reszt, ale są to sygnały znacznie słabsze w porównaniu z pozostałymi sygnałami, ponieważ podstawienie nie jest kompletne.



Ryc. 26. Fragment widma ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT frakcji III po rozdzieleniu hydrolyzatu PS *B. bronchiseptica* 530

Na jednowymiarowych widmach ^{31}P (Ryc. 21) zidentyfikowano sygnały pochodzące od grup fosforanowych. Na korelacyjnych widmach ^1H , ^{31}P ustalono, że grupy fosforanowe podstawią 2,7-Hepp (reszta B) na węglu C4, co zmienia jej przesunięcia chemiczne (δ_{C} 71,2/ δ_{H} 4,35 ppm) (Tabela 9 i Tabela S 1). Sygnały od Kdo również są znacznie słabsze, w porównaniu do poprzednich przedstawionych widm OS *B. pertussis* 186 i OS *B. pertussis* 606.



Ryc. 27. Fragment widma $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT głównej frakcji (fr. V) po rozdzielaniu hydrolizatu PS *B. bronchiseptica* 1943

Chromatogram po rozdzielaniu hydrolizatu PS *B. bronchiseptica* 1943 (Ryc. 19, D) wskazuje na obecność w preparacie niewielkiej frakcji dłuższych łańcuchów polisacharydowych (fr. I), które nie wybarwiły się w rozdzielaniu elektroforetycznym (Ryc. 16). Do analiz oligosacharydu rdzenia wybrano główną frakcję V o czasie retencji 82-90 min. OS *B. bronchiseptica* 1943 jest bardziej heterogenny niż szczep *B. bronchiseptica* 530. Na widmach NMR polisacharydu przed rozdzielaniem na kolumnie filtracji żelowej (widma nie zamieszczone), nie były obserwowane sygnały od antygeny O, terminalnej L-

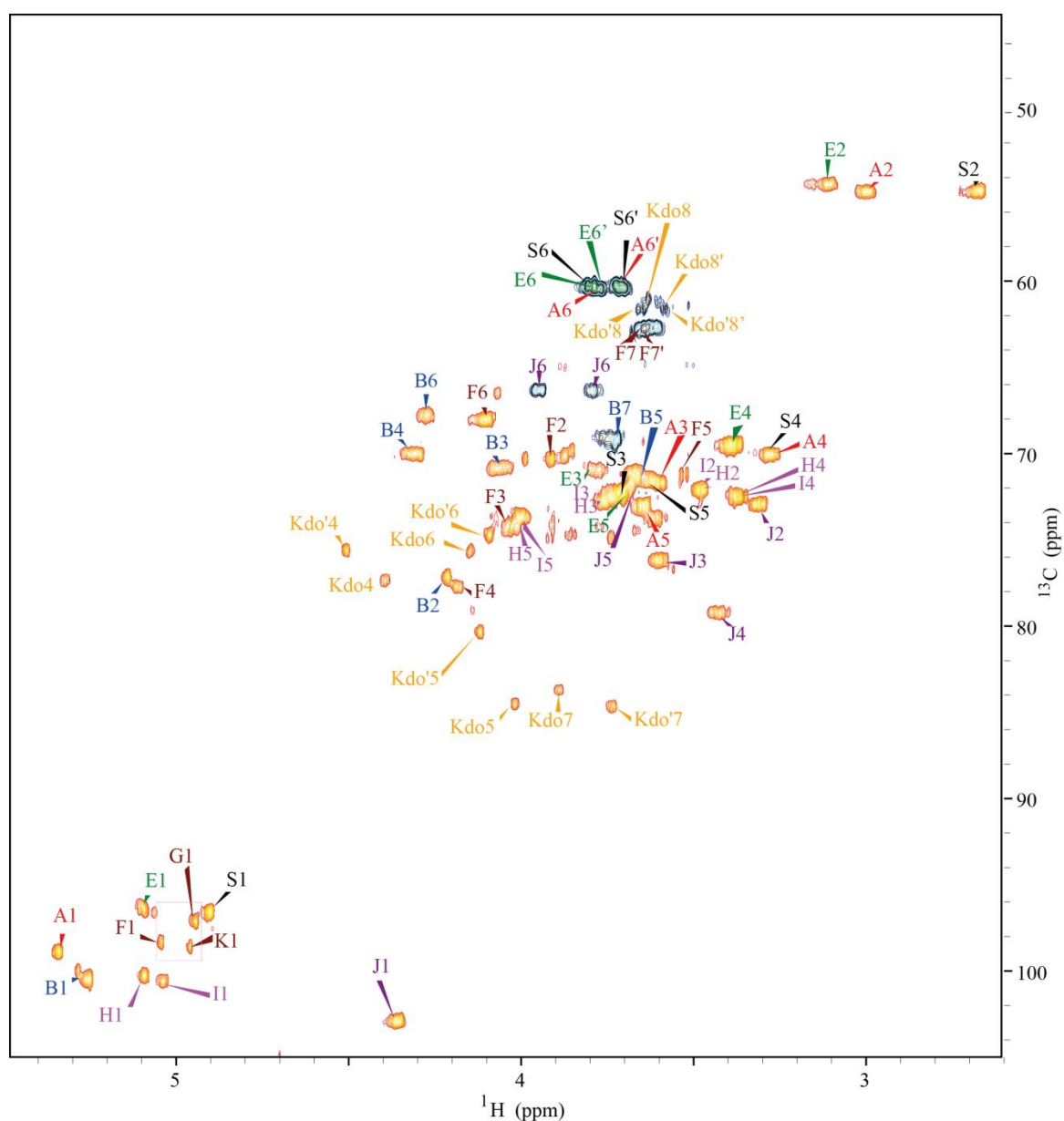
α -D-Hepp (reszta C) i 4,6- α -D-GlcpN (reszta A) oraz trójczukru (reszty L, M, N). Zupełnie jak w przypadku szczepu *B. bronchiseptica* 530. Natomiast po rozdziale (Ryc. 19, D), w głównej frakcji V obserwowane są słabe sygnały od reszt A i C, więc utrata tych reszt również nie jest całkowita. Na przedstawionym widmie $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT frakcji V (Ryc. 27) zidentyfikowano sygnał, którego przesunięcia chemiczne odpowiadają alaninie ($\delta_{\text{C}} 53,4 / \delta_{\text{H}} 3,34$ ppm).

Oba szczepy *B. bronchiseptica* 530 i 1943 są szczepami szorstkimi. Ich oligosacharyd rdzenia ma podobną strukturę. Minimalny OS zbudowany jest z reszt: kwasu 4,7-anhydro-3-deoksy-D-manno-2-oktulozofuranozonowego (Kdo), 3,4-L-glicero- α -D-manno-heptozy (3,4-L- α -D-Hepp), 2,7-L-glicero- α -D-manno-heptozy (2,7-L- α -D-Hepp), α -D-glukozaminy (α -D-GlcpN), kwasu α -D-glukuronowego (α -D-GlcpA), kwasu α -D-galaktozaminouronowego (α -D-GalpNA), 6- β -D-glukozy (6- β -D-Glcp). Podstawienie β -D-Glcp w pozycji 4 przez α -D-glukozaminę (α -D-GlcpN) i L-glicero- α -D-manno-heptozę (L- α -D-Hepp) jest niekompletne.

Chromatogram dla rozdziału hydrolizatu PS *B. parapertussis* 529 (Ryc. 19, E) przedstawia obraz typowy dla długołańcuchowych polisacharydów (fr. I), które rozdzielone pod względem wielkości mają najkrótszy t_{R} ~40 min, oraz dalszych frakcji oligosacharydowych. Do analiz porównawczych rdzenia wybrano fr. III o t_{R} 80-92 min oraz fr. VII o t_{R} 102-119 min odpowiadające głównym oligosacharydowym frakcjom rdzenia *B. pertussis*. OS obu analizowanych frakcji wykazuje istotne różnice. We frakcji III obecne są wszystkie sygnały od oligosacharydu rdzenia oraz bardzo słabe, ale charakterystyczne sygnały od dystalnego trójczukru (reszty L, M, N). OS podstawiony jest przez dystalny trójczukier w niewielkim stopniu. Największa zidentyfikowana cząsteczka OS *B. parapertussis* 529 ma budowę jak OS *B. pertussis* 186. Na widmach $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT głównej oligosacharydowej frakcji VII (t_{R} 102-119 min) przedstawionej na Ryc. 28 pierwszą dostrzeżoną zmianą jest brak sygnałów o przesunięciach chemicznych charakterystycznych dla reszty D. W analizowanej frakcji nie zidentyfikowano reszty α -D-GalpNA, nie zidentyfikowano również sygnałów pochodzących od dystalnego trójczukru. Zidentyfikowano natomiast dodatkową glukozaminę (reszta S) podstawiającą β -D-Glcp OS rdzenia w pozycji 6. We fr. VII OS rdzenia α -D-GalpNA jest zastąpiona przez α -D-GlcpN. Przesunięcia chemiczne reszt cukrowych przedstawiono w Tabeli S 1. Nieobecność reszty α -D-GalpNA potwierdza wcześniejsze doniesienia literaturowe co do struktury OS rdzenia *B. parapertussis*. Natomiast pewnym zaskoczeniem jest obecność dodatkowej α -D-GlcpN w miejscu α -D-GalpNA oraz obecność terminalnej Hepp, która

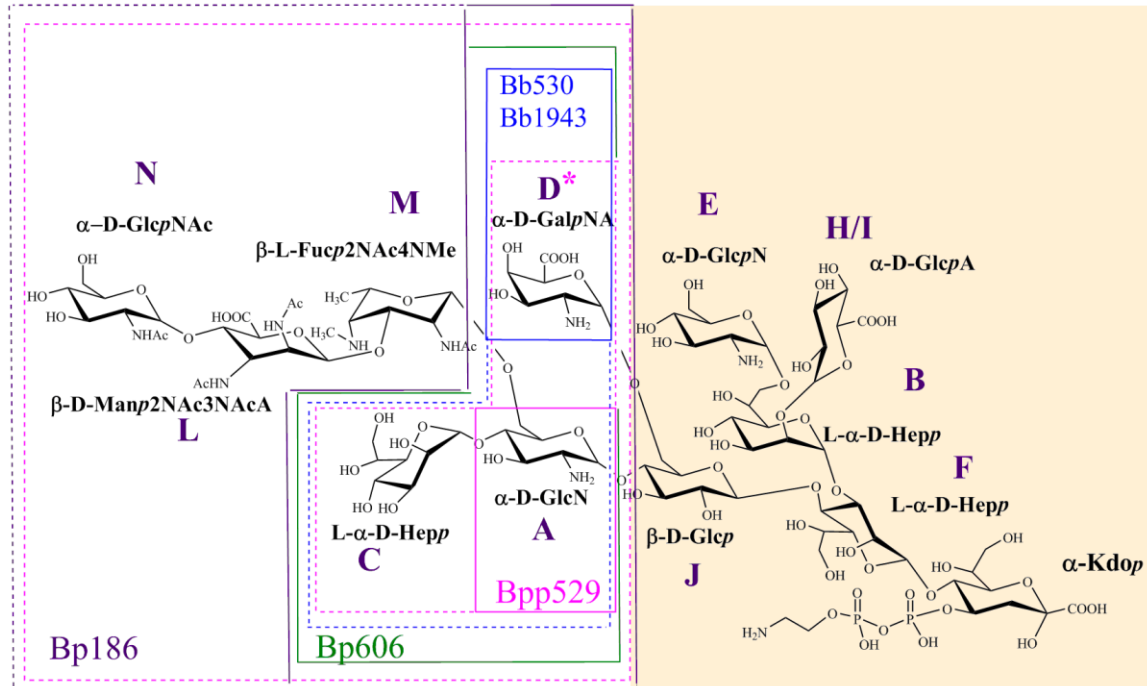
WYNIKI

nie była obserwowana w strukturach OS rdzenia *B. parapertussis* analizowanych przez Prestona i wsp (Preston i in., 2006). Ze względu na ograniczoną ilość uzyskanego materiału, pełna analiza strukturalna poszczególnych frakcji nie była możliwa. Na podstawie przeprowadzonych analiz głównych frakcji ustalono, że pełna struktura OS *B. parapertussis* 529, przedstawiona na Ryc. 29, jest taka sama jak oligosacharyd rdzenia *B. pertussis* 186. Jednak uwzględniając intensywność sygnałów przeważa OS rdzenia, który ma strukturę jak OS *B. pertussis* 606, natomiast najmniejszy opisany rdzeń oprócz dystalnego trójczukru pozbawiony jest reszty α -D-GalpNA, a zawiera dodatkowo α -D-GlcN.



Ryc. 28. Fragment widma ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT frakcji VII po rozdziale hydrolizatu PS *B. parapertussis* 529

Stałe i zmienne elementy struktur oligosacharydu rdzenia analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella* przedstawiono na Ryc. 29. Najmniejszy wspólny heksasacharydowy fragment zaznaczono kolorem beżowym. Minimalne OS dla każdego szczepu *Bordetellae* zaznaczono ciągłymi liniami w różnych kolorach, a niepełne podstawienia przez reszty cukrowe liniami przerywanymi.



Ryc. 29. Struktura OS *Bordetellae* z zaznaczonym minimalnym OS struktury we wszystkich analizowanych gatunkach i szczepach. * w krótszej formie OS *B. parapertussis* 529 reszta α -D-GalpNA jest zastąpiona przez α -D-GlcN

W OS *B. bronchiseptica* 530 i 1943 dodatkowym stałym elementem jest α -D-GalpNA (linia ciągła niebieska), natomiast zmiennym elementem jest α -D-GlcNA i L- α -D-Hepp (linia niebieska przerywana). W OS *B. parapertussis* 529 dodatkowym stałym elementem jest α -D-GlcN (linia ciągła różowa), a zmiennymi elementami są α -D-GlcNA, β -D-Manp2NAc3NAcA, β -L-Fucp2NAc4NMe, L- α -D-Hepp oraz α -D-GalpNA, która w krótszej formie OS jest zastąpiona przez α -D-GlcNA (linia różowa przerywana). Dla OS *B. pertussis* 186 linią fioletową zaznaczono dodatkowe stałe reszty, które są takie same jak dla OS *B. pertussis* 606 (linia zielona), a dodatkowy zmienny dystalny trójcukier zaznaczono linią fioletową przerywaną.

7.2.4. Struktura lipopolisacharydu *B. holmesii* ATCC 51541

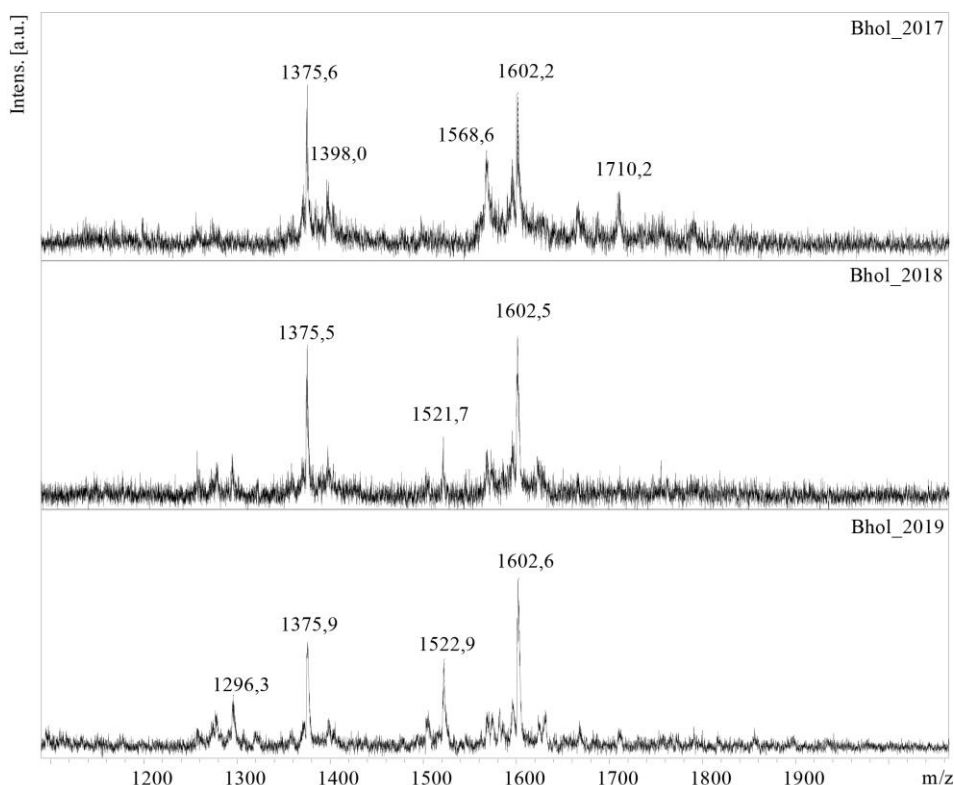
B. holmesii jest stosunkowo nowo odkrytą bakterią i niewiele wiadomo o pełnej strukturze lipopolisacharydu. Dotychczas opisana została jedynie struktura lipidu A.

WYNIKI

Z masy bakteryjnej, nagromadzonej podczas hodowli *B. holmesii* ATCC 51541 (w trzech mediach hodowlanych) przeprowadzono ekstrakcje wodno-fenolowe w celu wyizolowania LPS. Lipid A oddzielono przez wirowanie z roztworu LPS po hydrolizie 1,5% kwasem octowym.

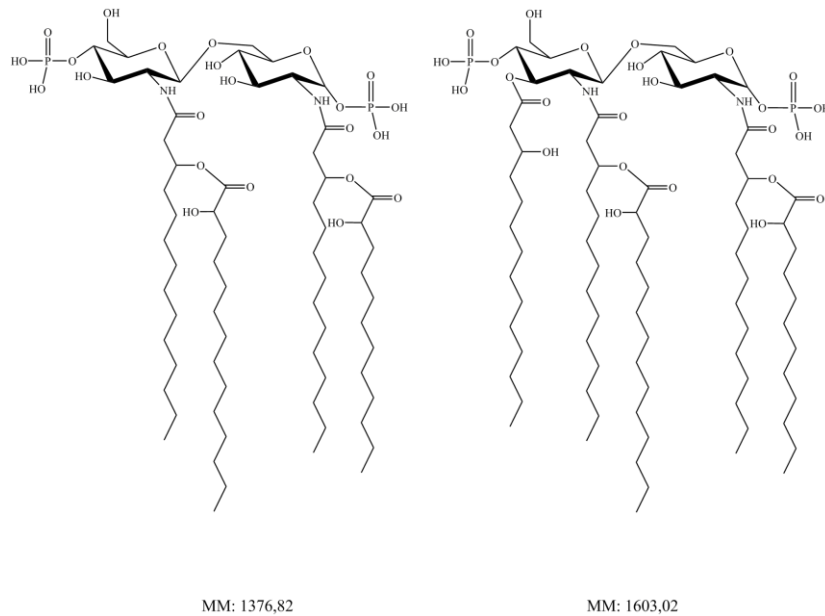
Widma MALDI-TOF MS wyizolowanych lipidów A przedstawiono na Ryc. 30. W trybie reflektromu polaryzacji ujemnej, z DHB jako matrycą, zarejestrowano główne jony $[M-H]^-$ monoizotopowych mas cząsteczek o m/z 1375,9 oraz 1602,6 co odpowiada teoretycznym masom badanego lipidu A.

Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej opublikowaną strukturą lipidu A *B. holmesii* ATCC 51541 (Bouchez i in., 2017). Jon o m/z 1602,6 to cząsteczka zbudowana z dwóch reszt glukozaminy, dwóch fosforanów, trzech 14-węglowych 3-hydroksy kwasów tłuszczowych, oraz po jednym 14- i 12-węglowym 2-hydroksy kwasie tłuszczowym. Jon o m/z 1375,9 to cząsteczka pozbawiona jednego 14-węglowego 3-hydroksy kwasu tłuszczowego. Strukturę przedstawiono na Ryc. 31. Zarejestrowane widma służyły jako dodatkowe potwierdzenie prawidłowo przeprowadzonej hodowli *B. holmesii* oraz izolacji lipopolisacharydów z masy bakteryjnej.



Ryc. 30. Widma MALDI-TOF MS lipidu A *B. holmesii* ATCC 51541 z różnych preparacji LPS. Widma uzyskano w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej z użyciem DHB jako matrycy.

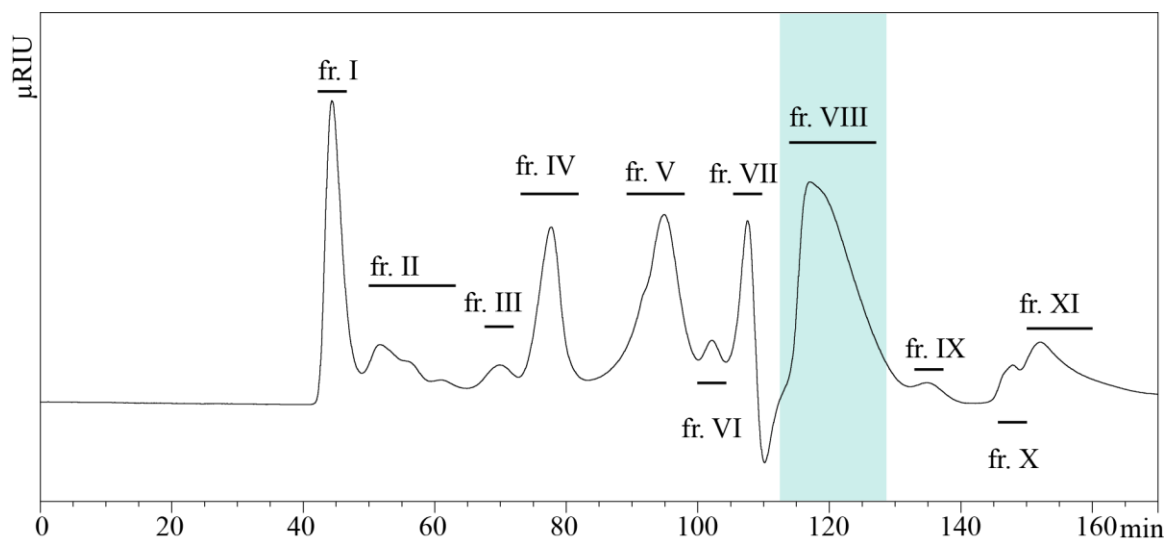
WYNIKI



Ryc. 31. Struktura lipidu A *B. holmesii* ATCC 51541

Po potwierdzeniu prawidłowej struktury lipidu A, przystąpiono do analiz niepoznanych struktur oligosacharydu rdzenia oraz łańcucha O–swoistego.

Dla *B. holmesii* wykonano trzy izolacje LPS, jednak odpowiednią ilość materiału do przeprowadzenia dalszych badań polisacharydów i wygenerowania dobrej jakości widm NMR, wypreparowano z hodowli przeprowadzonych na syntetycznej pożywce Stainer–Scholte z dodatkiem witaminy B₂. Chromatogram rozdziału heteropolisacharydów wyizolowanych z LPS Bhol_2019 przedstawiono na Ryc. 32.

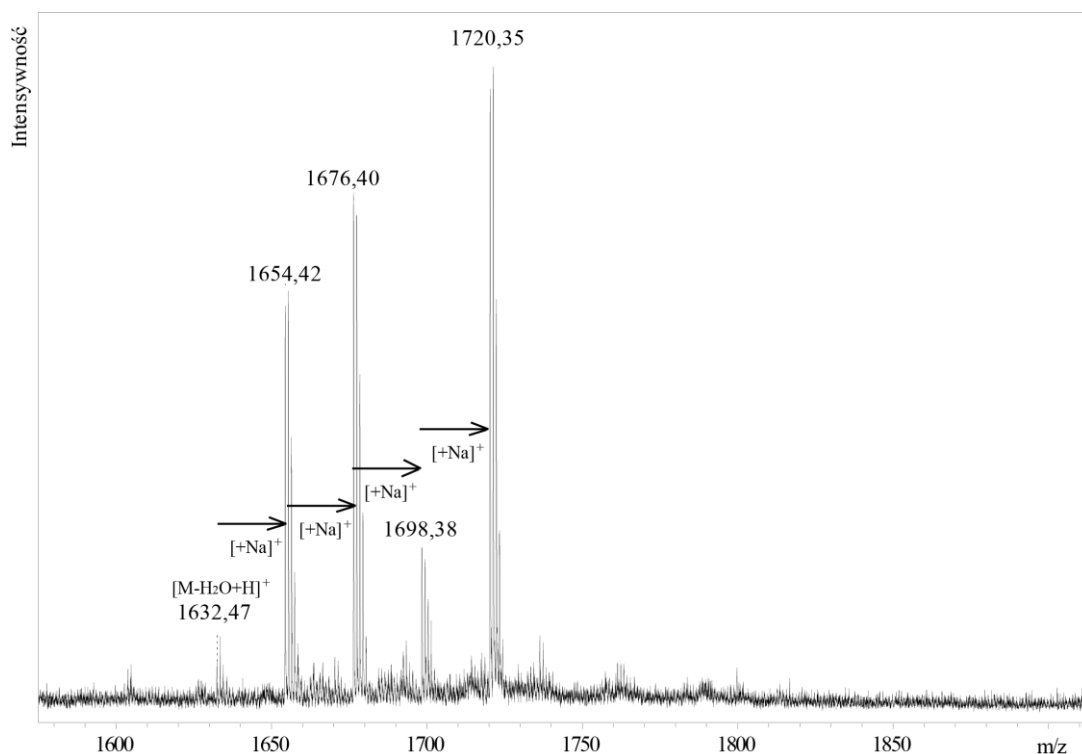


Ryc. 32. Rozdział hydrolyzatu PS *B. holmesii* ATCC 51541 na kolumnie filtracji żelowej Superdex 30 pg. Pomiar rejestrowano refraktometrycznie

Na kolumnę naniesiono ~10 mg materiału. Frakcje z rozdziału hydrolyzatu PS *B. holmesii* (Ryc. 32) poddano dalszym analizom. Porównywano oligosacharydy rdzenia

ze znanymi rdzeniami pozostałych bakterii z rodzaju *Bordetella*, analizy porównawcze OS rozpoczęto od największej wyizolowanej frakcji VIII (2,8 mg) o t_R 110-130 min oraz frakcji IV (~1 mg) o t_R 74-82 min. W kolejnych etapach analizowano długołańcuchowy polisacharydowy łańcuch O-swoisty fr. I (1 mg) o najkrótszym czasie retencji (t_R 40-48 min).

Dla głównej frakcji OS rdzenia *B. holmesii* (fr. VIII), której t_R (110-130 min) odpowiada t_R (112-135 min) głównej frakcji OS *B. pertussis* 606 zarejestrowano widmo MALDI-TOF MS (Ryc. 33). Teoretyczna masa monoizotopowa OS *B. pertussis* 606 wynosi 1649,5 Da. Obserwowany jon o m/z 1632,47 odpowiada podobnie jak u *B. pertussis* 606 nonasacharydowi pozbawionemu cząsteczki wody. Różnica pomiędzy kolejnymi jonami odpowiada adduktowi sodowemu.

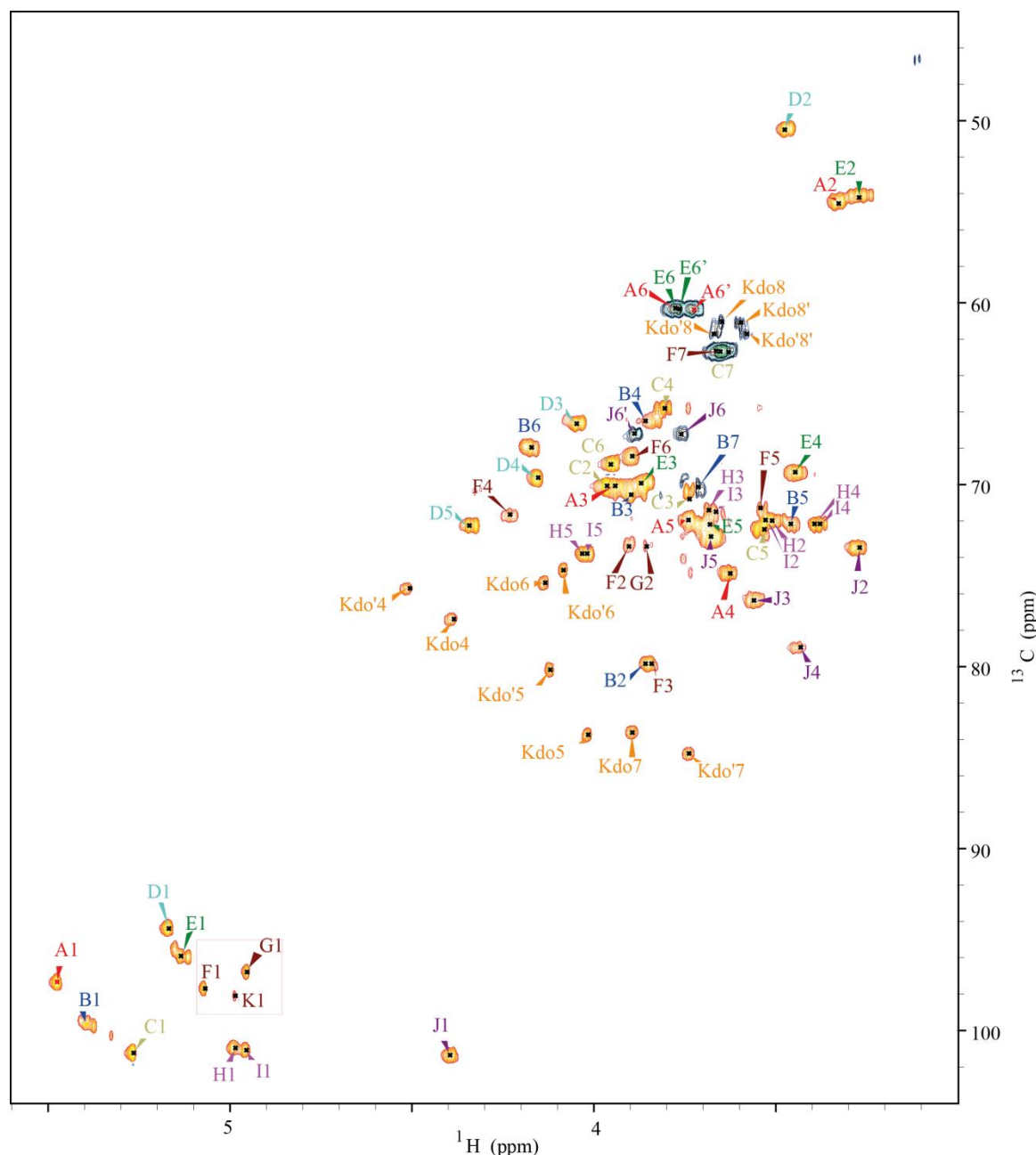


Ryc. 33. Fragment widma MALDI-TOF MS fr. VIII OS *B. holmesii* ATCC 51541 w trybie reflektromu polaryzacji dodatniej z użyciem THAP jako matrycy

W dalszych etapach przeprowadzono analizy metodami spektroskopii NMR. Profil jednowymiarowego widma protonowego ^1H NMR zarejestrowanego dla fr. VIII OS *B. holmesii* (Ryc. 20) ujawnił podobieństwo do profilu widma OS *B. pertussis* 606. Dla fr. VIII zarejestrowano zestaw eksperymentów dwuwymiarowych pozwalających na pełny opis systemów spinowych składników tego OS ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY oraz $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY). Na

WYNIKI

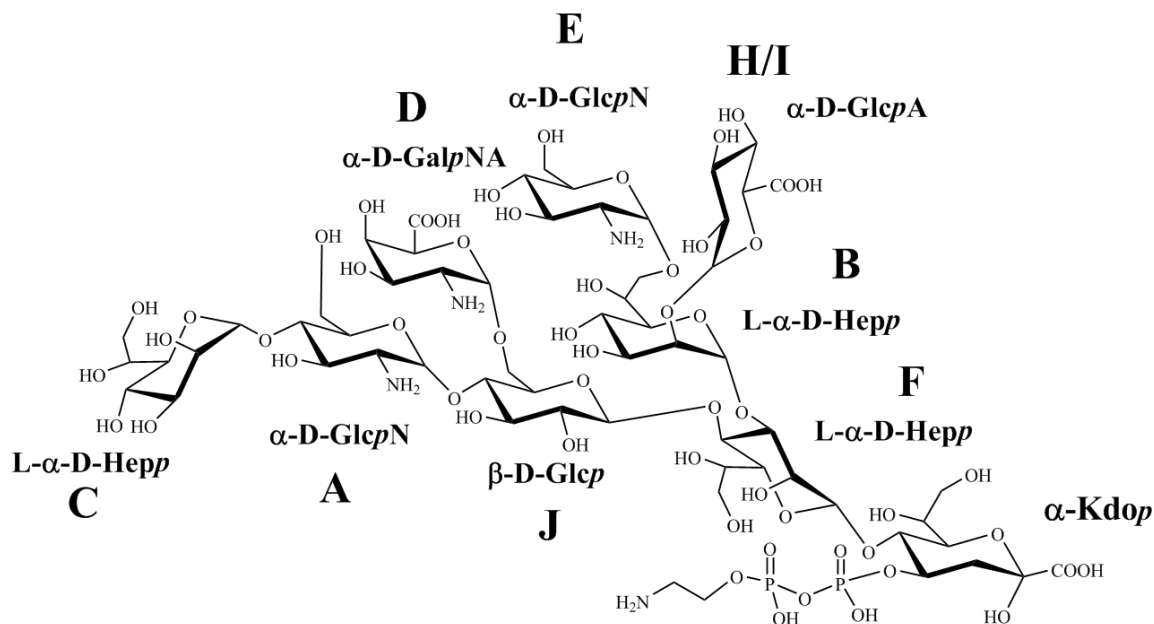
widmie $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT (Ryc. 34) pojawiają się sygnały pochodzące od etanolaminy, ale nieobserwowane są sygnały pochodzące od dystalnego trójczukru oraz sygnały od fosforanów na widmie fosforowym 1D ^{31}P . Na podstawie podobieństwa przesunięć chemicznych poszczególnych reszt cukrowch do przesunięć chemicznych przedstawionych w Tabeli 9 ustalono, że OS *B. holmesii* ATCC 51541 jest nonasacharydem.



Ryc. 34. Fragment widma $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT frakcji VIII po rozdziale hydrolyzatu heteropolisacharydu *B. holmesii* ATCC 51541

Po przeanalizowaniu zaprezentowanych danych (Tabela 9 i Tabela S 1) ustalono, że wyizolowany OS rdzenia *B. holmesii* ATCC 51541 w głównej frakcji VIII jest

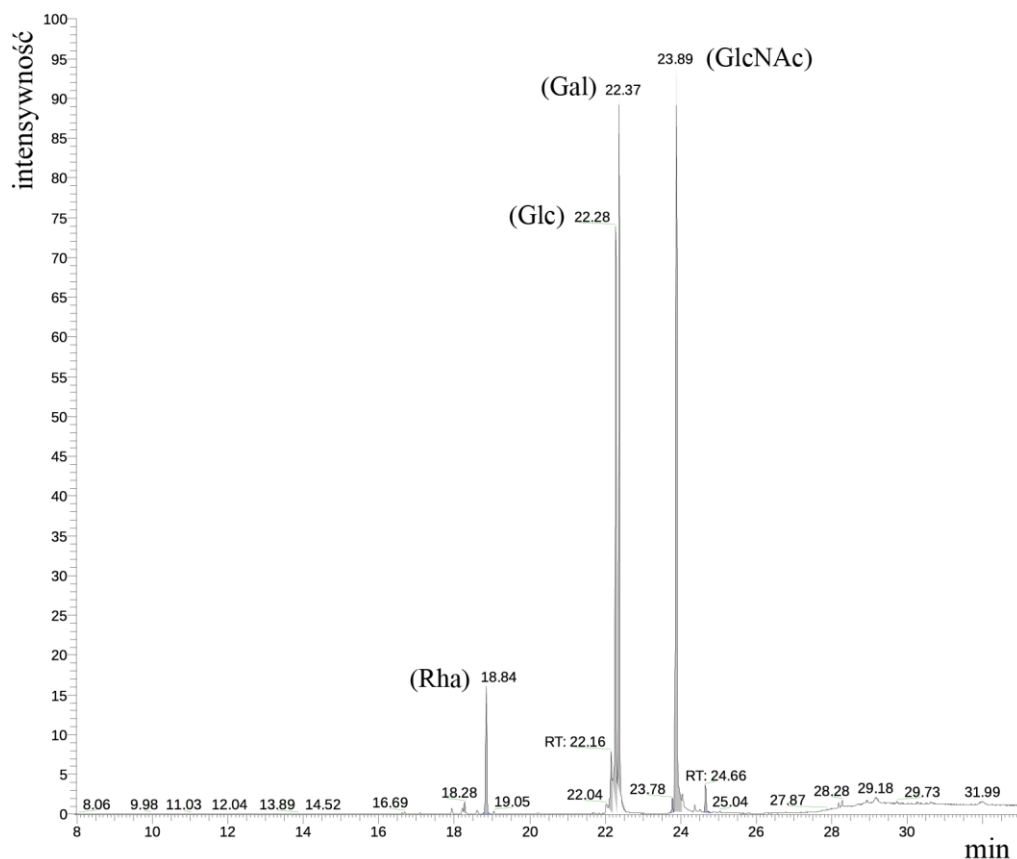
identyczny jak OS *B. pertussis* 606. Strukturę tego oligosacharydu rdzenia zaprezentowano na Ryc. 35.



Ryc. 35. Struktura OS rdzenia *B. holmesii* ATCC 51541

Kolejnym dotąd niepoznanym segmentem heteropolisacharydów z LPS *B. holmesii* ATCC 51541 jest antygen O. Frakcję I z rozdziału hydrolizatu PS *B. holmesii* zawierającą długołańcuchowe polisacharydy poddano dalszym analizom pozwalającym ustalić strukturę łańcucha O – swoistego. Skład cukrowy polisacharydu *B. holmesii* określono na podstawie analizy cukrowej przeprowadzonej z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej (GC-MS). Czasy retencji otrzymanych lotnych pochodnych składników cukrowych - octanów alditoli - porównano ze standardami dla Glc, Gal, GlcN, GalN, GlcNAc, GalNAc, Fuc oraz Rha. Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano w próbce obecność Rha (t_R 18,84 min) Glc (t_R 22,28 min), Gal (t_R 22,37 min), oraz GlcNAc (t_R 23,89 min).

WYNIKI



Ryc. 36. Chromatogram lotnych pochodnych składników cukrowych otrzymanych w wyniku analizy cukrowej PS *B. holmesii* ATCC 51541

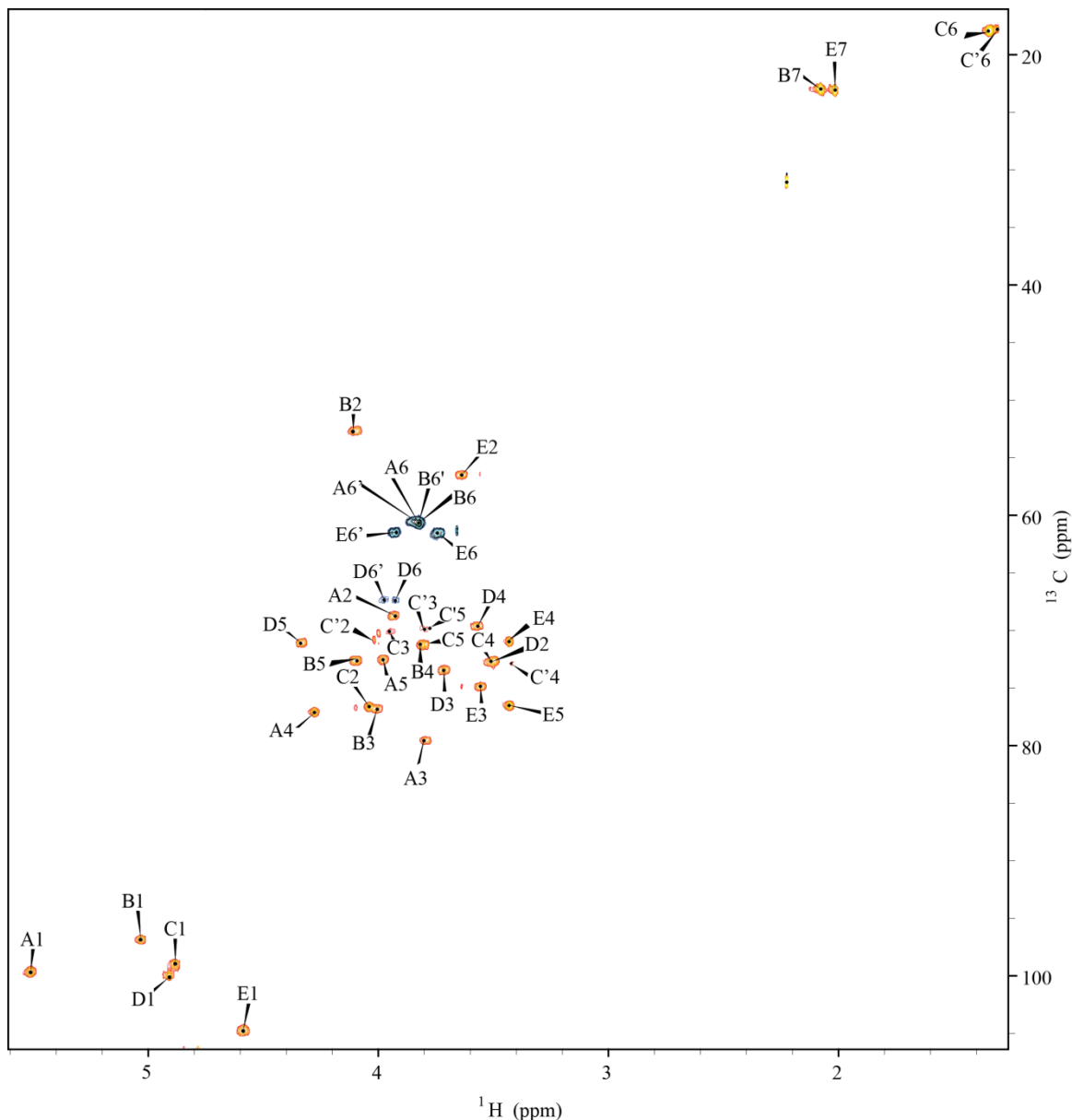
Dla frakcji I PS *B. holmesii* wykonano pomiary jednowymiarowych widm ^1H NMR oraz serię eksperymentów dwuwymiarowych: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY oraz $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY. W analizowanej frakcji, na podstawie liczby sygnałów protonów anomerycznych, zidentyfikowano pięć reszt cukrowych. Wartości przesunięć chemicznych skalibrowanych do sygnału acetonu (δ_{C} 31,05 ppm/ δ_{H} 2,225 ppm) dla zidentyfikowanych atomów węgla oraz protonów (z pominięciem protonów grup hydroksylowych oraz amidowych) w badanej cząsteczce zestawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Przesunięcia chemiczne O - PS *Bordetella holmesii* ATCC 51541

Reszta		C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6,H6'	N-Ac
A	→3,4)-α-D-Galp-(1→	99,7	68,7	79,6	77,1	72,5	60,7	-
		5,51	3,93	3,80	4,28	3,98	3,82	
B	→3)-α-D-GlcpNAc-(1→	96,8	52,7	76,8	71,2	72,6	60,7	175,1
		5,03	4,11	4,01	3,82	4,09	3,78	23,0
							3,78	2,08

WYNIKI

C	$\rightarrow 2$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow)	99,0 4,89	76,3 4,04	70,1 3,95	72,7 3,51	71,2 3,79	17,9 1,34	-
C'	α -L-Rhap-(1 \rightarrow)	-	70,8 4,02	69,8 3,81	73,0 3,44	69,8 3,78	17,8 1,31	-
D	$\rightarrow 6$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow)	100,0 4,917	72,7 3,51	73,5 3,72	69,7 3,57	71,1 4,34	67,4 3,93 3,97	-
E	β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow)	104,8 4,59	56,5 3,64	74,9 3,56	71,0 3,43	76,5 3,43	61,5 3,74 3,82	175,4 23,1 2,01



Ryc. 37. Fragment widma ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT O-polisacharydu (frakcji I) po rozdziale hydrolizatu PS *B. holmesii* ATCC 51541

Resztę A zidentyfikowano jako 3,4-podstawioną α -D-Galp [$\rightarrow 3,4$]- α -D-Galp-(1 \rightarrow) na podstawie wysokich wartości stałych sprzężeń protonów wicynalnych H1, H2 i H3

oraz niskich wartości stałych sprzężeń protonów H3, H4 i H5, stałej sprzężeń $J_{C1,H1} \sim 179$ Hz, a także stosunkowo wysokiej wartości przesunięć chemicznych sygnałów węgla C3 (δ_C 79,6 ppm) oraz C4 (δ_C 77,1 ppm).

Resztę **B** zidentyfikowano jako 3-podstawioną α -D-GlcpNAc [\rightarrow 3)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow)] na podstawie dużych stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym, stałej sprzężenia $J_{C1,H1} \sim 172$ Hz, a także wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C3 (δ_C 76,8 ppm). Podstawienie grupą aminową określono na podstawie charakterystycznego dla atomu węgla związanego z atomem azotu przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 52,7 ppm).

Reszta **C** scharakteryzowana została jako 2-podstawiona α -L-Rhap [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] na podstawie niskich wartości stałych sprzężeń protonów wicynalnych H1, H2 i H3 oraz wysokich wartości stałych sprzężeń protonów H3, H4 i H5, niskiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C6 (δ_C 17,9 ppm), wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 76,3 ppm) i stałej sprzężeń $J_{C1,H1} \sim 172$ Hz.

Reszta **D** scharakteryzowana została jako 6-podstawiona α -D-Glcp [\rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)] na podstawie dużych stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym, stałej sprzężenia $J_{C1,H1} \sim 162$ Hz, a także wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C6 (δ_C 67,4 ppm).

Resztę **E** zidentyfikowano jako terminalną β -D-GlcpNAc [β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow)] na podstawie dużych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym i stałej sprzężenia $J_{C1,H1} \sim 164$ Hz. Podstawienie grupą aminową określono na podstawie niskiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 56,5 ppm).

Podstawienia grupą N-acetylową zidentyfikowano w eksperymentach $^1H,^{13}C$ HMBC na podstawie korelacji węgla karbonylowego grupy acetylowej (δ_C 175,1 ppm i δ_C 175,4 ppm) do protonów H2 reszt B (δ_H 4,11 ppm) oraz E (δ_H 3,64 ppm).

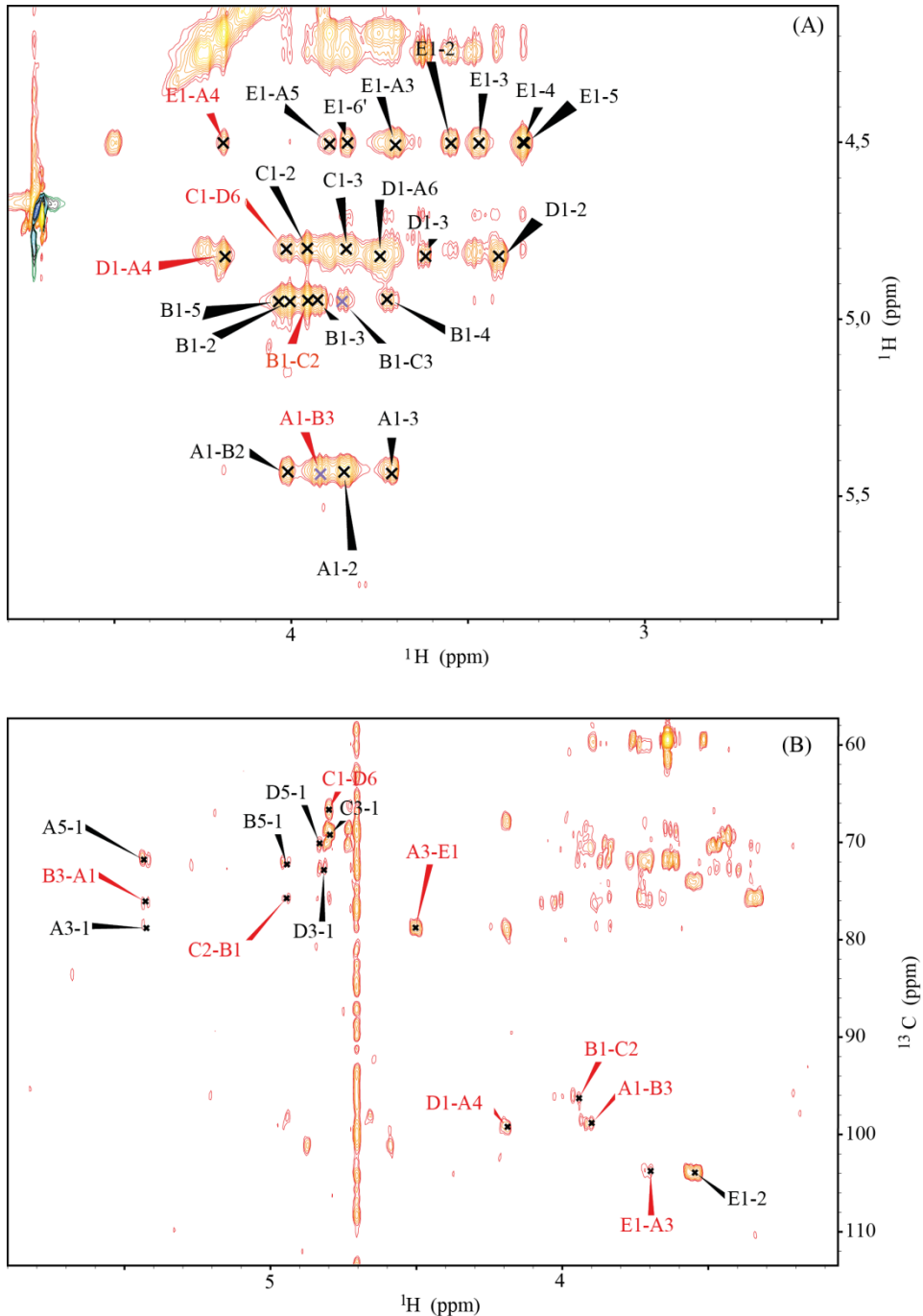
Na korelacyjnych widmach $^1H,^{13}C$ HMBC; $^1H,^1H$ NOESY (Ryc. 38) kolorem czerwonym zaznaczono połączenia pomiędzy resztami cukrowymi, a ich przesunięcia opisano w Tabeli 12. Na ich podstawie ustalono sekwencję reszt cukrowych w łańcuchu.

Tabela 12. Połączenia między resztami cukrowymi obserwowane w eksperymentach $^1H,^1H$ NOESY i $^1H,^{13}C$ HMBC dla PS *B. holmesii* ATCC 51541

Reszta	Atom C1/ H1	Korelacja z sygnałem δ_C/ δ_H	Połączenie
A	99,7/ 5,51	76,8/ 4,11	C3, H3 reszty B
B	96,8/ 5,03	76,6/ 4,04	C2, H2 reszty C

WYNIKI

C	99,0/ 4,89	67,4/ 3,93; 3,97	C6, H6;H6' reszty D
D	100,0/ 4,91	77,1/ 4,28	C4, H4 reszty A
E	104,8/ 4,59	79,6/ 3,80	C3, H3 reszty A

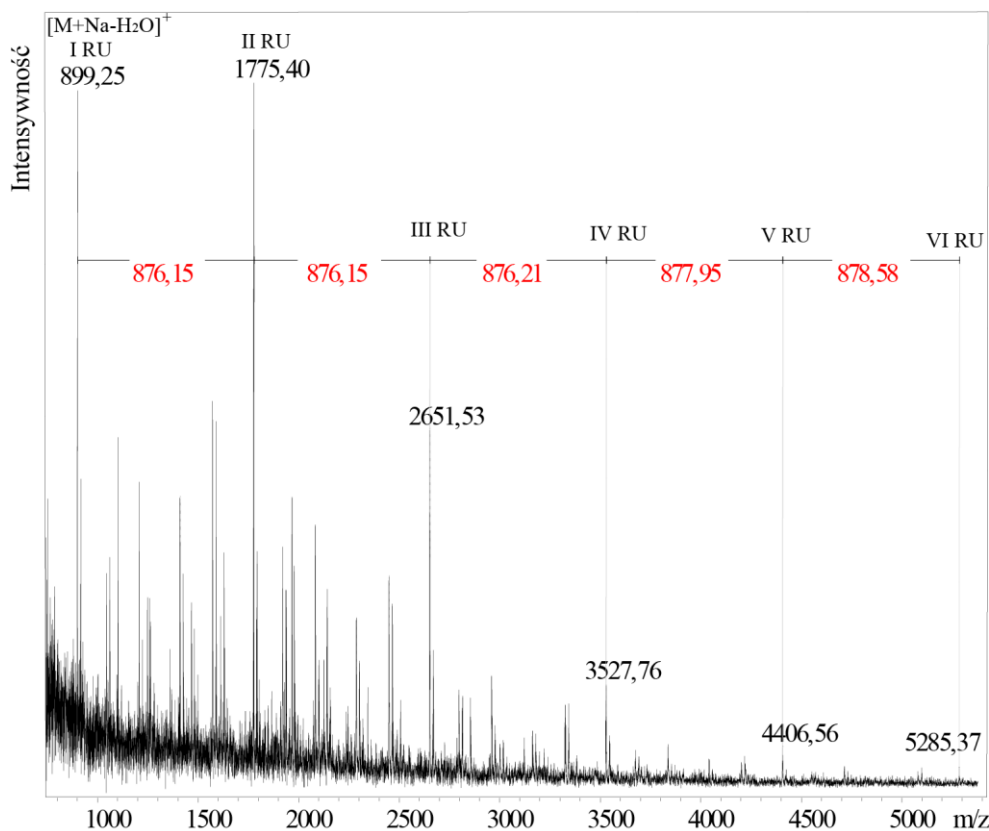


Ryc. 38. Widma NMR O - PS *B. holmesii* ATCC 51541 ^1H , ^1H NOESY (A) i ^1H , ^{13}C HMBC (B). Kolorem czerwonym zaznaczono połączenia pomiędzy monosacharydowymi składnikami podjednostki

Dla O-PS (fr. I) nie można było bezpośrednio przeprowadzić analiz technikami spektrometrii MALDI-TOF MS, ponieważ długie łańcuchy polisacharydowe trudno jonizują i z takich preparatów nie można uzyskać dobrych widm masowych.

WYNIKI

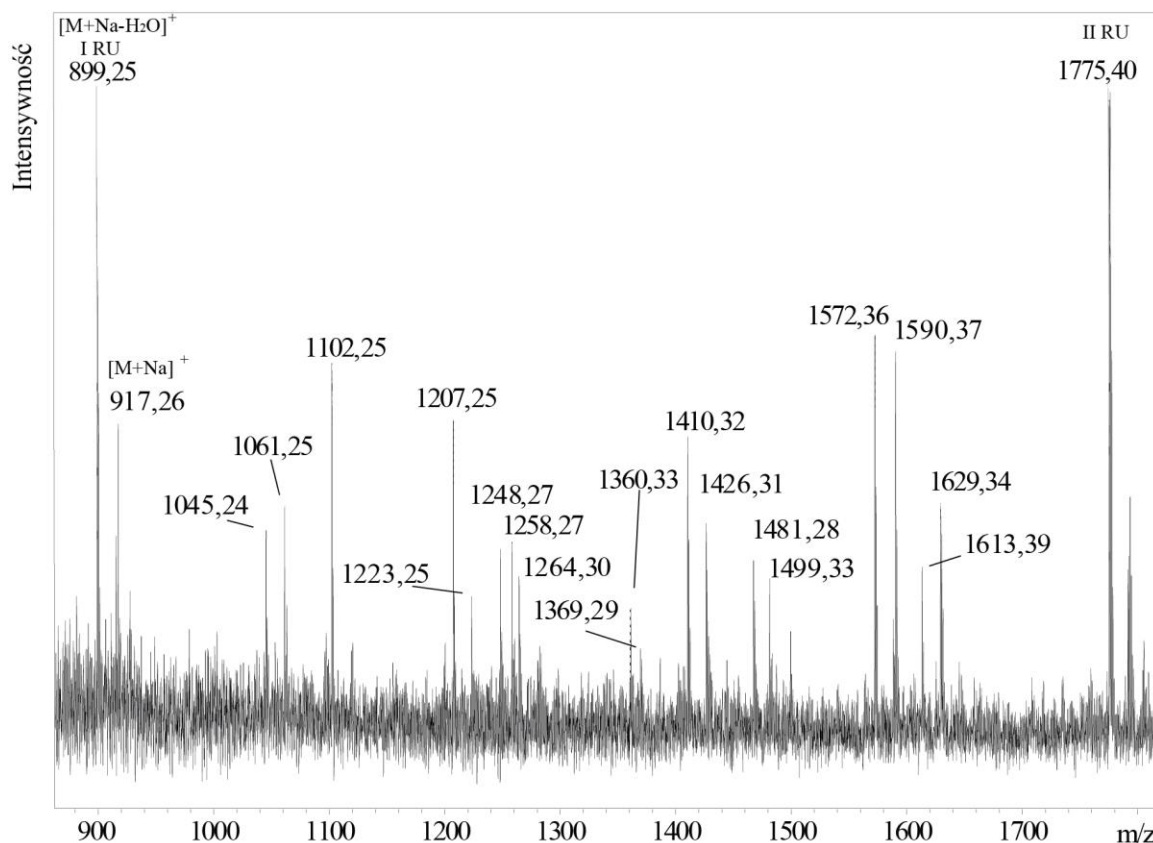
Przeprowadzono kontrolowaną hydrolizę w 48% kwasie fluorowodorowym w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 33 dni. Przygotowano 20 próbek i każdego dnia analizowano preparaty w MALDI-TOF MS. Pierwsze efekty rozpadu polisacharydu na podjednostki zaobserwowano po 12-14 dniach, a najlepsze widma, w których zaobserwowano również rozpad podjednostki polisacharydu na mniejsze fragmenty zarejestrowano w 26 dniu eksperymentu. Widmo masowe (Ryc. 39), otrzymane w trybie reflektromu polaryzacji dodatniej, po częściowej hydrolizie PS *B. holmesii*, zawierało główne jony o m/z 899,25, m/z 1775,40, m/z 2651,53, m/z 3527,63, m/z 4406,56 i m/z 5285,37 między którymi wyznaczono różnice mas 876 Da. Wartość ta odpowiada teoretycznej masie podjednostki pozbawionej cząsteczki wody. Dominujący jon o m/z 899,25, zinterpretowano jako addukt sodowy podjednostki polisacharydu pozbawiony cząsteczki wody $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$. Na powiększonym fragmencie widma MALDI-TOF MS (Ryc. 40) zaobserwowano sygnał o m/z 917,26 odpowiadający $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ale jego intensywność jest znacznie mniejsza. Otrzymane wyniki technikami spektrometrii mas, potwierdzają teoretyczną masę jednej podjednostki PS *B. holmesii* w łańcuchu 876,32 Da.



Ryc. 39. Widmo MALDI TOF MS w trybie reflektromu polaryzacji dodatniej z wykorzystaniem matrycy DHB, wykonane w 26 dniu eksperymentu, w którym O - PS *B. holmesii* ATCC 51541 poddano hydrolizie 48% HF, w temp. -20°C

WYNIKI

Na widmach masowych zaobserwowano również rozpad powtarzającej się polisacharydowej podjednostki (RU) na mniejsze fragmenty w wyniku przeprowadzonej hydrolizy HF. Szczegółowa analiza widma hydrolizatu PS *B. holmesii* w zakresie mas m/z 899-1776 wskazywała na obecność w preparacie deoksyHex, dwóch Hex oraz dwóch HexNAc budujących podjednostkę. Możliwe interpretacje głównych jonów obserwowanych na Ryc. 40, przedstawiono w Tabeli 13.



Ryc. 40. Powiększony fragment widma MALDI TOF MS w trybie reflektoru polaryzacji dodatniej z wykorzystaniem matrycy DHB, wykonanego w 26 dniu eksperymentu, w którym O - PS *B. holmesii* ATCC 51541 poddano hydrolizie 48% HF, w temp. -20°C , w zakresie m/z 899-1776, interpretacja jonów w Tabeli 13

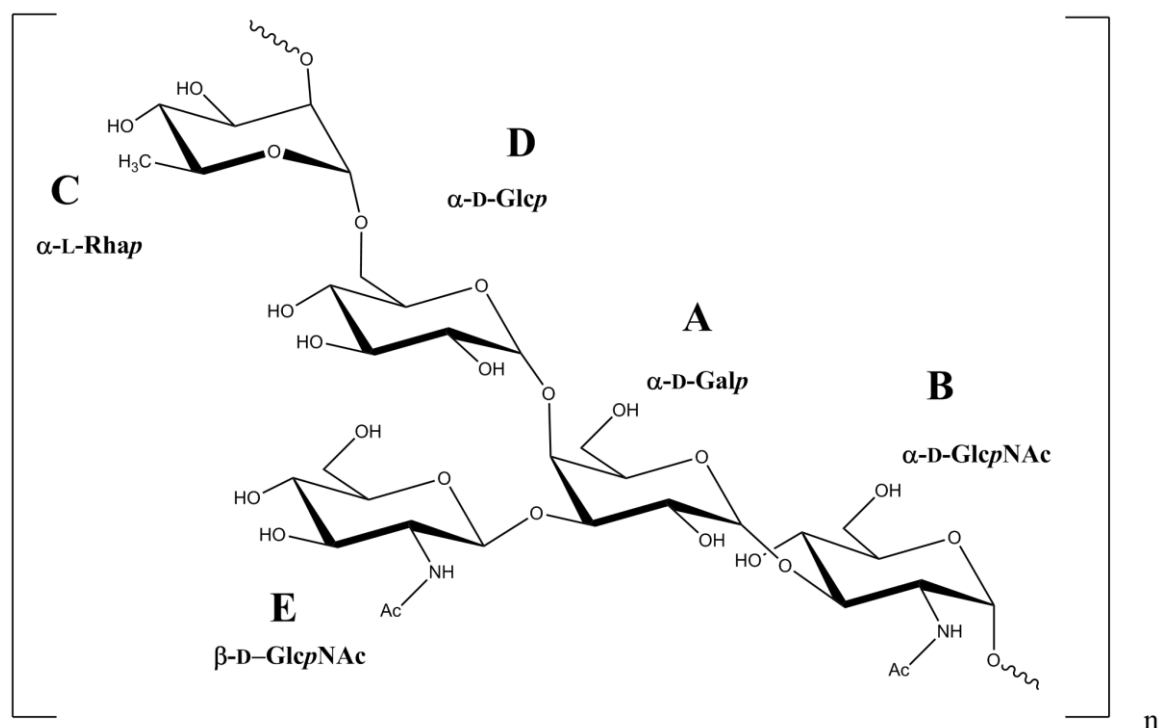
Tabela 13. Interpretacja zidentyfikowanych jonów obserwowanych w widmie masowym MALDI TOF MS wybranej podjednostki PS *B. holmesii* ATCC 51541 w zakresie m/z 899-1776

Jon (m/z)	Interpretacja
899,25	$[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}] \Rightarrow \text{RU}$
917,26	$\text{RU}+\text{H}_2\text{O}$
1045,24	$\text{RU}+\text{dHex}$
1061,25	$\text{RU}+\text{Hex}$
1102,25	$\text{RU}+\text{HexNAc}$
1207,25	$\text{RU}+\text{dHex}+\text{Hex}$
1223,25	$\text{RU}+2\text{Hex}$
1248,30	$\text{RU}+\text{HexNAc}+\text{dHex}$

WYNIKI

1264,30	RU+HexNAc+Hex
1369,29	2RU-HexNAc
1410,32	RU+dHex+Hex+HexNAc
1426,31	RU+HexN+Hex; 2R-(HexNAc+dHex)
1467,37	RU-dHex-Hex
1572,37	RU+dHex+2Hex+HexNAc 2RU-HexNAc
1590,37	RU+dHex+2Hex+NAcHex+H ₂ O
1613,39	2RU-Hex; RU+Na+dHex+Hex+HexNAc+H
1629,34	2RU-dHex
1775,40	2RU+Na

Przeprowadzone analizy metodami spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas pozwoliły określić budowę antygeny O *B. holmesii* ATCC 51541, którego podjednostka zbudowana jest z $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow]$. Absolutną konfigurację składników cukrowych ustalono techniką spektroskopii NMR, metodą opisaną przez Yorka i wsp. przedstawioną w rozdziale 7.6. Zaproponowaną strukturę podjednostki polisacharydu przedstawiono na Ryc. 41.



Ryc. 41. Struktura powtarzającej się podjednostki antygeny O *B. holmesii* ATCC 51541

7.3. Analiza egzopolisacharydów bakterii z klastra *B. bronchiseptica*

W literaturze dla niektórych *Bordetellae* opisano dwa rodzaje glikanów. Głównym egzopolisacharydem bakteryjnym produkowanym przez kilka gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella* tj. *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* jest nie do końca scharakteryzowany Bps zbudowany, wg danych literaturowych, z poli- β -1,6-N-acetyloglukozaminy. Metoda izolacji Bps jest dosyć wyczerpująca i polega na zawieszeniu bakterii w 0,5M EDTA i inkubacji w temp. 100 °C, przez 5 min, poddaniu superanatanu enzymatycznej trzygodzinnej degradacji w 37 °C i następnie inaktywacji enzymu przez 15 min w 85 °C (Conover i in., 2010, 2012). Również struktura opisywanego polisacharydu mikrokapsularnego produkowanego przez *B. pertussis* nie została jeszcze określona. Znane doniesienia literaturowe sygnalizują, że zbudowany jest z N-acetylowanego kwasu galaktozoaminouronowego, ale oprócz homologii pewnych rodzajów genów, nie ma na to bezpośredniego potwierdzenia (Hoo i in., 2014; Neo i in., 2010). W trakcie poszukiwań uniwersalnych antygenów cukrowych postanowiono sprawdzić, jaki typ EPS jest produkowany przez wybrane bakterie z rodzaju *Bordetella* i czy istnieją wspólne egzopolisacharydy, które mogą być w prosty sposób izolowane z medium pohodowlanego bez stosowania procedury, która mogłaby wpływać na strukturę natywnych EPS.

7.3.1. Izolacja egzopolisacharydów

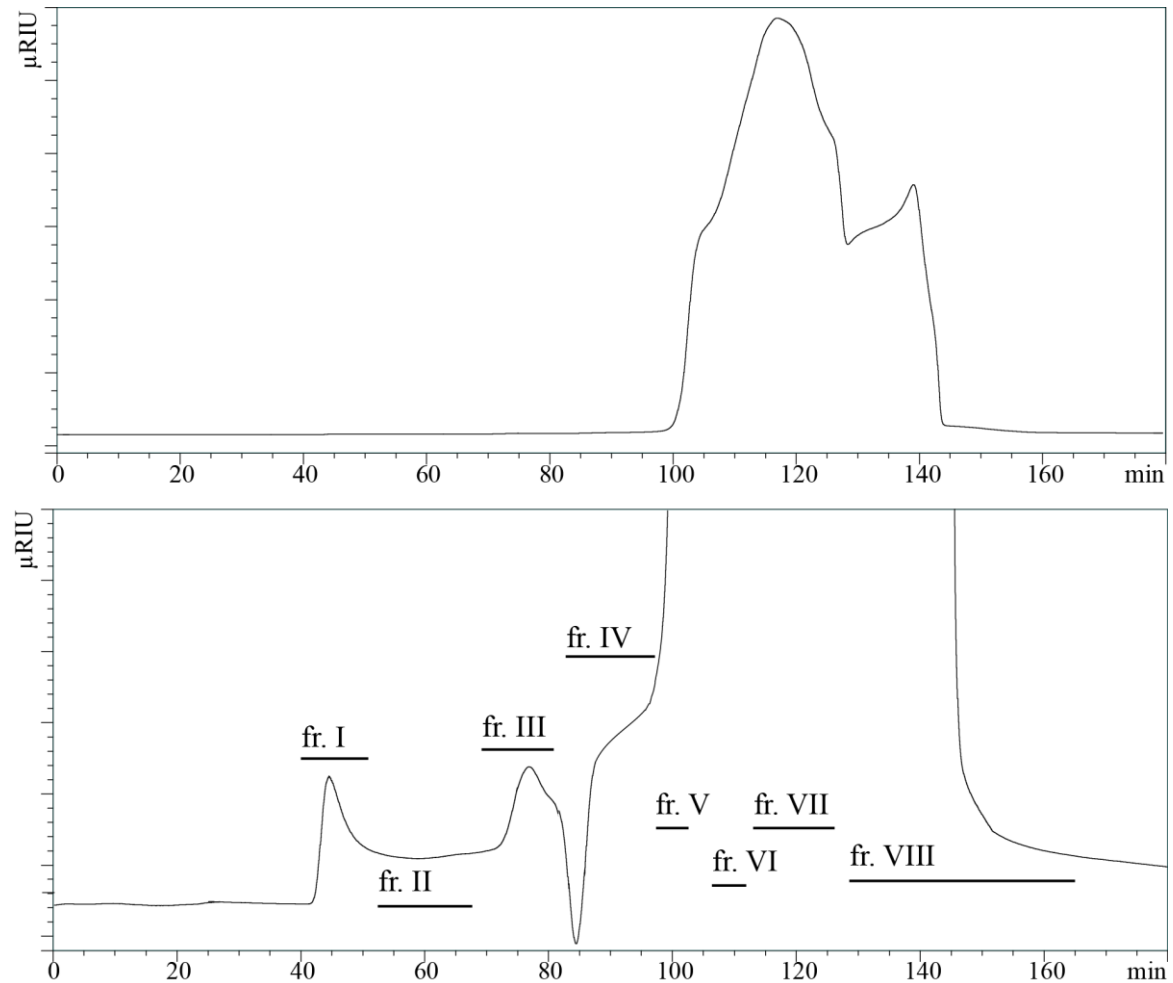
Początkowo izolacja oraz pełne analizy metodami spektroskopii NMR i spektrometrii MALDI-TOF MS egzopolisacharydów przeprowadzone zostały dla *B. holmesii* - najslabiej i najwolniej rosnącej bakterii w kolekcji. W trakcie gromadzenia masy bakteryjnej, potrzebnej do analiz LPS, zachowywano pewne ilości medium pohodowlanego, które przechowywano jako liofilizat z zamiarem późniejszego wykorzystania. W trakcie hodowli *B. holmesii* wydziela do pożywki brązowy barwnik, więc przechowywane medium miało intensywny ciemny kolor.

Około 250 ml medium Stainer–Scholte z dodatkiem ryboflawiny oraz czynnikami wzrostu zaszczerpiono *B. holmesii*. Po 72 godz. hodowli bakterie odwirowano, a supernatanty pohodowlane liofilizowano. Średnio z jednej hodowli uzyskiwano ok 3,3 g zliofilizowanego medium. Po rozpuszczeniu w 0,05 M kwasie octowym nastrzykiwano na kolumnę HiLoad 16/600 Superdex 30 pg w ilości 0,5-1 g. W celu wykluczenia możliwości zanieczyszczeń pochodzących od podłoża stałego z agarem węglowym lub od

WYNIKI

medium płynnego przeprowadzono rozdział zliofilizowanej pożywki oraz, tak jak przy pasażu z medium stałego do płynnego, ok. 15 ml pożywki Stainer–Scholte z dodatkiem witaminy B₂ po zmyciu z płytki węglowej. Szczyty pochodzące od drobnocząsteczkowych składników medium (witaminy, aminokwasy, sole) pojawiały się w okolicy 100 minuty (chromatogramy niezamieszczane).

Pierwszy rozdział chromatograficzny przeprowadzono dla medium pochodzącego *B. holmesii* (Ryc. 42).



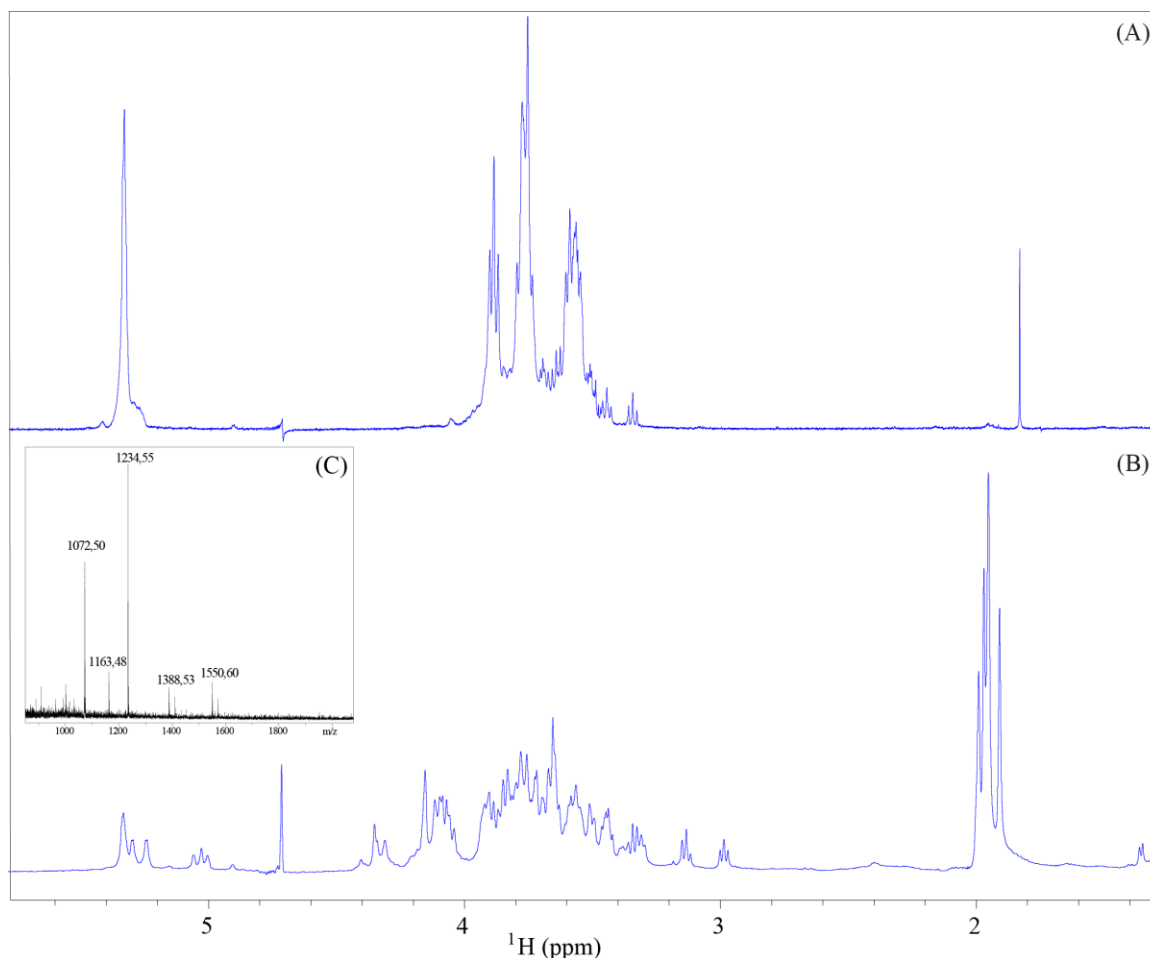
Ryc. 42. Rozdział chromatograficzny medium pochodzącego *B. holmesii* na kolumnie filtracji żelowej. Rozdział monitorowano refraktometrycznie, na dolnym panelu przedstawiono rozdział w zmniejszonej skali

Na podstawie wcześniejszych analiz lipopolisacharydów spodziewano się zaobserwować szczyty, pochodzące od długołańcuchowych polisacharydów, w regionie o czasie retencji (t_R) ok. 40 min. Średniej długości łańcuchy polisacharydów oraz oligosacharydy będą miały większy t_R . Ze względu na przeładowanie kolumny naniesionym materiałem, w zakresie związków drobnocząsteczkowych (ok. 1 g) chromatogram należało powiększyć, aby zobaczyć mniejsze szczyty chromatograficzne

długołańcuchowych polisacharydów. Dla rozdzału chromatograficznego medium pohodowlanego *B. holmesii* zebrano frakcje na podstawie szczytów zarejestrowanych przez refraktometr, przy zmniejszonej skali. Wyjątkiem jest barwnikowa frakcja V, którą zebrano na podstawie największej intensywności koloru, gdyż czas retencji barwnika pokrywał się z czasami retencji drobnocząsteczkowych składników pożywek. Dla rozdzału (Ryc. 42) zebrano frakcje o następujących czasach retencji: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-80 min), frakcja IV (t_R 81-97 min), frakcja V (t_R 98-105 min), frakcja VI (t_R 106-112 min), frakcja VII (t_R 113-124 min) oraz frakcja VIII (t_R 125-167 min).

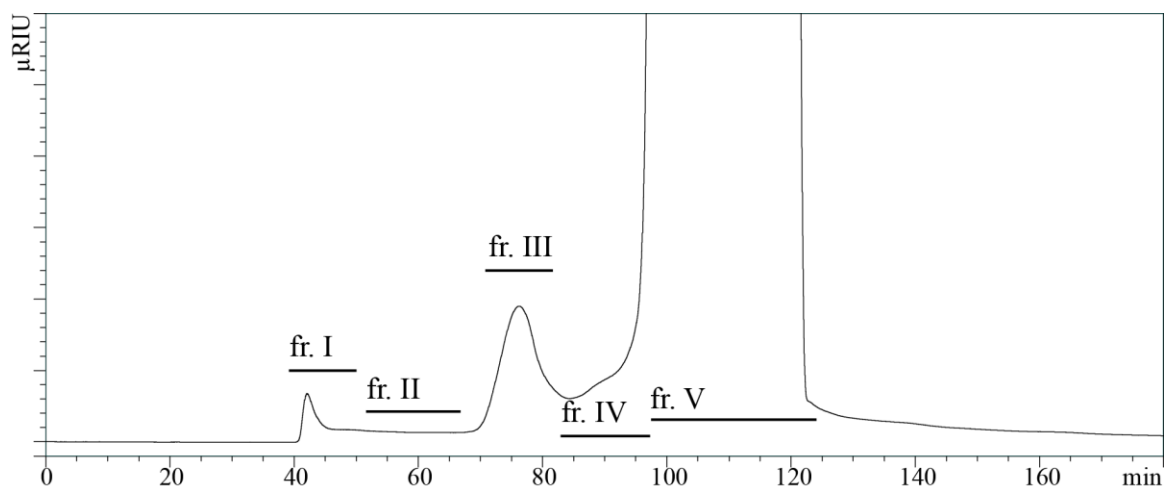
Zebrane frakcje poddano analizom strukturalnym metodami spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas, co opisano dokładnie w kolejnych rozdziałach. Dla frakcji I i III, uzyskano wstępne widma ^1H NMR typowe dla bakteryjnych glikanów, w których zaobserwowano silne sygnały charakterystyczne dla struktur cukrowych. Widma przedstawiono na Ryc. 43 (A i B). Analizowana frakcja I zawiera długołańcuchowe polisacharydy o prostej strukturze. Jednowymiarowe widmo protonowe ^1H NMR frakcji I charakteryzuje się obecnością dwóch sygnałów w regionie protonu anomerycznego (δ_H 4,5-5,5). Profil jednowymiarowego widma NMR frakcji III okazał się bardziej zróżnicowany i na podstawie prawie dwukrotnie dłuższego czasu retencji egzopolisacharyd identyfikowany jest jako krótszy egzooligosacharyd. Obserwację potwierdza widmo MALDI-TOF MS frakcji III (Ryc. 43, C), na którym zaobserwowano główne sygnały jonów w regionie 1000-1600 Da. Ciekawa okazała się również barwnikowa frakcja V, ponieważ barwnik produkowany przez *B. holmesii* nie został jeszcze opisany w literaturze. Jednak pod względem strukturalnym nie jest on elementem cukrowym, a przez to nie jest związany z tematem tej pracy i nie będzie omawiany.

Jak już wspomiano *B. holmesii* nie jest jeszcze w pełni scharakteryzowaną bakterią. Niewiele wiadomo o jej strukturach cukrowych. Po uzyskaniu tak interesujących wyników o nowych produkowanych rodzajach glikanów, postanowiono sprawdzić czy wytwarzane długołańcuchowe polisacharydy i oligosacharydy są unikatowe dla *B. holmesii*, czy też może są bardziej uniwersalne i produkowane przez inne bakterie z rodzaju *Bordetella*. W kolejnym etapie przeprowadzono izolacje i analizy dla *B. pertussis*, która przypuszczalnie według danych literaturowych wytwarza, co najmniej dwa glikany tj. Bps i mikrokapsułę.



Ryc. 43. Profile jednowymiarowych widm NMR analizowanych egzopolisacharydowych frakcji I (A) oraz frakcji III (B) wyizolowanych z medium pochodlanego *B. holmesii* ATCC 51541, z dodatkowym widmem MALDI-TOF MS dla frakcji III (C) wykonanym w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą

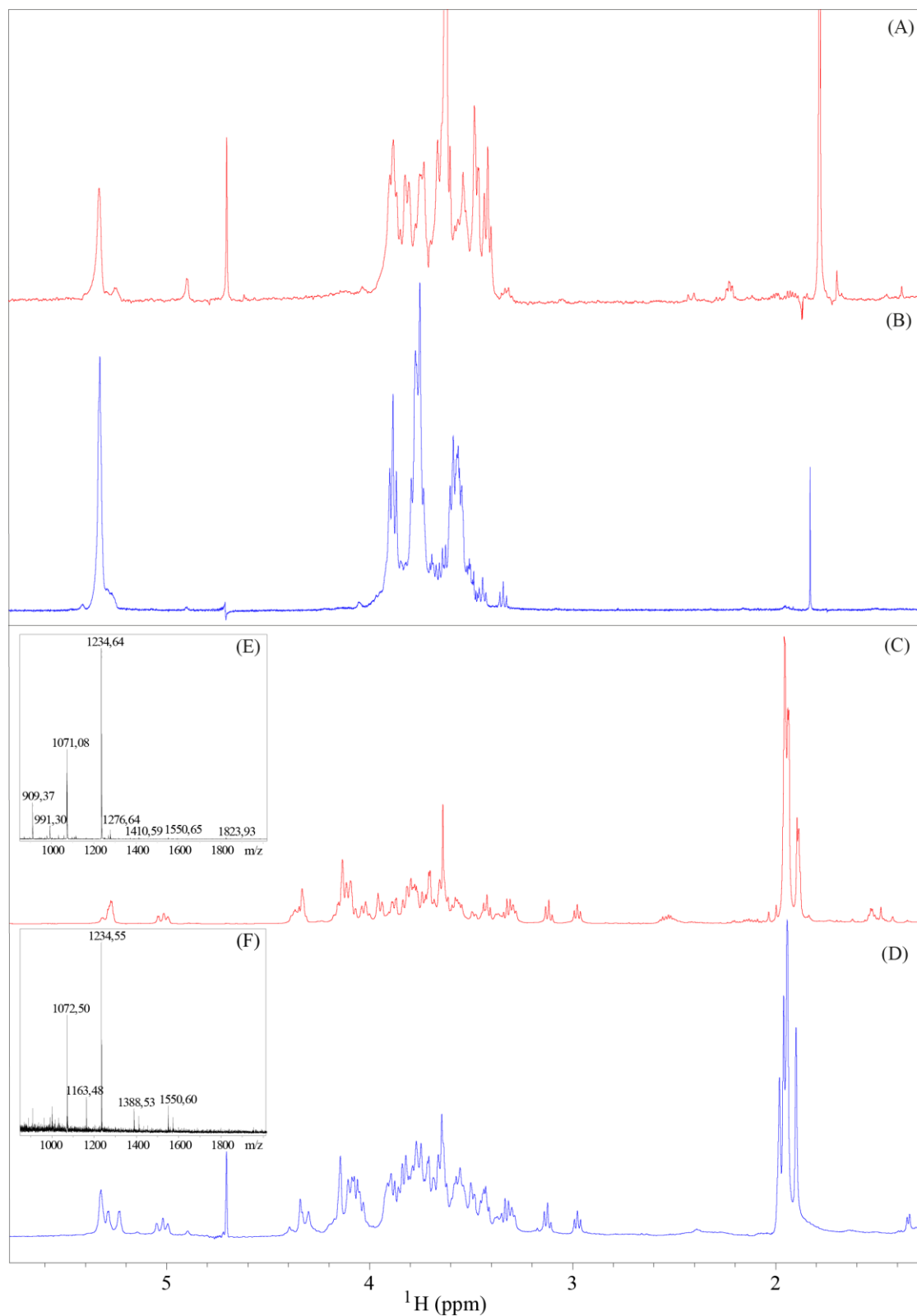
Przeprowadzono hodowlę bakterii *B. pertussis* 186 w objętości 250 ml medium Stainer–Scholte z dodatkiem ryboflawiny oraz czynnikami wzrostu. Po odwirowaniu bakterii pożywkę zliofilizowano i po rozpuszczeniu w 0,05 M kwasie octowym przeprowadzono rozdział chromatograficzny medium pochodlanego *B. pertussis* 186 (Ryc. 44). Pomimo niewielkich przesunięć, czasy retencji głównych egzopolisacharydowych frakcji I i III odpowiadały czasom retencji dla rozdziału chromatograficznego medium *B. holmesii*: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-80 min), frakcja IV (t_R 81-97 min) i zebrana jako całość frakcja V (t_R 98-130 min). Kolejne rozdziały chromatograficzne przeprowadzone dla pozostałych bakterii z rodzaju *Bordetella* przedstawiono już tylko w wersji powiększonej.



Ryc. 44. Rozdział chromatograficzny medium pochodzącego *B. pertussis* 186 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę

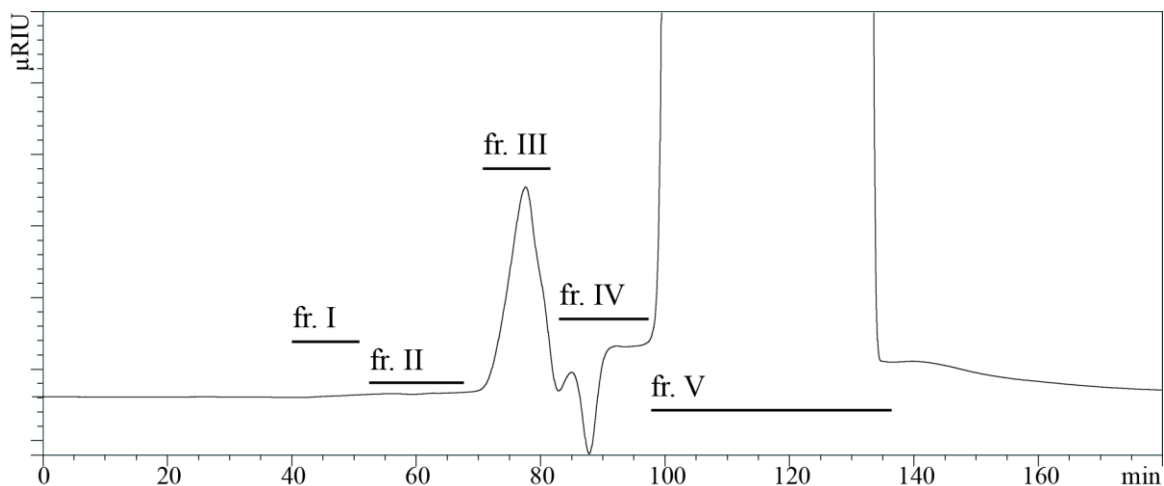
Analiza porównawcza jednowymiarowych widm ^1H NMR frakcji I i III wykazała, zaskakujące podobieństwo w profilach polisacharydowych pomiędzy tymi gatunkami (Ryc. 45). Również widma MALDI-TOF MS fr. III *B. pertussis* 186 (Ryc. 45, E) i *B. holmesii* (Ryc. 45, F) okazały się nadzwyczaj podobne. Na przedstawionych widmach masowych zaobserwowano powtarzające się główne intensywne sygnały jonów o m/z 1234,64 oraz 1071,08. Dla frakcji I nie udało się zarejestrować widm MALDI-TOF MS, ze względu na słabą jonizację długołańcuchowych polisacharydów.

Po uzyskaniu pierwszych wyników, świadczących o tym, że wyizolowane egzopolisacharydy mogą być uniwersalne dla bakterii z rodzaju *Bordetella* przeprowadzono hodowle dla pozostałych posiadanych gatunków i szczepów klasycznych *Bordetellae* na tej samej syntetycznej pożywce Stainer-Scholte z dodatkiem ryboflawiny i w identycznych warunkach wzrostu, aby nie wprowadzać dodatkowych zmiennych.



Ryc. 45. Porównanie profili ^1H NMR analizowanych egzopolisacharydowych frakcji I *B. pertussis* 186 (A) i *B. holmesii* (B) oraz frakcji III *B. pertussis* 186 (C) i *B. holmesii* (D), z dodatkowymi widmami MALDI-TOF MS dla frakcji III *B. pertussis* 186 (E) i *B. holmesii* (F) wykonanymi w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej

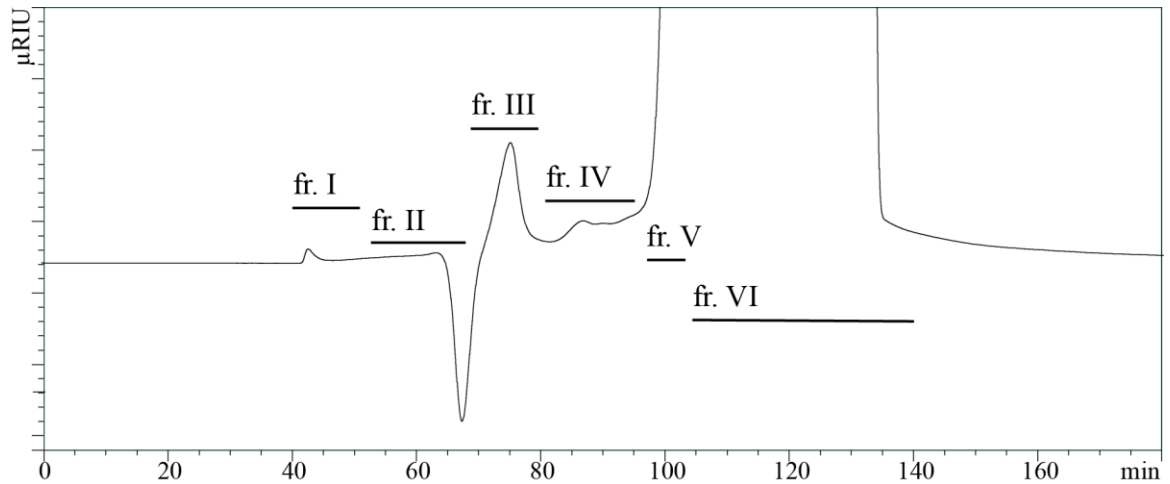
Dla rozdziału chromatograficznego *B. pertussis* 606 (Ryc. 46) również zebrano frakcje o prawie identycznych czasach retencji: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-80 min), frakcja IV (t_R 81-97 min), oraz frakcja V (t_R 98-140 min).



Ryc. 46. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego *B. pertussis* 606 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę

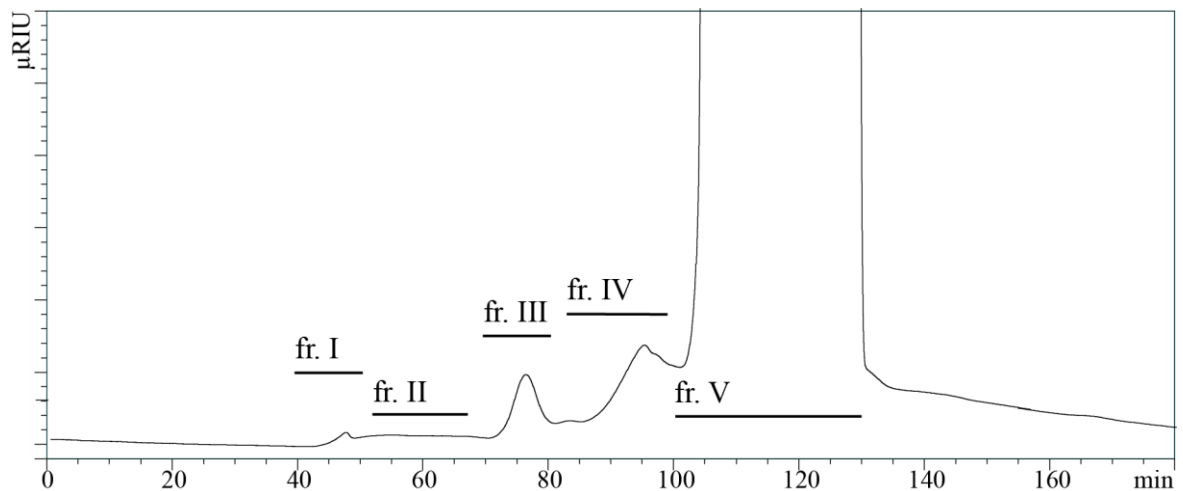
Na chromatogramie medium pochodowlanego *B. pertussis* 606 szczyt frakcji I jest praktycznie niewidoczny, a materiał uzyskano w ilości śladowej. Pierwszą wyizolowaną frakcją z tego rozdziału powinna być fr. III, ale aby ułatwić późniejsze porównywania frakcji pomiędzy gatunkami i szczepami, ujednolicono ich opis oraz przypisane do nich czasy retencji. Dlatego frakcja o t_R 40-50 min opisywana będzie jako egzopolisacharydowa fr. I, a frakcja o t_R 70-80 min jako egzopolisacharydowa fr. III.

Dla rozdziału chromatograficznego *B. parapertussis* 529 (Ryc. 47) czasy retencji poszczególnych frakcji również się powtarzają: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-80 min), frakcja IV (t_R 81-97 min), frakcja V (t_R 98-103 min) oraz frakcja VI (t_R 104-140 min). Podobnie jak dla *B. holmesii* frakcja V to frakcja barwnikowa, zebrana na podstawie intensywności koloru.



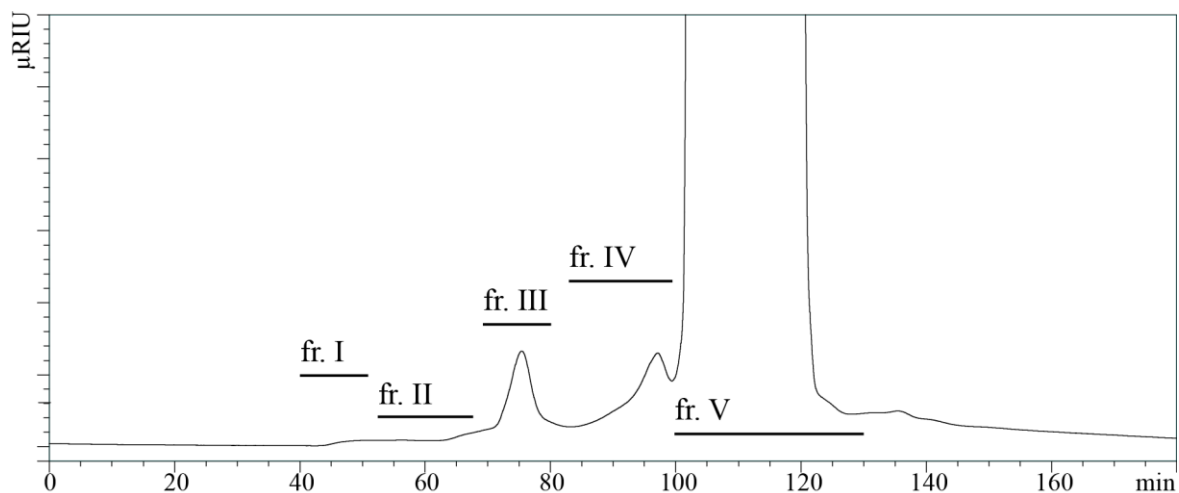
Ryc. 47. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego *B. paraptussis* 529 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę

Chromatogramy dla obu posiadanych szczepów *B. bronchiseptica*, które różnią się od poprzednich gatunków tym, że mają większy zakres gospodarzy, również są podobne. Dla rozdziału chromatograficznego *B. bronchiseptica* 530 (Ryc. 48) zebrano następujące frakcje: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-80 min), frakcja IV (t_R 81-98 min) oraz frakcja V (t_R 99-130 min).



Ryc. 48. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego *B. bronchiseptica* 530 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę

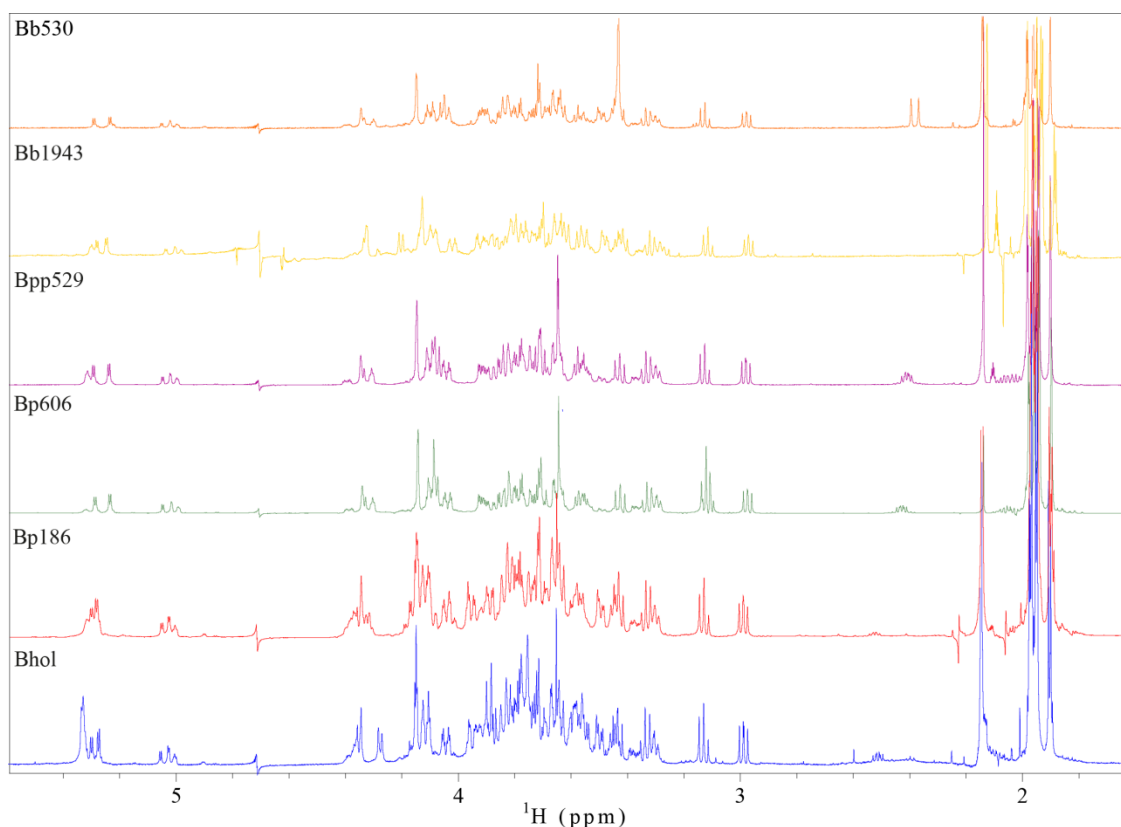
Dla rozdziału chromatograficznego *B. bronchiseptica* 1943 (Ryc. 49) zebrano następujące frakcje: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-81 min), frakcja IV (t_R 82-99 min) oraz frakcja V (t_R 100-130 min).



Ryc. 49. Rozdział chromatograficzny medium pochodzącego *B. bronchiseptica* 1943 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę

Szczyt fr. I jest prawie niewidoczny, a po liofilizacji ilości tej frakcji są śladowe, natomiast szczyt fr. III zdecydowanie się wyróżnia i jest obecny na wszystkich chromatogramach.

Wstępne analizy profili jednowymiarowych widm NMR dla egzopolisacharydowych frakcji III różnych gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella* (Ryc. 50) wykazały ich uderzające podobieństwo.



Ryc. 50. Porównanie profili jednowymiarowych widm ^1H NMR dla frakcji III ze wszystkich rozdziałów medium pochodzących bakterii z rodzaju *Bordetella*

WYNIKI

Dla klasycznych *Bordetellae* wystarczającą ilość materiału do przeprowadzenia analiz zebrano z pojedynczych hodowli przeprowadzonych w objętości 250 ml. Medium pohodowlane *B. holmesii* zachowywano z różnych etapów gromadzenia masy bakteryjnej i zaobserwowano, że największe ilości zebranych frakcji pochodziły z bezpośredniego posiewu bakterii z płytki do kolby. Masa poszczególnych wyizolowanych frakcji dla *B. holmesii* różniła się w zależności od tego czy rozdzielane medium pochodziło od bakterii posianych bezpośrednio z płytki do kolby czy był to pasaż z medium płynnego. Zaobserwowano spadek ilości wydzielanego barwnika oraz po dalszych analizach ilości poszczególnych frakcji. Większe wydajności izolowanych frakcji obserwowano przy posiewie bezpośrednio z płytki (frakcja III 1,8 mg), niż przy pasażu z hodowli płynnej (frakcja III 0,4 mg). Podsumowanie ilości zebranych materiałów ze wszystkich rozdziałów chromatograficznych przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Masowe ilości zebranych frakcji w poszczególnych rozdziałach chromatograficznych zebranych z hodowli ok 250 ml

Szczep bakteryjny	Ilość [mg]					Nałożone na kolumnę [g]
	Frakcja I	Frakcja II	Frakcja III	Frakcja IV	Frakcja V	
Bp186	0,79	-	3,63	~0,2	bd*	1
Bp606	~0,1	~0,1	3,4	0,38	bd	1
Bpp529	~0,1	~0,1	1,6	bd	53,8	0,5
Bhol	1,6	1,17	1,8	4,8	52	1
Bb530	~0,1	~0,1	0,3	~0,1	bd	0,5
Bb1943	~0,1	0,3	1,5	0,6	bd	0,5

* bd- brak danych, materiału nie dało się zważyć

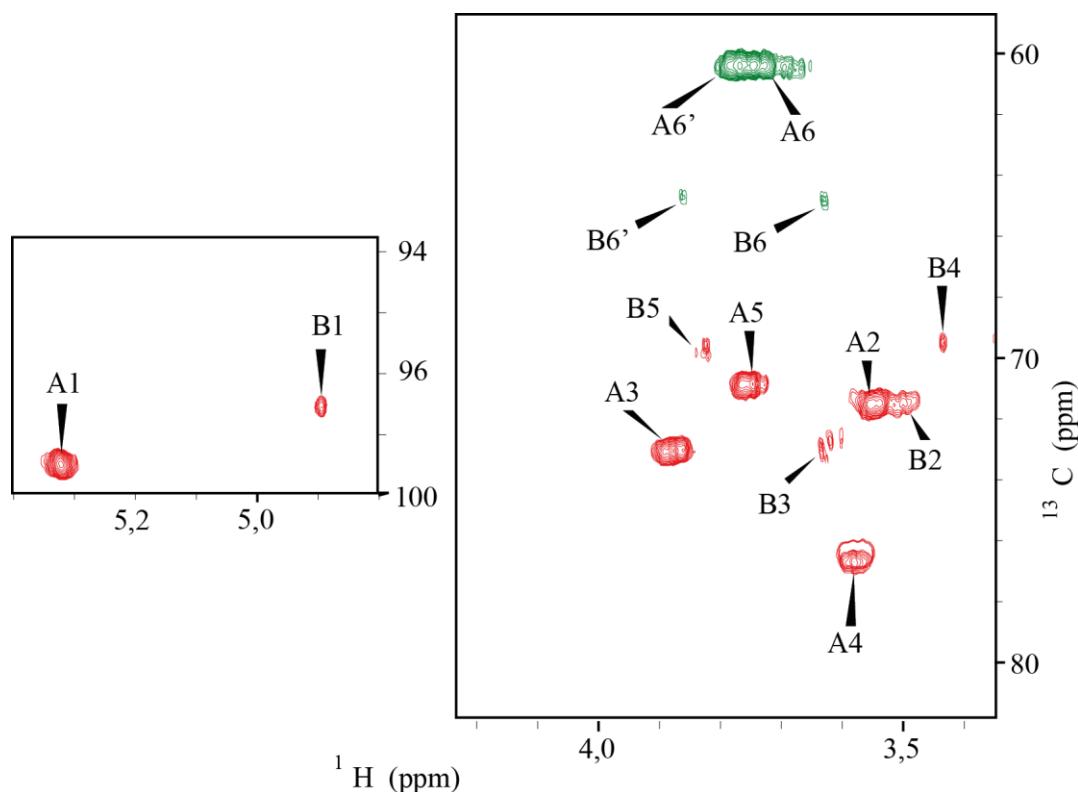
7.3.2. Analiza Egzopolisacharydów

Frakcje I, II, III, IV, V sprawdzano przy użyciu spektroskopii NMR. Pomiary wykonano z użyciem spektroskopu AVANCE III 600 MHz. Wykonano pomiary jednowymiarowych widm protonowych ^1H NMR. Protonowe widma jednowymiarowe egzopolisacharydowych frakcji I oraz III wskazywały na obecność sygnałów w zakresie δ_{H} 4,3-5,5 ppm pochodzących od protonów przy anomerycznych atomach węgla poszczególnych reszt cukrowych. Obecne były również intensywne sygnały protonów grup $-\text{CH}_3$ wchodzących w skład grup N-acetamidowych (NHCOCH_3) reszt cukrowych o wartościach przesunięć chemicznych około δ_{H} 2 ppm. Na widmach obserwowane są również dodatkowe sygnały pochodzące od grup $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, które mogą pochodzić od struktur, pełniących funkcję kotwicy dla analizowanych egzopolisacharydów. W toku analiz nie udało się wyizolować jednak frakcji, w której możliwe byłoby zidentyfikowanie przyłączonej kotwicy do łańcucha cukrowego.

W dalszej kolejności analizie poddano korelacyjne widma $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY oraz $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY. Widma korelacyjne umożliwiły rozróżnienie sygnałów protonów pierścienia, które nakładały się na widmie jednowymiarowym i widmach $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY oraz $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY oraz identyfikację bezpośrednio związanych par $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ w obrębie każdej reszty cukrowej. W oparciu o widma $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC rejestrowane bez rozprężania ustalono wartości stałych sprzężeń $J_{\text{C1,H1}}$ wskazujących na anomerię reszt cukrowych.

7.3.2.1. Analiza strukturalna egzopolisacharydowej frakcji I

Jednowymiarowe widma ^1H NMR egzopolisacharydowej frakcji I charakteryzowały się obecnością dwóch sygnałów w regionie protonów anomerycznych (δ_{H} 4,5-5,5). Zarejestrowano komplet widm dwuwymiarowych: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY oraz $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY. Na Ryc. 51 przedstawiono fragmenty widma dwuwymiarowego $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT z opisanymi sygnałami, a wartości przesunięć chemicznych poszczególnych sygnałów zestawiono w Tabeli 15.



Ryc. 51. Fragmenty widma $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT frakcji I z rozdziału medium pochodowlanego *B. holmesii*

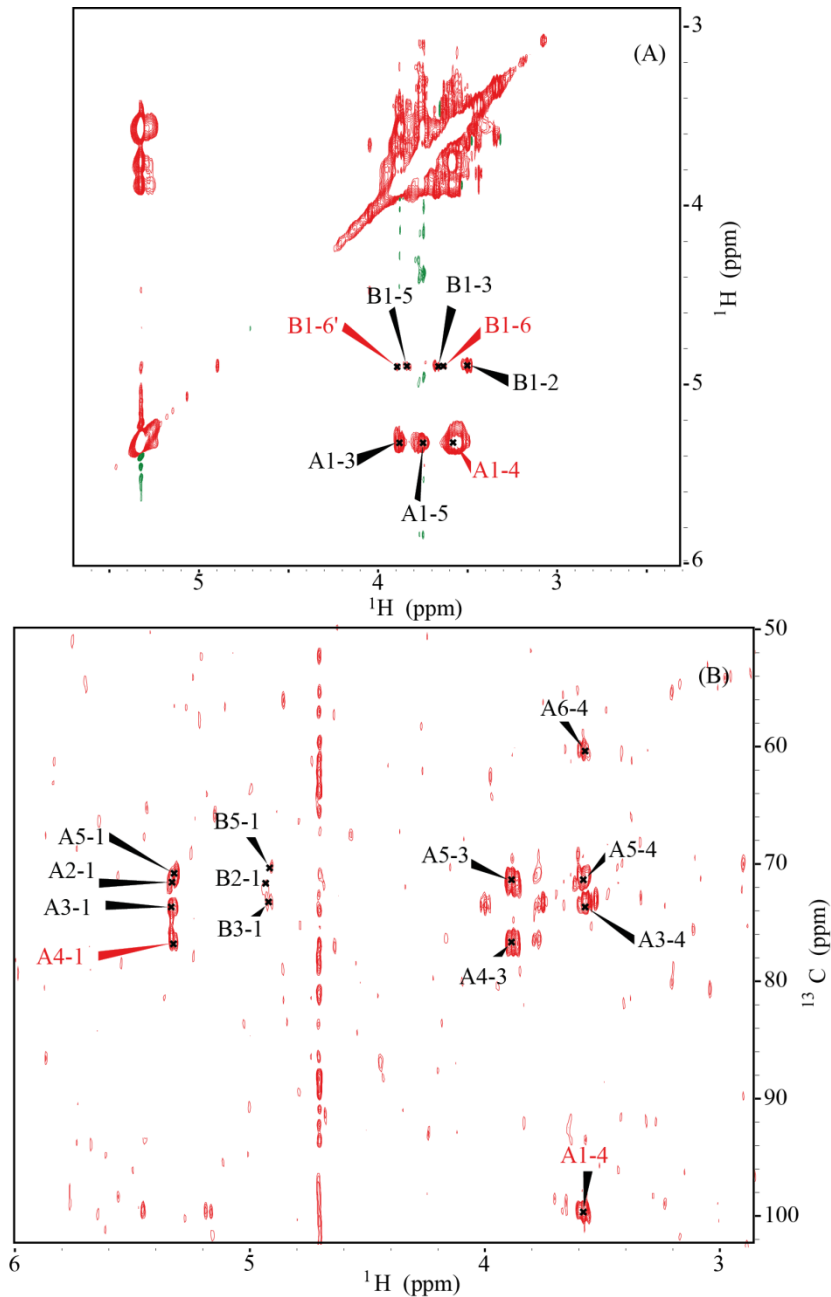
Tabela 15. Przesunięcia chemiczne dla egzopolisacharydowej frakcji I *B. holmesii*

Reszta		C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6, H6'
A	→4)-α-D-	99,6	71,5	73,3	76,7	71,1	60,4
	Glc p -(1→	5,32	3,55	3,88	3,58	3,75	3,66 3,73
B	→6)-α-D-	97,7	71,5	73,3	69,5	70,1	65,5
	Glc p -(1→	4,90	3,50	3,63	3,44	3,83	3,67 3,90

Dla reszt A i B zidentyfikowano dwa odrębne systemy spinowe. Resztę **A** zidentyfikowano jako 4-podstawioną α-D-Glc p [→4)-α-D-Glc p -(1→] na podstawie dużych wartości stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym, oraz wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C4 (δ_C 76,7). Resztę **B** scharakteryzowano jako 6-podstawioną α-D-Glc p [→6)-α-D-Glc p -(1→], na podstawie dużych wartości stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym oraz wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C6 (δ_C 65,5). Miejsca podstawienie określono na podstawie widm ^1H , ^{13}C HMBC oraz ^1H , ^1H NOESY (Ryc. 52). Dla reszty A proton przy węglu anomerycznym wskazuje na korelację do sygnału o przesunięciach chemicznych δ_C 76,7 ppm/ δ_H 3,58 ppm (C4, H4 reszty A), a dla reszty B do sygnału o przesunięciach chemicznych δ_C 65,5 ppm/ δ_H 3,67/ 3,90 ppm (C6, H6/H6' reszty B). Na podstawie widma ^1H , ^{13}C HMBC zarejestrowanego bez rozprzęgania, określono również stałe sprzężeń dla tych reszt $J_{\text{C1,H1}} \sim 176$ Hz, co wskazuje na ich α-piranozową konfigurację.

Sygnały od homopolimerów reszty A i B (glukanów) o niższym stopniu polimeryzacji, obserwowane były na widmach NMR również w dalszych frakcjach II-IV. W zależności od frakcji, ale również od gatunku i hodowli intensywność sygnałów jest zmienna, co sugeruje zmienną zawartość glukanów w analizowanych preparatach egzopolisacharydowych.

WYNIKI

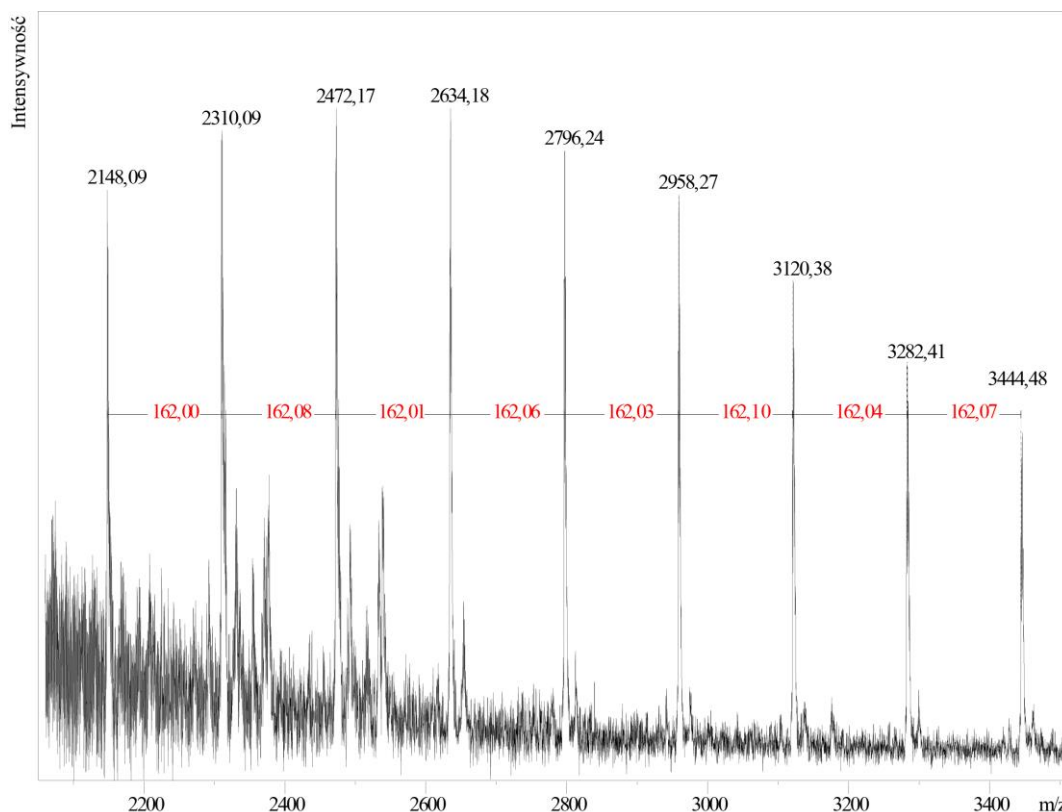


Ryc. 52. Widma NMR egzopolisacharydowej fr. I *B. holmesii* ^1H , ^1H NOESY (A) i ^1H , ^{13}C HMBP (B) bez rozprężania. Kolorem czerwonym zaznaczono połączenia pomiędzy resztami

Dla egzopolisacharydowej frakcji I nie można było bezpośrednio przeprowadzić analiz technikami spektrometrii MALDI-TOF MS, ponieważ długie łańcuchy polisacharydowe słabo jonizują i nie można zarejestrować dobrych widm masowych. Sygnały charakterystyczne dla powtarzających się reszt glukozy zidentyfikowano w trakcie analiz masowych frakcji III. Na Ryc. 53 przedstawiono fragment widma w trybie reflektromu polaryzacji dodatniej, z charakterystyczną, dla powtarzającej się reszty Glc, różnicą mas 162 Da. Kolumna HiLoad 16/600 Superdex 30 pg rozdziela

WYNIKI

cząsteczki pod względem ich masy, dlatego krótsze polisacharydy o masie podobnej do masy oligosacharydów są izolowane wspólnie.



Ryc. 53. Fragment widma MALDI-TOF MS frakcji III po rozdziale chromatograficznym medium pochodowlanego *B. pertussis* 186 w trybie reflektrom polaryzacji dodatniej

Obecność glukanów na widmach ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT obserwowano także we frakcjach pochodzących z pozostałych rozdzielów mediów pochodowlanych *Bordetellae*. Dla *B. holmesii*, *B. parapertussis* 529 i *B. bronchiseptica* 1943 sygnały pochodzące od obu reszt miały podobną intensywność. Dla *B. pertussis* 186 i 606 intensywność sygnałów pochodzących od reszty A była słabsza niż reszty B, natomiast u *B. bronchiseptica* 530 sygnały pochodzące od reszty A nie zostały zidentyfikowane.

7.3.2.2. Analiza strukturalna egzopolisacharydowej frakcji III

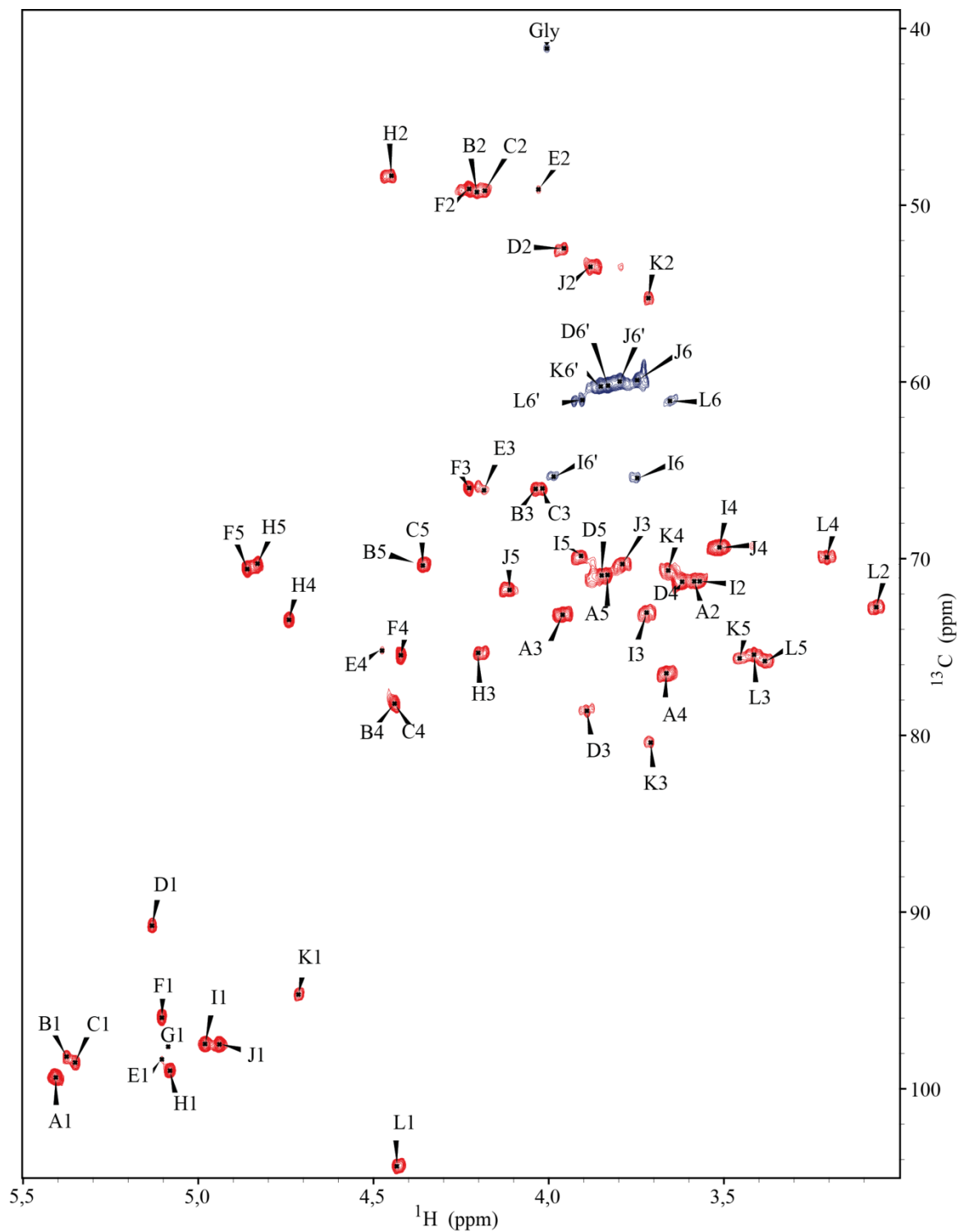
Na widmach NMR frakcji III wyizolowanej z medium pochodowlanego *B. holmesii* zidentyfikowano, siedem reszt cukrowych, tworzących oligosacharyd. Reszty te opisano symbolami literowymi B/C, D, E/F, G/H, J, K, L. Dodatkowo na podstawie podobieństwa przesunięć chemicznych poszczególnych sygnałów, reszty A oraz I zidentyfikowano jako glukany o niższym stopniu spolimeryzowania opisane w poprzednim rozdziale jako reszty A i B.

Na Ryc. 54 oraz Ryc. 55 przedstawiono fragmenty widm ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT frakcji III po rozdzieleniu medium pochodowlanego *B. holmesii* oraz *B. pertussis* 186. Widma są niemalże identyczne. Podobnie prezentowały się widma NMR frakcji III u wszystkich pozostałych analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Zebrane frakcje stanowiły materiał wyjściowy do badań strukturalnych.

Dane literaturowe nie wspominają o tego typu oligosacharydzie wytwarzanym przez bakterie z rodzaju *Bordetella*. Używanie zwrotu „egzooligosacharyd obecny we frakcji III wyizolowanej z medium pochodowlanego” jest nieco kłopotliwe. Wyniki badań zaprezentowanych w pracy sugerują, że jest to nietypowy egzooligosacharyd. Dlatego na podstawie przeprowadzonych analiz, w wyniku których ustalono strukturę nieopisanego wcześniej egzooligosacharydu, wprowadzono jego nowe określenie. Ze względu na jego oligosacharydową strukturę oraz fakt, że jest obecny w każdym medium pochodowlanym z analizowanych *Bordetellae*, zaproponowano nazwę „*Bordetella oligosaccharide*” – BOS. Zastosowany skrót BOS pozostaje w konwencji nazewnictwa egzopolisacharydów *Bordetellae* podobnie jak *Bordetella polysaccharide* (Bps).

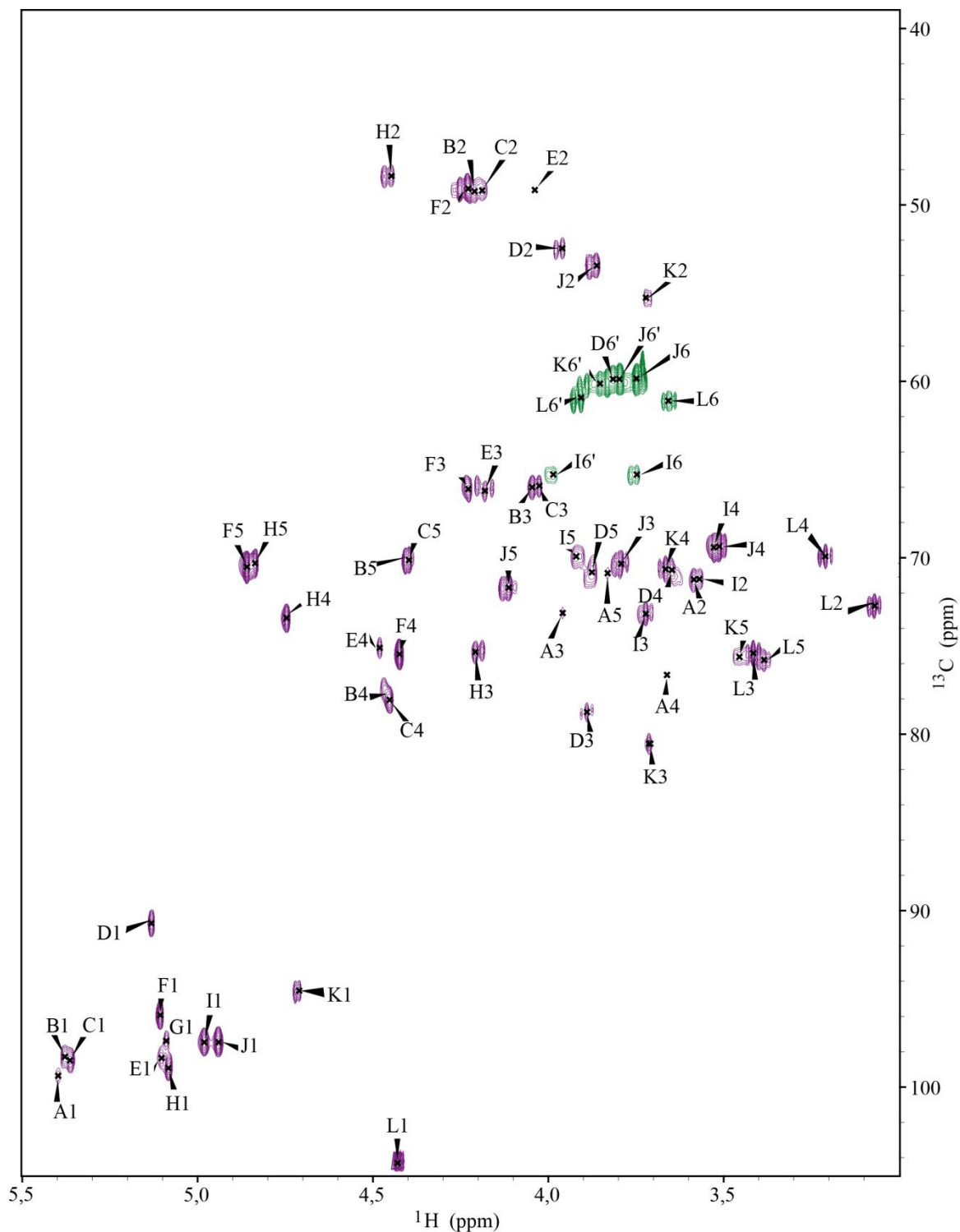
Wartości przesunięć chemicznych oraz obserwowanych stałych sprzężeń dla wszystkich zidentyfikowanych atomów węgla oraz protonów (z pominięciem protonów grup hydroksylowych oraz amidowych) w badanej cząsteczce zestawiono w Tabeli 16. Reszty A oraz I (opisane w poprzednim rozdziale) nie są składnikami BOS, dlatego w tabeli pominięto opis wartości przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od reszty A oraz I.

WYNIKI



Ryc. 54. Widmo ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT dla egzopolisacharydowej frakcji III *B. holmesii* ATCC 51541

WYNIKI



Ryc. 55. Widmo ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT egzopolisacharydowej frakcji III *B. pertussis* 186

Tabela 16. ^1H , ^{13}C przesunięcia chemiczne BOS *Bordetellae*. Widma zarejestrowano w D_2O w temp. 298 K i skalibrowano na sygnał acetonu δ_{C} 31,05 ppm/ δ_{H} 2,225 ppm. Mniejszą czcionką podano odchylenia standardowe sygnałów pomiędzy widmami zarejestrowanymi dla różnych gatunków.

Reszta	C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6,H6'	C7 H7 (Ac) CO(2)
--------	----------	----------	----------	----------	----------	--------------	---------------------------

WYNIKI

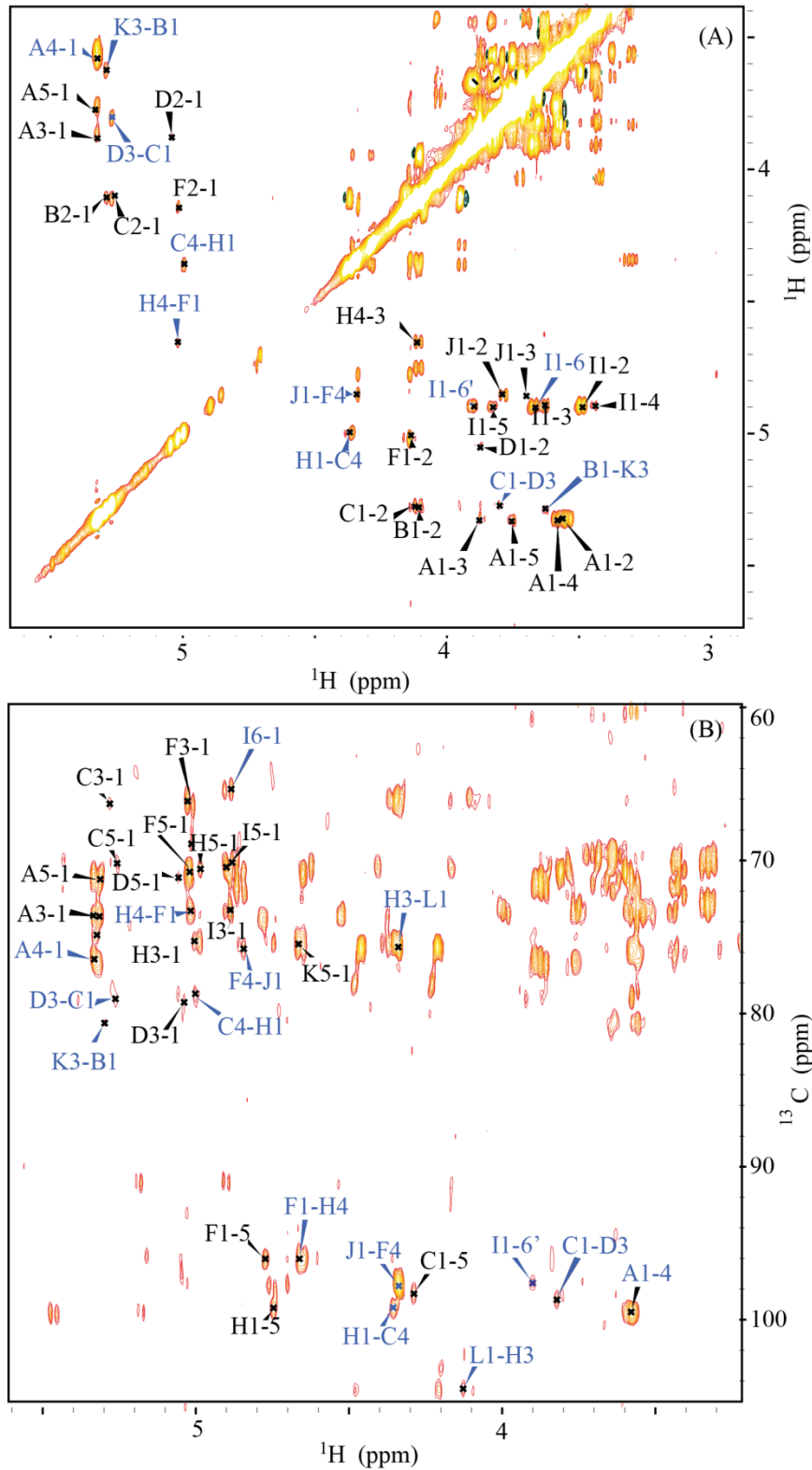
B	→4)-α-GlcpNAcA-(1→	98,1* 0,32	49,3 0,31	66,4 0,43	78,6 0,56	70,7 0,70	172,3 0,3	22,0 0,32
		5,38 0,004	4,20 0,008	4,02 0,016	4,42 0,026	4,28 0,101	-	2,05 0,002
C	→4)-α-GlcpNAcA-(1→	98,7 0,31	49,3 0,29	66,4 0,43	78,6 0,53	70,7 0,63	172,3 0,3	22,0 0,32
		5,34 0,018	4,18 0,007	4,00 0,013	4,41 0,027	4,28 0,101	-	2,05 0,002
D	→3)-α-GlcpNAc	90,9 0,32	52,7 0,29	78,4 0,41	71,2 0,36	71,1 0,19	60,1 0,27	22,0 0,32
		5,13 0,002	3,96 0,006	3,90 0,010	3,63 0,010	3,86 0,011	3,82 0,006	2,05 0,002
E[^]	→4)-α-GalpNAcAN-(1→	98,6 0,36	49,1 0,05	66,4 0,36	75,4 0,36	-	-	-
		5,10 0,010	4,02 0,015	4,18 0,012	4,48 0,002	-	-	-
F	→4)-α-GalpNAcAN-(1→	96,1 0,32	49,2 0,31	66,2 0,31	75,6 0,33	70,7 0,33	173,5 0,3	22,0 0,32
		5,10 0,002	4,23 0,002	4,23 0,002	4,43 0,002	4,87 0,009	-	2,03 0,002
H	→3,4)-α-GalpNAcAN-(1→	99,1 0,34	48,4 0,30	75,6 0,36	73,7 0,35	70,4 0,35	173,7 0,3	22,0 0,32
		5,08 0,002	4,46 0,009	4,20 0,006	4,74 0,004	4,83 0,005	-	2,05 0,002
J	α-GlcpNAc-(1→	97,6 0,32	53,6 0,32	70,5 0,33	69,5 0,33	71,8 0,30	60,0 0,33	22,0 0,32
		4,94 0,002	3,88 0,008	3,79 0,004	3,51 0,005	4,12 0,003	3,73 3,75 0,003 0,007	2,05 0,002
K	→3)-β-GlcpNAc	94,8 0,33	55,3 0,26	80,1 0,44	70,9 0,33	75,8 0,35	60,3 0,30	22,0 0,32
		4,71 0,005	3,72 0,005	3,71 0,006	3,66 0,003	3,46 0,002	3,85 0,009	2,05 0,002
L	β-D-Glcp-(1→	104,5 0,33	72,9 0,32	75,5 0,31	70,1 0,32	75,9 0,31	61,2 0,35	-
		4,43 0,003	3,06 0,004	3,42 0,002	3,21 0,002	3,39 0,001	3,66 3,91 0,007 0,009	-

* wartości średnie dla izolatów *B. holmesii* ATCC 51541, *B. pertussis* 186 i 606, *B. paraptussis* 529 oraz *B. bronchiseptica* 530 i 1943

[^] Reszty E i F są tą samą resztą →4)-α-GalpNAcAN-(1→ w innym otoczeniu

Połączenia pomiędzy resztami cukrowymi dla BOS ustalono w eksperymentach ¹H, ¹H NOESY oraz ¹H, ¹³C HMBC (Ryc. 56 i Tabela 17).

WYNIKI



Ryc. 56. Fragmenty widm NMR egzopolisacharydowej fr. III *B. holmesii* ^1H , ^1H NOESY (A) i ^1H , ^{13}C HMBC bez rozprężania (B). Kolorem niebieskim zaznaczono połączenia pomiędzy resztami

Tabela 17. Połączenia między resztami cukrowymi obserwowane w eksperymentach ^1H , ^1H NOESY i ^1H , ^{13}C HMBC dla BOS *Bordetellae*

Reszta	Atom C1/ H1	Korelacja z sygnałem $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$	Połączenie
B	98,1/ 5,38	80,1/ 3,71	C3, H3 reszty K
C	98,7/ 5,34	78,4/ 3,90	C3, H3 reszty D
D	90,9/ 5,13	-	brak
F	96,1/ 5,10	73,7/ 4,74	C4, H4 reszty H
H	99,1/ 5,08	70,7/ 4,28	C4, H4 reszty B i C
J	97,6/ 4,94	75,6/ 4,43	C4, H4 reszty F
K	94,8/ 4,71	-	brak
L	104,5/ 4,43	75,6/ 4,20	C3, H3 reszty H

W oparciu o uzyskane wyniki scharakteryzowano poszczególne reszty cukrowe:

Reszty **A** (δ_{C1} 99,3 ppm, δ_{H1} 5,40 ppm) oraz **I** (δ_{C1} 97,6 ppm, δ_{H1} 4,98 ppm) zidentyfikowano jako opisane w egzopolisacharydowej frakcji I homopolimery glukozy [\rightarrow 4)- α -Glc p -(1 \rightarrow)] oraz [\rightarrow 6)- α -Glc p -(1 \rightarrow)]. W egzopolisacharydowej fr. III występują w formach o niższym stopniu spolimeryzowania. Na widmie MALDI-TOF MS (Ryc. 53) zaobserwowano jony $[\text{M}+\text{H}]^+$ o m/z 2148,1 - 3444,5 odpowiadające 12-19 reszt glukozy w formie adduktów sodowych, co odpowiada zakresowi mas polisacharydów eluowanych z kolumny w danym zakresie t_{R} .

Reszty **B** i **C** zidentyfikowano jako 4-podstawiony α -Glc p NAcA [\rightarrow 4)- α -Glc p NAcA-(1 \rightarrow)] na podstawie dużych wartości stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym, a także wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C4 (wspólne przesunięcie dla reszty B i C δ_{C} 78,6 ppm). Podstawienie grupą aminową określono na podstawie charakterystycznego dla atomu węgla związanego z atomem azotu przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_{C} 49,3 ppm). Charakterystyczny pięcioprotonowy system spinowy oraz wysokie wartości przesunięć chemicznych H4 (δ_{H} 4,42 ppm), H5 (δ_{H} 4,28 ppm) oraz C5 (δ_{C} 172,3 ppm) pozwoliły zidentyfikować tę resztę jako kwas aminouronowy.

Reszta **D** scharakteryzowana została jako 3-podstawiona α -Glc p NAc [\rightarrow 3)- α -Glc p NAc-(1)] na podstawie dużych stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym, a także wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C3 (δ_{C} 78,4 ppm). Podstawienie grupą aminową określono na podstawie przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_{C} 52,7 ppm).

Resztę **F** scharakteryzowano jako 4-podstawiony α -Gal p NAcAN [\rightarrow 4)- α -Gal p NAcAN-(1 \rightarrow)] na podstawie wysokich wartości stałych sprzężeń protonów wicynalnych H1, H2 i H3 oraz niskich wartości stałych sprzężeń protonów H3, H4 i H5,

a także stosunkowo wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C4 (δ_C 75,6 ppm). Podstawienie grupą aminową określono na podstawie przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 49,2 ppm). Obecność grup amidowych scharakteryzowano na podstawie korelacji sygnałów proton – azot pochodzących od węgla karbonylowego do H4, H5 (δ_C 173,5 ppm).

Resztę **H** zidentyfikowano jako 3,4-podstawiony α -GalpNAcAN [\rightarrow 3,4)- α -GalpNAcAN-(1 \rightarrow)] na podstawie wysokich wartości stałych sprzężeń protonów wicynalnych H1, H2 i H3 oraz niskich wartości stałych sprzężeń protonów H3, H4 i H5, a także stosunkowo wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnałów węgla C3 (δ_C 75,6 ppm) oraz C4 (δ_C 73,7 ppm). Podstawienie grupą aminową określono na podstawie przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 49,2 ppm). Obecność grup amidowych scharakteryzowano na podstawie korelacji sygnałów proton – azot pochodzących od węgla karbonylowego do H4, H5 (δ_C 173,5 ppm).

Reszta **J** została scharakteryzowana jako terminalna α -Glc pNAc na podstawie dużych stałych sprzężeń dla wszystkich δ_H w systemie spinowym. Podstawienie grupą aminową określono na podstawie przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 53,6 ppm).

Reszta **K** została zidentyfikowana jako 3-podstawiona β -Glc pNAc [\rightarrow 3)- β -Glc pN-(1)] na podstawie dużych stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym, a także stosunkowo wysokiej wartości przesunięcia chemicznego sygnału węgla C3 (δ_C 80,1 ppm) Podstawienie grupą aminową określono na podstawie przesunięcia chemicznego sygnału węgla C2 (δ_C 55,3 ppm).

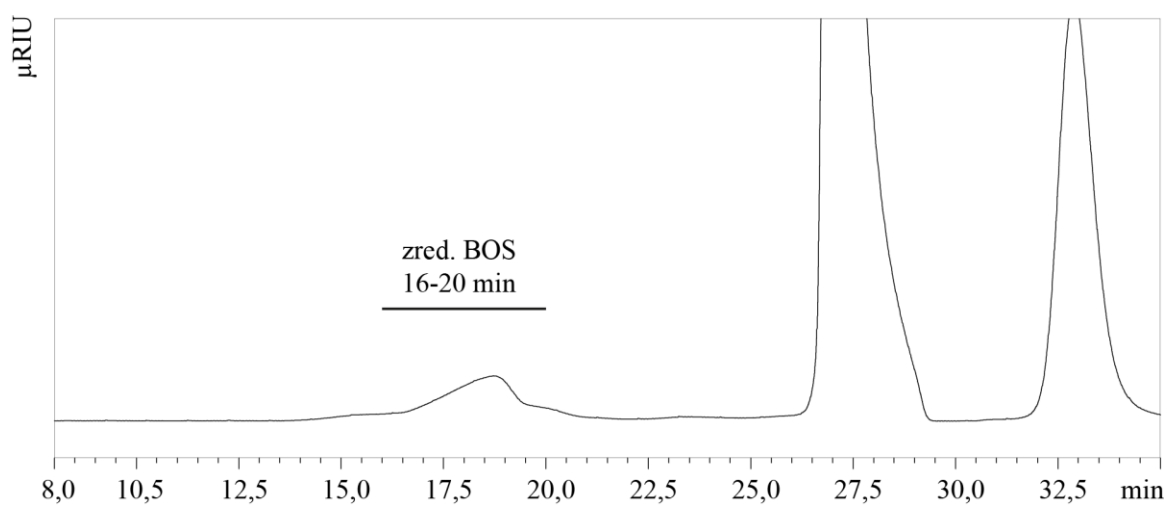
Resztę **L** zidentyfikowano jako terminalną β -D-Glc p na podstawie dużych stałych sprzężeń dla wszystkich protonów w systemie spinowym oraz przez podobieństwo wartości ^1H i ^{13}C opisanych dla β -D-Glc p.

Wartości stałych sprzężeń $J_{\text{C1,H1}}$ uzyskane z eksperymentów ^1H , ^{13}C HMBC bez rozprzęgania, potwierdziły, że reszty B/C (~172 Hz), D (~170 Hz), F (~171 Hz), H (~176 Hz), J (~173 Hz), występują w konfiguracji α - piranozy, a reszty K (~162 Hz) oraz L (~160 Hz) w konfiguracji β - piranozy.

Podstawienia grupą N-acetylową zidentyfikowano w eksperymentach ^1H , ^{13}C HMBC na podstawie korelacji atomów węgla karbonylowych grup acetylowych (δ_C 174,0 ppm) do protonów H2 reszt B/C (δ_H 4,18 ppm/ δ_H 4,20 ppm), D (δ_H 3,96 ppm), F (δ_H 4,23 ppm), H (δ_H 4,46 ppm), J (δ_H 3,88 ppm) oraz K (δ_H 3,72 ppm).

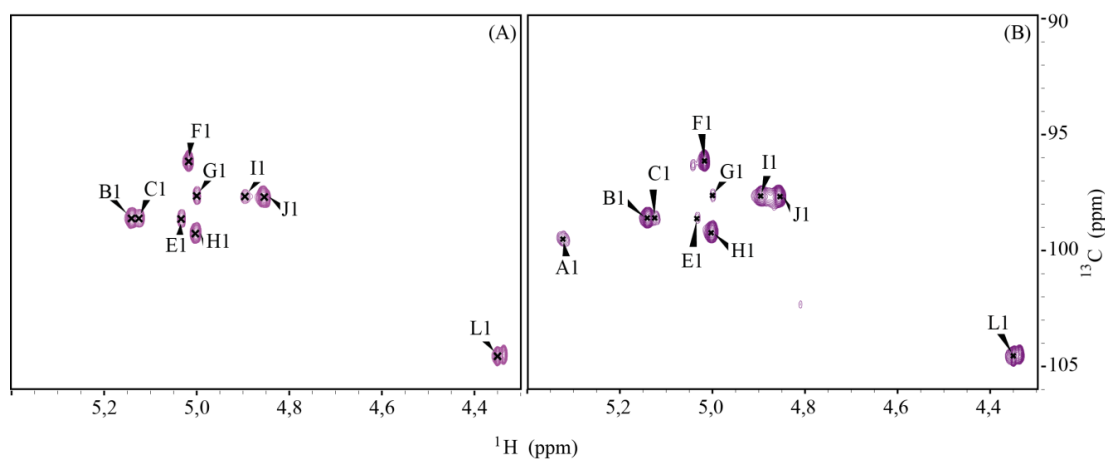
WYNIKI

Na podstawie analizowanych widm ^1H , ^1H NOESY i ^1H , ^{13}C HMBC, reszty D i K zidentyfikowano jako koniec redukujący cząsteczki formy α i β tej samej GlcNAc. W celu potwierdzenia tej obserwacji, przeprowadzono redukcję cząsteczki BOS. Egzopolisacharydowe frakcje III *B. holmesii* oraz *B. pertussis* 186 (odpowiednio 2,2 mg, 3,5 mg) poddano reakcji redukcji przy zastosowaniu borowodoru sodu. Produkty reakcji odsalano przy użyciu systemu HPLC na kolumnie typu TSKgel G3000PW. Rozdział dla egzopolisacharydowej fr. III *B. pertussis* 186 po redukcji przedstawiano na chromatogramie poniżej na Ryc. 57.



Ryc. 57. Rozdział chromatograficzny preparatu BOS *B. pertussis* 186 po redukcji, rozdział monitorowano refraktometrycznie

Na podstawie widm ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT NMR, we frakcji o czasie retencji 16-20 min, zidentyfikowano zredukowany BOS w preparatach pochodzących od *B. pertussis* 186 oraz *B. holmesii*, co zaprezentowano na Ryc. 58.



Ryc. 58. Region anomeryczny widm ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT NMR zredukowanego BOS dla *B. pertussis* 186 (A) i *B. holmesii* (B)

WYNIKI

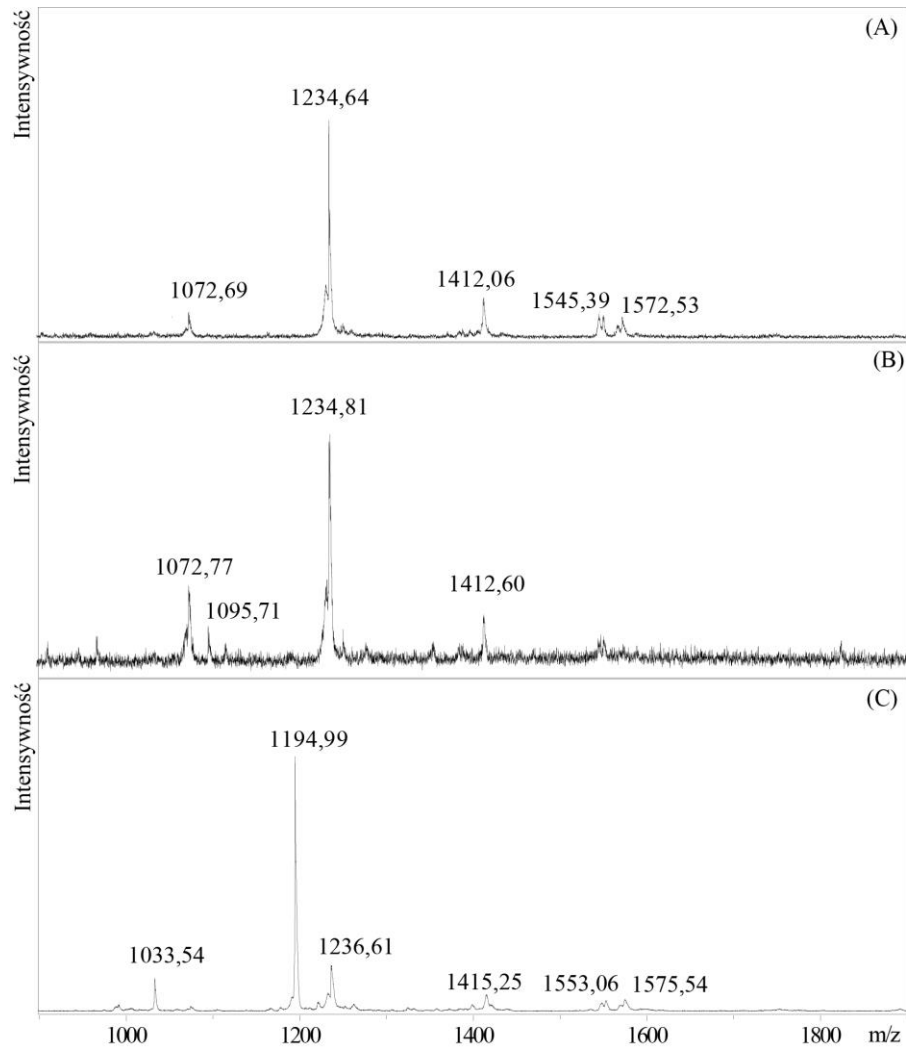
Nieobserwowane są sygnały od anomerów reszt D oraz K, które uległy zredukowaniu, pojawiają się natomiast sygnały grupy CH₂ (δ_{C1} 62,8 ppm, δ_{H1} 3,58 ppm / 3,73 ppm). Potwierdza to wcześniejsze przypuszczenie, że reszty D i K tworzą koniec redukujący. Jednocześnie przesunięcia chemiczne reszt B i C bezpośrednio związanych ze zredukowaną GlcNAc mają te same wartości, co sugeruje, że otoczenie tych reszt po reakcji redukcji jest takie samo i nie są to dwie reszty, a jedna reszta B/C. Na widmach ¹H, ¹³C HSQC-DEPT NMR, pomimo oczyszczania próbki na kolumnie filtracji żelowej, w dalszym ciągu obserwowane są jeszcze zanieczyszczenia glukanami (reszty A oraz I). Frakcje eluowane z kolumny przed frakcją zawierającą zredukowany BOS zawierają glukany, a frakcje eluowane później zawierają glukany, niezredukowany BOS, aminokwasy, kwasy tłuszczowe oraz sole. Przesunięcia chemiczne dla zredukowanej reszty D/K przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Przesunięcia chemiczne dla zredukowanej reszty D/K

Reszta	Przesunięcia chemiczne [ppm]					
	C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6,H6'
zred. D/K	62,8	53,6	76,5	70,1	70,5	60,3
	3,58	4,0	4,08	3,53	3,79	3,75
	3,73					

Przeprowadzoną reakcję redukcji potwierdzano również techniką spektrometrii mas. Przed reakcją na widmach MALDI-TOF MS preparatów dla *B. holmesii* (Ryc. 59, A) oraz *B. pertussis* 186 (Ryc. 59, B) obserwujemy główne jony [M-H]⁻ odpowiednio o *m/z* 1234,6 i 1234,8. Zarówno widma NMR jak i MALDI-TOF MS potwierdzają, że analizowane cząsteczki BOS są strukturalnie identyczne.

Po przeprowadzeniu reakcji redukcji na widmie MALDI-TOF MS zarejestrowanym dla *B. holmesii* obserwujemy jon o *m/z* 1236,61 który odpowiada zredukowanej cząsteczce BOS oraz jon o *m/z* 1194,99, który również odpowiada zredukowanej cząsteczce BOS, ale pozbawionej grupy acetylowej (Ryc. 59, C). Może to świadczyć o tym, że dominującą formą BOS jest cząsteczka o masie 1235,5 Da. Natomiast po przeprowadzeniu reakcji redukcji oraz oczyszczeniu preparatów na kolumnie w preparacie wyizolowanym z rozdziału medium pochodowlanego *B. holmesii*, w którym obecne są jeszcze glukany „ujawniła się” forma śladowa pozbawiona grupy acetylowej o *m/z* 1194,99.

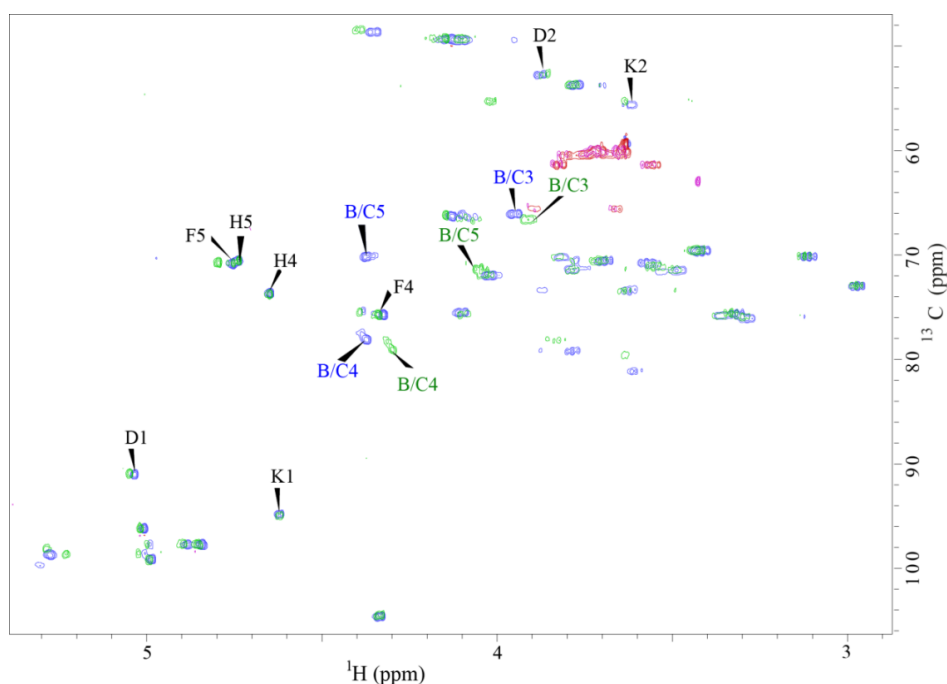


Ryc. 59. Fragment widma MALDI-TOF MS fr. III *B. holmesii* (A), *B. pertussis* 186 (B) oraz BOS *B. holmesii* po redukcji (C). Widma wykonano w trybie liniowym polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą

Aby rozwiać wątpliwość czy reszty D i K są podstawione grupą aminową czy N-acetylową, przeprowadzono N-acetylację BOS wyizolowanego z *B. pertussis* 186 i porównano widma. Na Ryc. 60 zestawiono widma, przed N-acetylacją (sygnały niebiesko-czerwone), i po reakcji N-acetylacji preparatu (sygnały zielono-różowe). Na widmach ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT nie zaobserwowano zmian w przesunięciach sygnałów C/H-2 reszt D oraz K (oznaczone kolorem czarnym i opisane D2 i K2), co pozwoliło ustalić, że obie reszty są natywnie podstawione grupą acetylową. Na podstawie przeprowadzonych reakcji oraz analiz przesunięć chemicznych, resztę D scharakteryzowano jako $\rightarrow 3$ - α -Glc pNAc, a resztę K jako jej β -anomer.

Kilkukrotne analizy tych samych próbek BOS pochodzących od różnych *Bordetellae*, po wielokrotnym przeliofilizowaniu w D_2O , ujawniły pH-zależną zmianę przesunięć sygnału C/H-5 reszty B/C, co ma odzwierciedlenie w odchyleniach

standardowych dla δ_H 4,28 ppm. Po rozdziale w 0,05 M kwasie octowym wystarczyło jednokrotne przeliofilizowanie w D_2O , aby uzyskać dobrej jakości widma NMR, więc w wyjściowych preparatach o niskim pH, nie zaobserwowano zmian przesunięć sygnałów. Dlatego początkowo w strukturze BOS reszty F, H oraz B/C zidentyfikowano jako kwasy uronowe. Jedynie różnica 2 Da pomiędzy obliczoną masą teoretyczną, a masą obserwowaną na widmach MALDI-TOF MS wskazywała, że należy tą kwestię poddać dokładniejszym badaniom. Dla potwierdzenia obecności kwasów uronowych zarejestrowano komplet widm w dwóch różnych pH. Początkowe pH analizowanej próbki wynosiło ~ 5 . Przy alkalizacji do $pH \sim 9$ obserwowana jest, charakterystyczna dla kwasów uronowych, pH-zależna zmiana przesunięcia dla sygnału H5 o -0,4 ppm. W pracy Prestona i wsp. opisano zmiany wartości przesunięć sygnałów C/H-4 i C/H-5 reszt kwasów uronowych w widmach zarejestrowanych w $pH \sim 5$ i ~ 9 . Jednakże przy dodatkowym podstawieniu kwasów uronowych przez grupy amidowe, sygnały te nie ulegały przesunięciu (Preston i in., 2006).



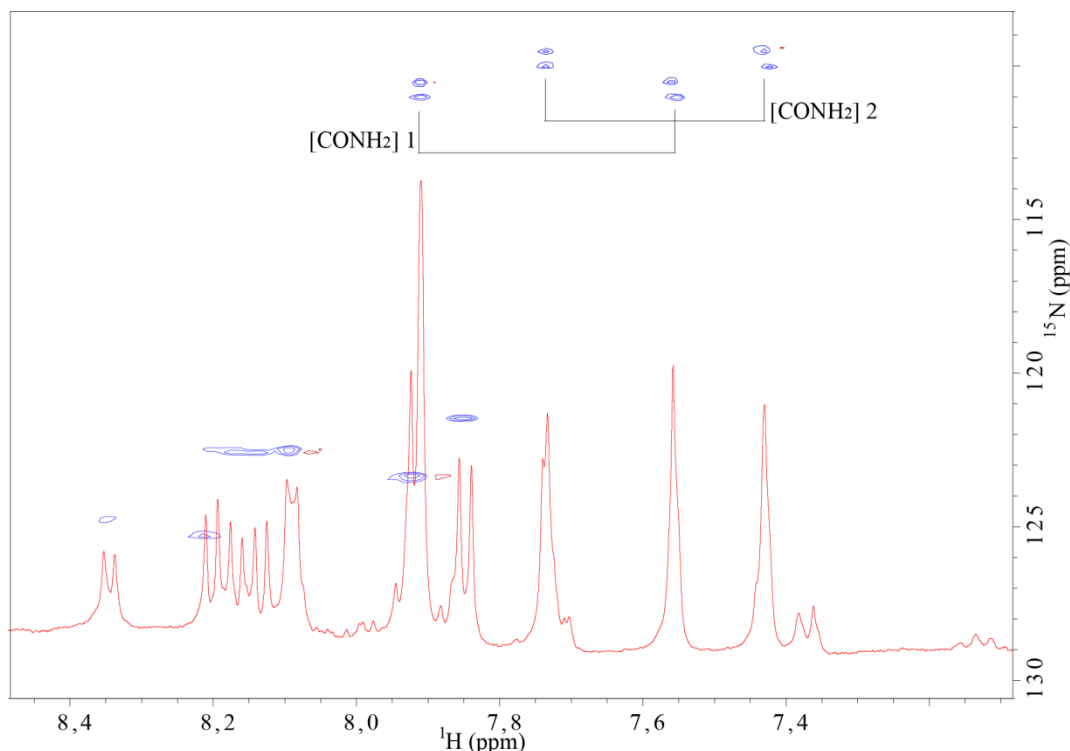
Ryc. 60. Fragment widma $^1H, ^{13}C$ HSQC-DEPT frakcji III *B. pertussis* 186 przed (sygnały w kolorze niebiesko-czerwonym, $pH \sim 5$) i po N-acetylacji (sygnały w kolorze zielono-różowym, $pH \sim 9$).

Taką zależność zaobserwowano również na widmach wykonanych po N-acetylacji, w trakcie której następuje alkalizacja próbki do $pH \sim 9$. Zauważono wyraźną zmianę wartości przesunięcia sygnału H5 (-0,4 ppm) reszty B/C (opisane jako B/C5). Nie zaobserwowano natomiast zmian wartości przesunięć chemicznych sygnałów H5 reszt F

(F5) i H (H5), co oznacza, że węgle karbonylowe tych reszt są podstawione grupą amidową. Na Ryc. 60 sygnały bez zmian przesunięć opisano kolorem czarnym, a te które uległy przesunięciu opisano kolorem niebieskim (w pH 5) i zielonym (w pH 9).

Dodatkowym potwierdzeniem obecności grup amidowych są widma korelacyjne ^1H , ^{15}N , przedstawione na

Ryc. 61, na których zaobserwowano sygnały w regionie δ_{H} 7,4-8,0 ppm pochodzące od dwóch grup amidowych podstawiających węgle karbonylowe.



Ryc. 61. Fragment widma korelacji ^1H , ^{15}N frakcji III *B. holmesii*. Oznaczono obserwowane dublety pochodzące od sygnałów grup CONH_2 reszt F i H. Uzyskane widma nie pozwoliły na ich jednoznaczne przypisanie do odpowiednich reszt.

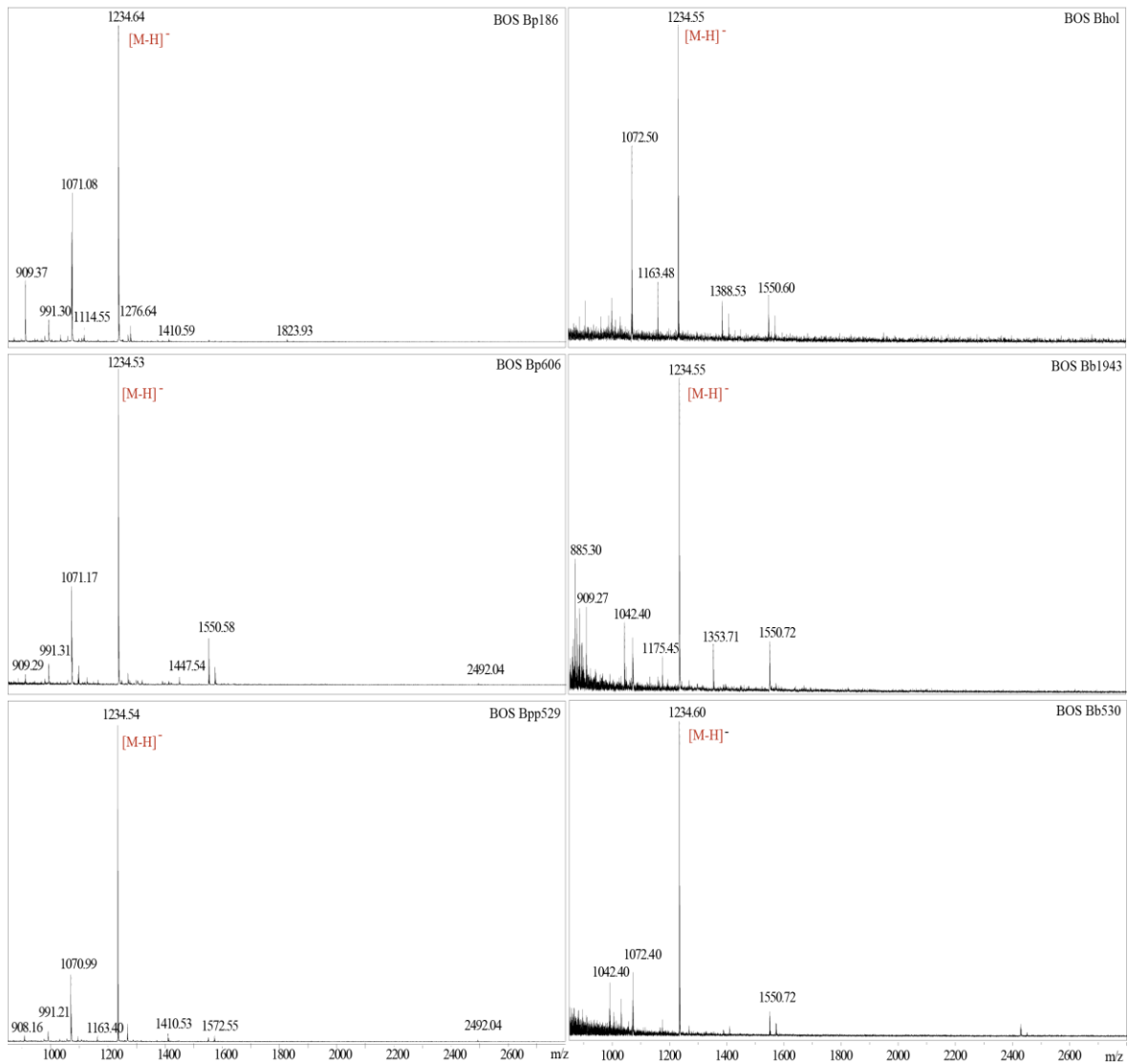
Obecność grup fosforanowych wykluczono, rejestrując jednowymiarowe widma ^{31}P oraz widma korelacji ^1H , ^{31}P dla wszystkich frakcji III pochodzących z rozdzielów mediów *Bordetellae*. Na żadnym widmie nie zaobserwowano sygnałów pochodzących od fosforanowych podstawników (widma niezamieszczone).

7.3.2.3. Analiza strukturalna BOS technikami spektrometrii mas

Strukturę BOS analizowano również technikami spektrometrii mas MALDI-TOF MS oraz ESI. Preparaty badanej frakcji III po rozdzielach chromatograficznych nie były dodatkowo oczyszczane, dlatego na wielu widmach masowych znajdują się niezidentyfikowane do końca sygnały.

WYNIKI

Teoretyczna masa monoizotopowa BOS obliczona na podstawie danych uzyskanych z analiz NMR wynosi 1235,43 Da. Na widmach masowych BOS (Ryc. 62) wykonanych w trybie reflektrom polaryzacji ujemnej obserwowane są sygnały $[M-H]^-$ o dużej intensywności m/z 1234,6. Praktycznie nieobserwowane są sygnały mniejsze o 42 Da, czyli o grupę acetylową, co potwierdzałoby obserwację, że reszta K jest jednak N-acetylowaną glukozaminą. Intensywny jon o m/z 1234,6 pojawia się we wszystkich analizowanych frakcjach, wskazując na dominację heksasacharydu o opisanej strukturze w egzopolisacharydowej frakcji III.

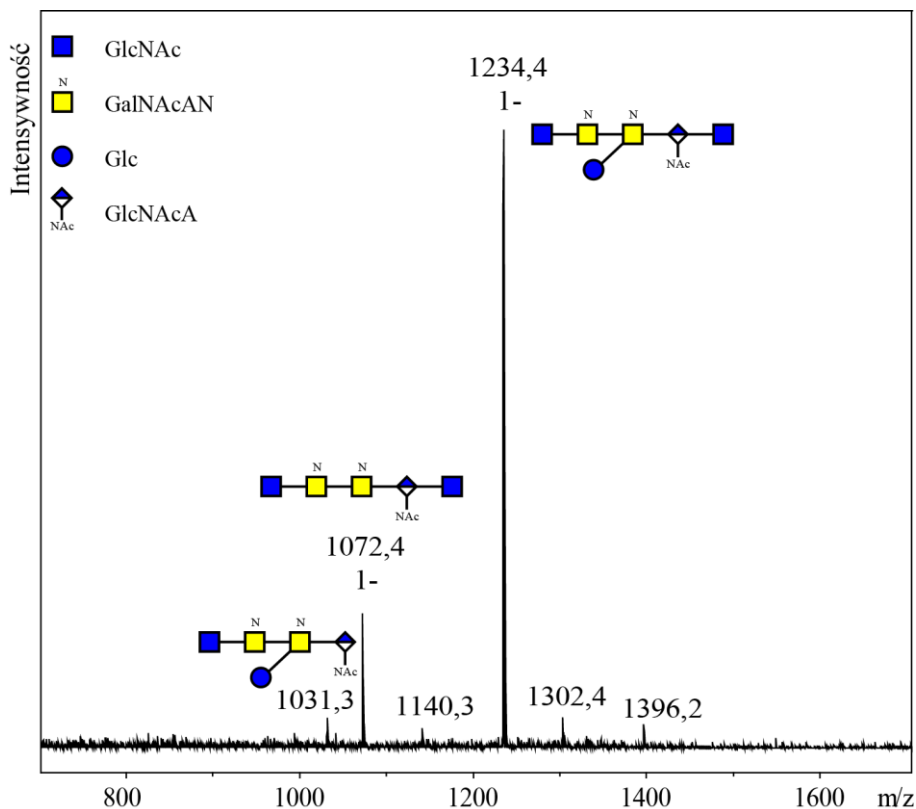


Ryc. 62. Zebrane widma masowe frakcji III po rozdziale chromatograficznym mediów pochodzących z *B. pertussis* 186, *B. pertussis* 606, *B. parapertussis* 529, *B. holmesii* oraz *B. bronchiseptica* 1943 oraz *B. bronchiseptica* 530 *oś y to intensywność sygnałów

Profil rozdziału chromatograficznego na kolumnie filtracji żelowej HiLoad 16/600 Superdex 30 pg i czas retencji frakcji III wskazuje, że wykryta cząsteczka BOS ma

większą masę niż 1235,5 Da. Porównując jednak t_R BOS (70-80 min) z t_R znanego OS *B. pertussis* 606 o m/z 1632,5 Da (fr. VI, 112-135 min,) oraz OS *B. pertussis* 186 o m/z 2291,6 (fr. VII, 93-105), rozdziałów przeprowadzonych w identycznych warunkach spodziewana M_w badanej cząsteczki powinna być większa niż początkowo zakładano. W dalszych analizach, na części widm masowych, zidentyfikowano jon o m/z 2492,0 o znacznie mniejszej intensywności, odpowiadający $[2M + Na]^+$. Wydaje się, że pod wpływem zastosowanej mocy lasera dochodzi do rozpadu cząsteczki BOS z wytworzeniem heksasacharydu oraz mniejszych fragmentów. Jon o m/z 1072 odpowiada BOS, który jest pozbawiony reszty glukozy (teoretyczna masa to 1073,38 Da), a jon o m/z 1031,5 to BOS pozbawiony N-acetylowanej glukozaminy (teoretyczna masa to 1032,35 Da).

Możliwe zatem, że BOS jest dimerem, ale na widmach NMR nieobserwowane są sygnały, które jednoznacznie wskazywałyby, w jaki sposób dwie cząsteczki BOS byłyby ze sobą połączone. Nie udało się wyizolować frakcji, w której możliwe byłoby zaobserwowanie BOS w formie dimeru. Możliwym wytłumaczeniem tej obserwacji byłaby obecność w BOS labilnego wiązania, które ulega rozpadowi w warunkach izolacji lub preparacji tego oligosacharydu.

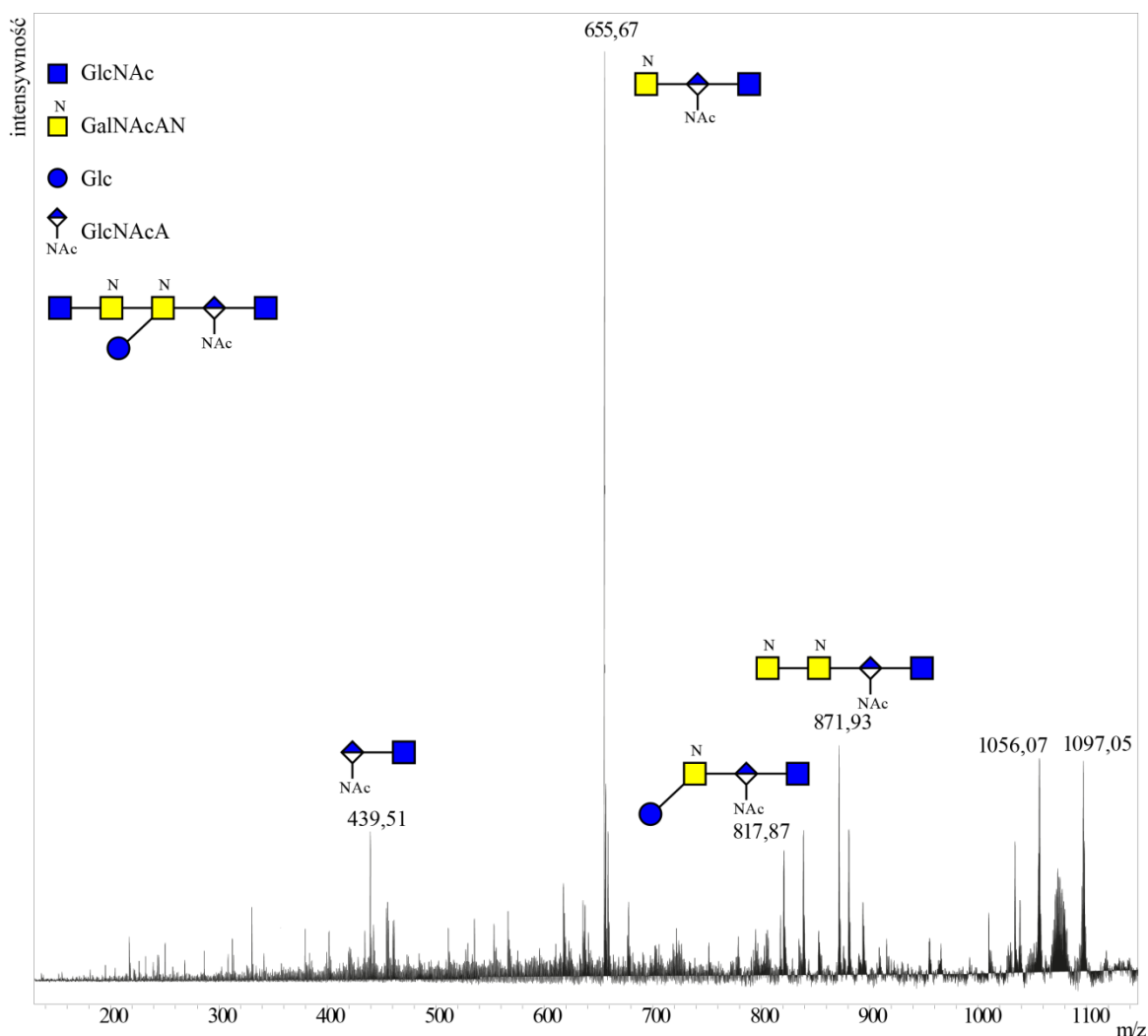


Ryc. 63. Widmo ESI MS frakcji III po rozdziale chromatograficznym medium pochodzącego *B. holmesii*

WYNIKI

Na widmie masowym ESI (Ryc. 63) zarejestrowano w trybie jonów ujemnych intensywne sygnały m/z 1234,4 $[M-H]^-$, m/z 1031,3 $[M-HexNAc-H]^-$ oraz m/z 1072,4 $([M-Hex-H]^-)$. Zaobserwowano jony jednokrotnie naładowane $[M-H]^-$ o m/z 1072,4 oraz m/z 1234,4.

Przeprowadzono również fragmentację jonu m/z 1234,4 dla BOS *B. pertussis* 606. Na widmie fragmentacyjnym MALDI-TOF MS (Ryc. 64), wykonanym w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej zidentyfikowano główny jon o m/z 655,67 który odpowiada masie trójczukru HexNAcAN + HexNAcA + HexNAc oraz jony różniące się o 216,2 Da (m/z 439,51 i m/z 871,99). Jest to dodatkowe potwierdzenie obecności dwóch reszt z podstawieniem grupą amidową na węglu karbonylowym (HexNAcAN).

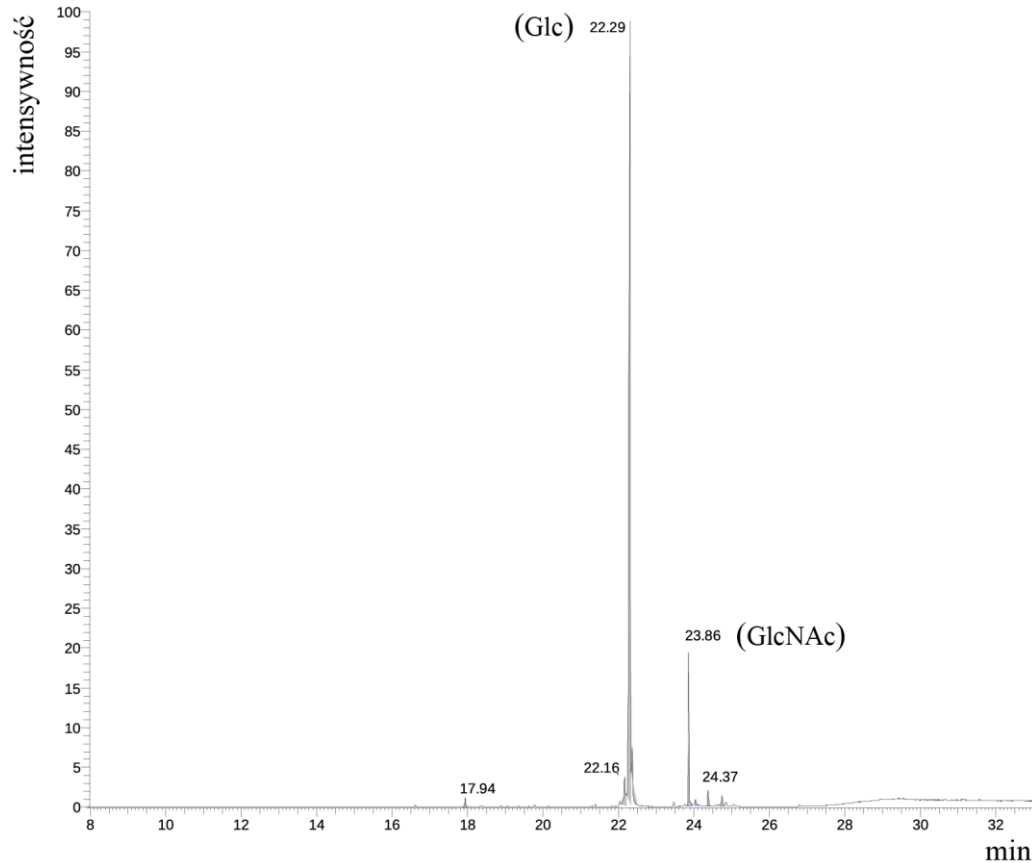


Ryc. 64. Widmo fragmentacyjne MALDI-TOF MS jonu o m/z 1234,4 wykonane w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.

W celu potwierdzenia danych o monosacharydowych składnikach BOS zidentyfikowanych w analizach techniką spektroskopii NMR przeprowadzono analizy

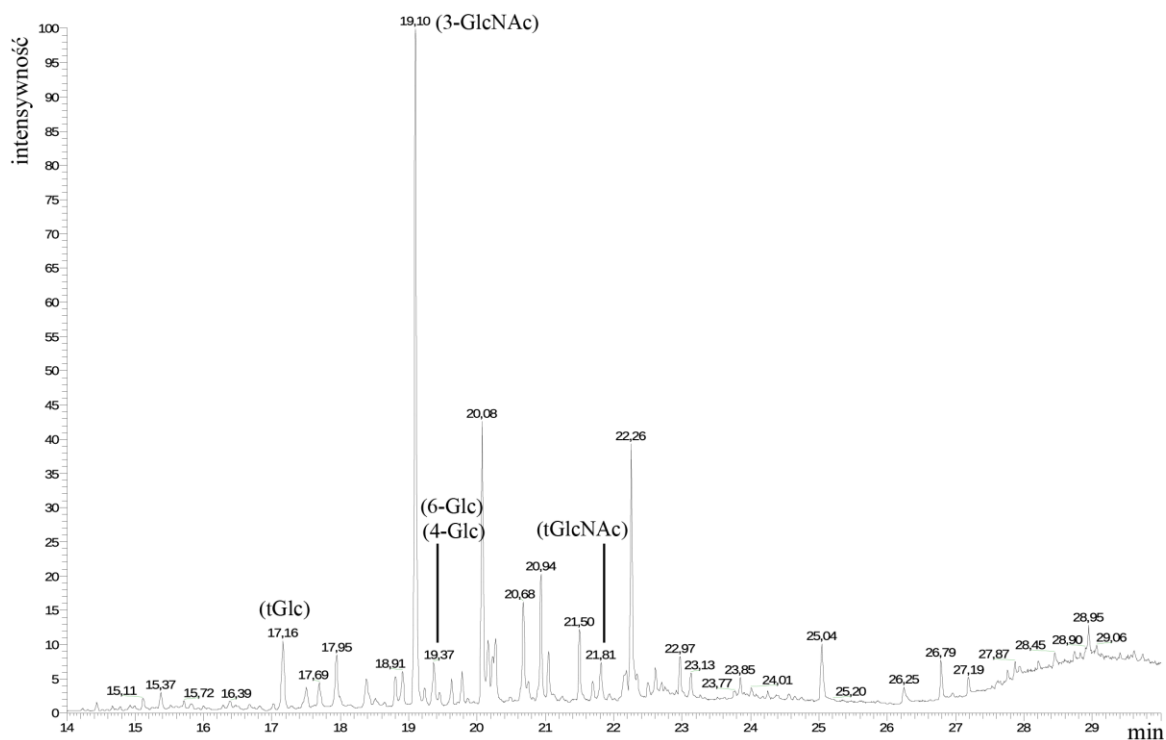
WYNIKI

cukrowe i metylacyjne. Do dalszych badań wybrano fr. III wyizolowaną z medium pochodzącego *B. holmesii*. Skład cukrowy określono w oparciu o analizę cukrową przeprowadzoną z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej (GC-MS). Porównano czasy retencji otrzymanych lotnych pochodnych składników cukrowych-octanów alditoli- z odpowiednimi standardami.



Ryc. 65. Chromatogram lotnych pochodnych składników cukrowych otrzymanych w wyniku analizy cukrowej fr. III *B. holmesii*

Na podstawie analizy czasów retencji zidentyfikowano w próbce jedynie obecność glukozy (t_R 22,29 min) oraz N-acetyloglukozaminy (t_R 23,86 min). Reszty cukrowe podstawione kwasami uronowymi i grupami amidowymi nie tworzą lotnych pochodnych, dlatego nie można ich zaobserwować w klasycznej analizie cukrowej i metylacyjnej. Identyfikację miejsca podstawienia umożliwiła interpretacja widm masowych lotnych pochodnych składników cukrowych – częściowo metylowanych octanów alditoli analizowanych przy pomocy GC-MS.

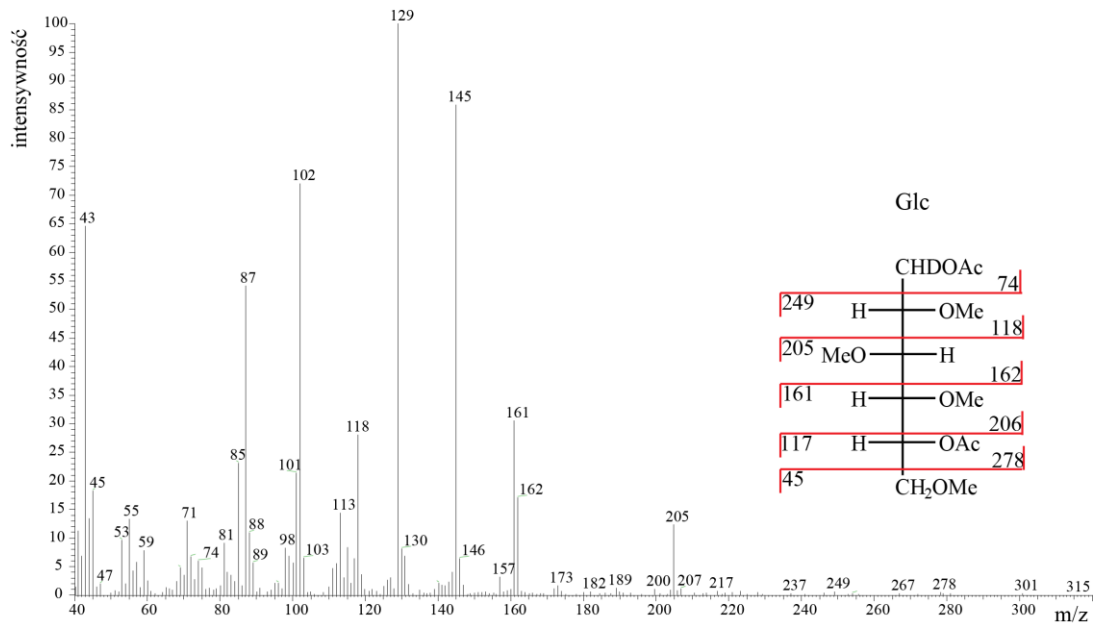


Ryc. 66. Chromatogram lotnych pochodnych składników cukrowych otrzymanych w wyniku analizy metylacyjnej BOS *B. holmesii*

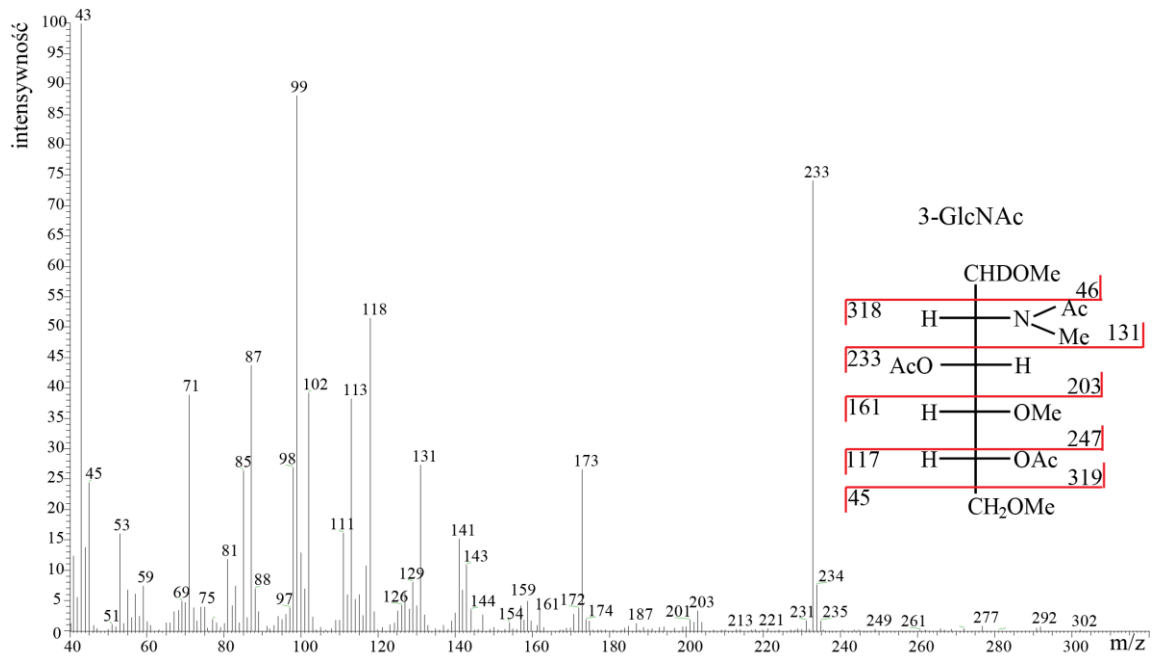
W badanej frakcji III *B. holmesii* na Ryc. 66 na podstawie widm masowych dla poszczególnych czasów retencji zidentyfikowano:

- 1-O-Ac-2,3,4,5,6-penta-O-Me-glucitol odpowiadający terminalnej reszcie Glcp o t_R 17,16 min (Ryc. 67)
- 3,5-di-O-Ac-2-N-Ac-1,4,6-tri-O-2-N-Me-glucitol odpowiadający 3-podstawionej reszcie GlcpNAc o t_R 19,10 min (Ryc. 68)
- 1,3,5-tri-O-Ac-2-N-Ac-4,6-di-O-2-N-Me-glucitol odpowiadający terminalnej GlcpNAc o t_R 21,81 min (Ryc. 69)
- 1,5,6-tri-O-Ac-2,3,4-tri-O-Me-glucitol oraz 1,4,5-tri-O-Ac-2,3,6-tri-O-Me-glucitol odpowiadający reszcie 6- podstawionej reszcie Glcp oraz 4-podstawionej reszcie Glcp niebędącymi składnikiem BOS, a glukanami o t_R 19,37 min (Ryc. 70)

WYNIKI

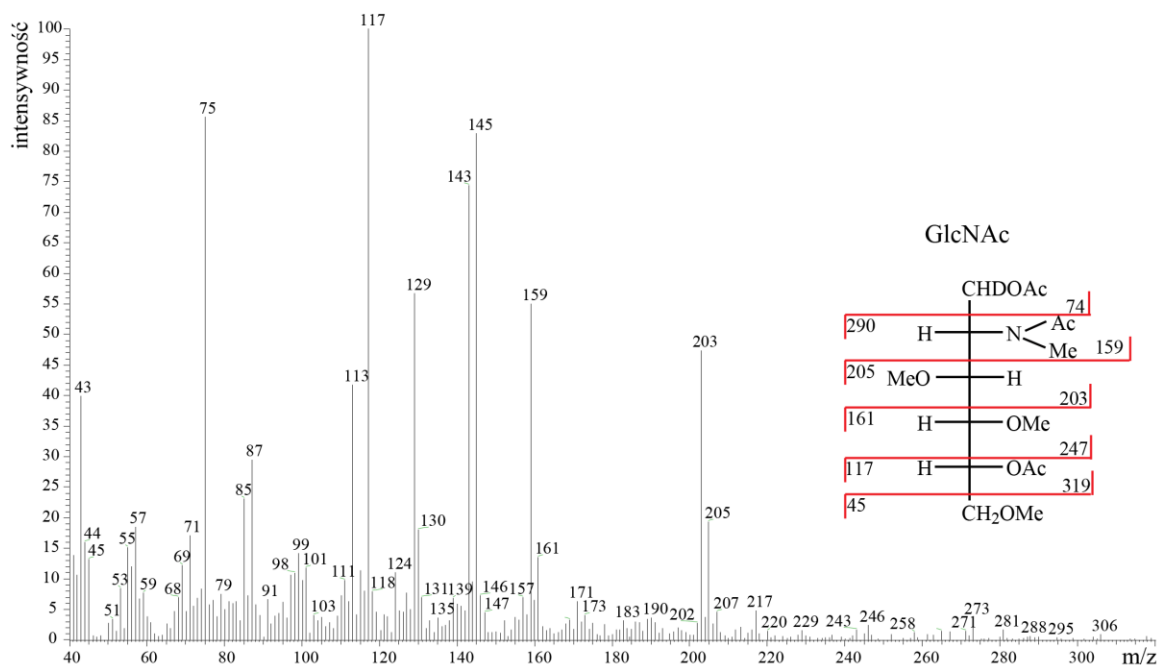


Ryc. 67. Widmo masowe 1-O-Ac-2,3,4,5,6-penta-O-Me-glucitolu

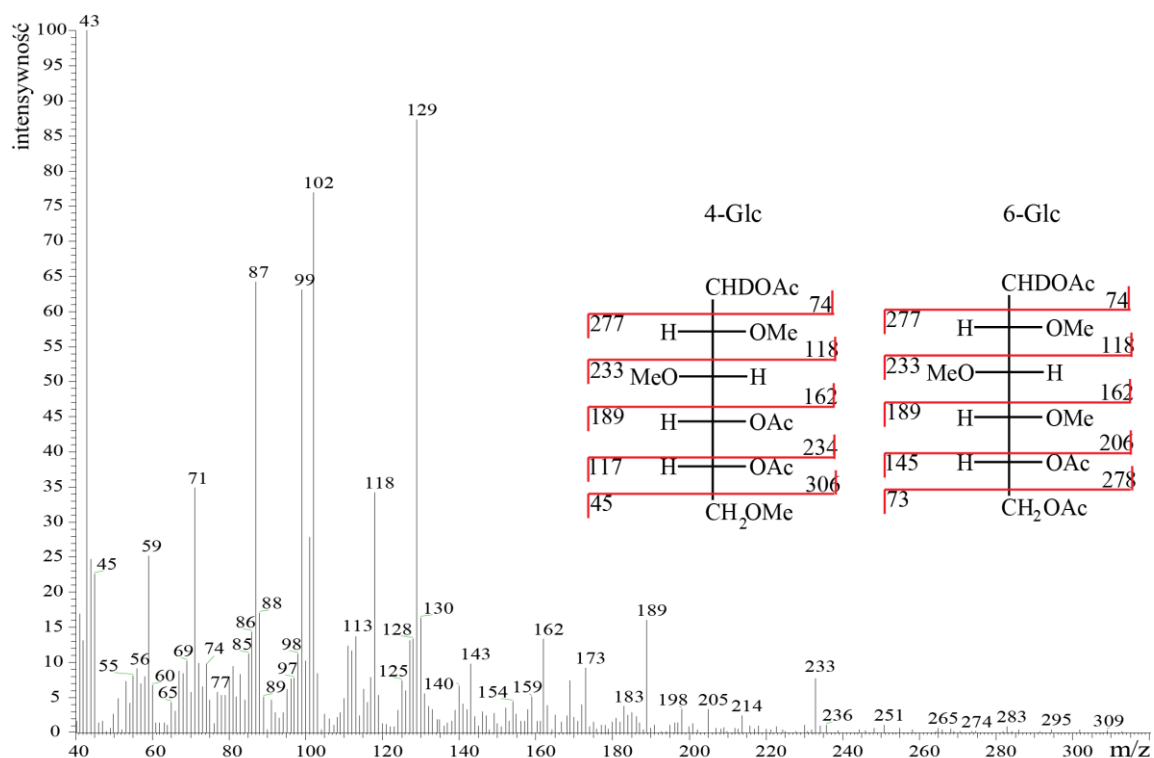


Ryc. 68. Widmo masowe 3,5-di-O-Ac-2-N-Ac-1,4,6-tri-O-2-N-Me-glucitolu

WYNIKI



Ryc. 69. Widmo masowe 1,3,5-tri-O-Ac-2-N-Ac-4,6-di-O-2-N-Me-glucitolu

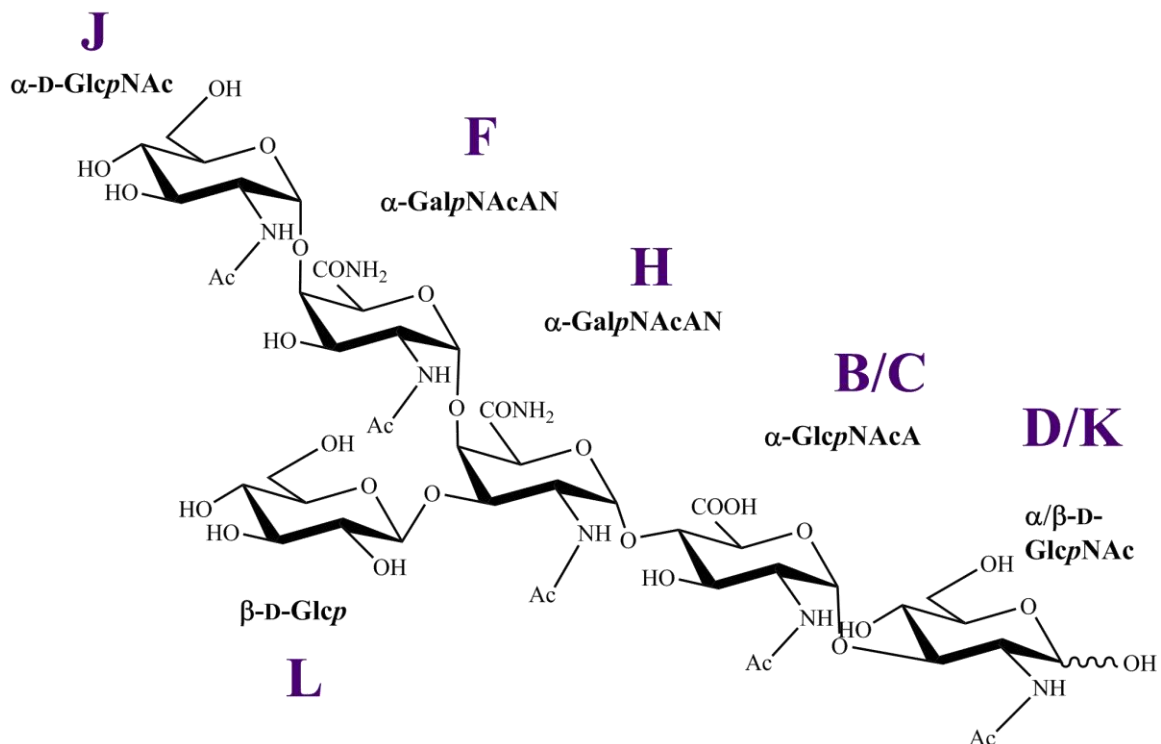


Ryc. 70. Widmo masowe 1,5,6-tri-O-Ac-2,3,4-tri-O-Me-glucitolu oraz 1,4,5-tri-O-Ac-2,3,6-tri-O-Me-glucitolu

Przeprowadzono również analizy w celu identyfikacji kwasu N-acetyloglukuronowego (reszta B/C) metodą opartą o redukcję grup estrowych obecnych w zmetylowanych próbkach 1 M roztworem LiB(C₂H₅)₃D w tetrahydrofuranie (Superdeuteride) (Bhat i in., 1991). Otrzymane pochodne poddano hydrolizie oraz acetylacji i analizowano przy użyciu spektrometru masowego sprzężonego z chromatografem

gazowym. W zarejestrowanych widmach nie zidentyfikowano jonów, które odpowiadałyby charakterystycznym jonom fragmentacyjnym dla 4- podstawionej GlcNAcA.

Uzyskane wyniki technikami spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas pozwoliły ustalić strukturę nowego cukrowego składnika osłony komórkowej bakterii z rodzaju *Bordetella* zaprezentowanego na Ryc. 71. Zaproponowana nazwa tego nieopisanego wcześniej egzooligosacharydu wytwarzanego przez wszystkie analizowane *Bordetellae* to *Bordetella oligosaccharide* (BOS).



Ryc. 71. Zaproponowana struktura BOS bakterii z rodzaju *Bordetella*

7.3.2.4. Analiza serologiczna egzopolisacharydów

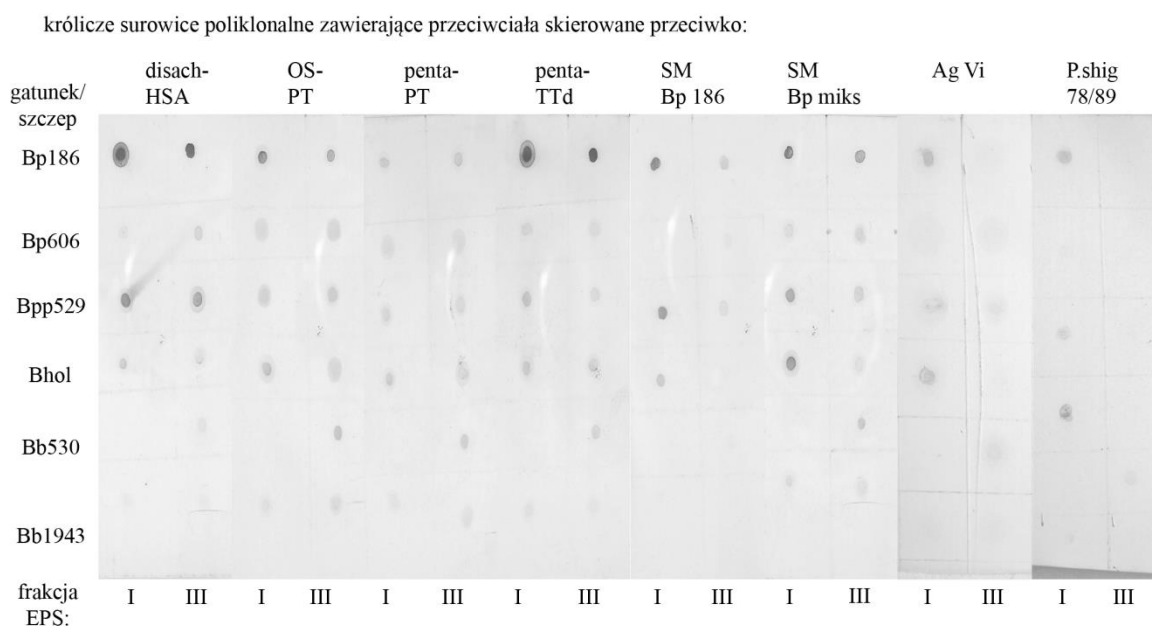
Wyizolowane egzopolisacharydy *Bordetellae* są zupełnie nowym potencjalnym antygenem badanych bakterii i laboratorium jeszcze nie posiada surowic na neoglikokoniugat, którego fragmentem cukrowym jest omawiany BOS. W testach serologicznych dot blot, w związku z tym, że nie są dostępne monoswoiste surowice, które reagowałyby z BOS, do analiz wykorzystano królicze surowice poliklonalne dostępne w kolekcji laboratorium opisane w rozdziale „Materiały i metody” (podrozdział 6.3.1), których używano do analiz LPS bakterii z rodzaju *Bordetella*.

- anty-Vi

WYNIKI

- anty-disach-HSA
- anty-OS-PT
- anty-penta-PT
- anty-penta-TTd
- anty-SM Bp 186
- anty-SM Bp miks (szczepy 186/576/606/629)
- anty-LPS P.shig 78/89

Kontrolę pozytywną dla anty-glikokoniugatowych króliczych surowic poliklonalnych, stanowiły glikokoniugaty penta-PT, OS-PT OS-TTd, penta-TTd oraz disach-HSA, których swoistości w układach homologicznych są znane (Ryc. 14).



Ryc. 72. Analiza serologiczna egzopolisacharydów (fr. I oraz fr. III) bakterii z rodzaju *Bordetella* z surowicami króliczymi z kolekcji laboratorium

Z różną intensywnością, wszystkie posiadane anty-glikokoniugatowe surowice reagują krzyżowo z analizowanymi egzopolisacharydami zarówno fr. I jak i fr. III. W swojej strukturze BOS i oligosacharydowe fragmenty LOS wyizolowane z *B. pertussis* 186 mogą mieć wspólne epitopy i w analizowanych surowicach znajduje się pewna pula przeciwciał rozpoznająca ten sam fragment cukrowy. We wcześniej przeprowadzonych badaniach wykazano, że terminalna GlcNAc jest immunodominującym składnikiem OS *B. pertussis* 186 (Niedziela i in., 2005). Terminalna GlcNAc obecna jest również w BOS, dlatego zarówno monoswoista surowica anty-disach-HSA, a także surowice anty-penta-PT, anty-penta-TTd, anty-OS-PT, anty-OS-TTd mogą reagować krzyżowo z BOS.

Według doniesień literaturowych *B. pertussis* produkuje polisacharyd mikrokapsularny, zbudowany z kwasu N-acetylogalaktouronowego, który powinien krzyżowo reagować z monoswoistą surowicą skierowaną przeciwko antygenowi Vi.

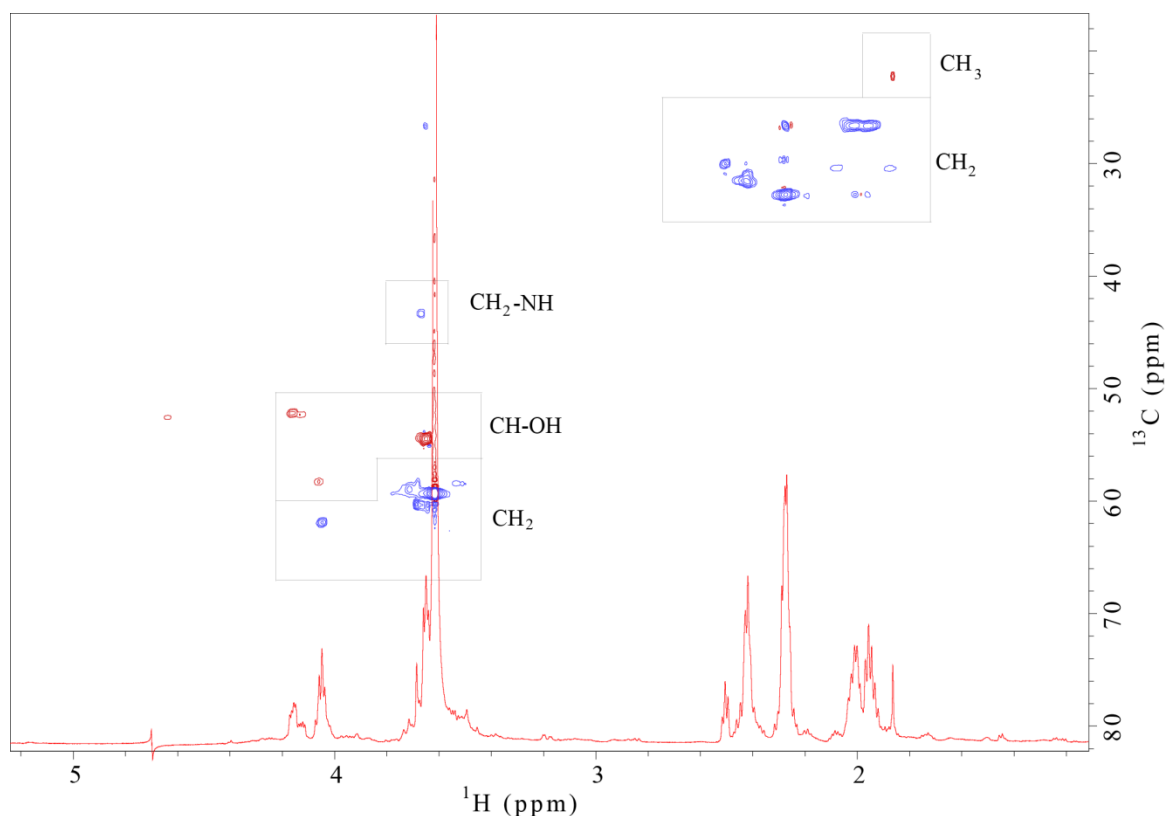
Użycie surowicy anti-Vi miało na celu sprawdzenie czy surowica rozpozna krzyżowo analizowane egzopolisacharydy. Zaobserwowano słabe reakcje krzyżowe dla I i III frakcji. W strukturze BOS obecne są dwie cząsteczki GalNAcAN, które konformacyjnie mogłyby być na tyle podobne do kwasu N-acetylogalaktouronowego, że przeciwciała krzyżowo rozpoznawałyby te reszty cukrowe.

Surowicę zawierającą poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko LPS *P. shigelloides* 78/89 wykorzystano jako surowicę kontrolną. Słaba krzyżowa reakcja dla fr. I zawierającej homopolimery glukozy, może być wynikiem obecności przeciwciał rozpoznających glukany. Surowica ta została wytworzona przez szczepienie zwierząt pełnymi komórkami bakteryjnymi, stąd ewentualna obecność glukanów i możliwość wygenerowania przeciwciał z nimi reagujących.

Aby mieć pewność co do specyficzności reakcji należałoby zastosować surowicę z przeciwciałami skierowanymi przeciwko BOS skoniugowanemu np. z toksoidem tężca.

7.3.2.5. Analiza „kotwicy” lipidowej cząsteczki BOS

BOS został wykryty w medium pohodowlanym, ale nie wiadomo czy jest nietypowym egzooligosacharydem, czy też jest w jakiś sposób związany z powierzchnią komórki bakteryjnej. Jak już wcześniej wspomniano, polisacharyd kapsularny może zostać uwolniony z komórki na skutek niestabilności wiązania pomiędzy częścią polisacharydową CPS, a lipidową kotwicą (Roberts, 1996). W poprzednich rozdziałach skupiono się na analizie cukrowych antygenów, ale na widmach NMR, oprócz sygnałów dla reszt cukrowych, dodatkowo obserwowane są sygnały od grup $-CH$, $-CH_2$ i $-CH_3$, które mogą być elementami kwasów tłuszczowych. Związane z cząsteczką oligocukru mogłyby działać jako kotwica, podobnie do lipidu A. Ze względu na niewielkie różnice w przesunięciach chemicznych i złożoną multipletowość, praktycznie nie można określić z jakiej liczby atomów węgla składałby się taki łańcuch. We frakcji III sygnały od grup $-CH$ $-CH_2$ $-CH_3$ nie są zbyt intensywne. Nie udało się wyizolować frakcji, w której możliwe byłoby wskazanie na połączenia pomiędzy systemami spinowymi BOS, a kotwicą. Na Ryc. 73 przedstawiono fragment widma dalszej frakcji V z rozdziału medium pohodowlanego *B. holmesii*, na którym sygnały od „kwasów tłuszczowych” są silniejsze, natomiast sygnały od BOS są śladowe i nie utrudniają ich obserwacji.



Ryc. 73. Fragment widma $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT z profilem ^1H NMR fr. V z rozdziału chromatograficznego medium *B. holmesii*

Obecność przyłączonych kwasów tłuszczowych tłumaczyłaby dodatkowe powtarzające się pomiędzy gatunkami sygnały na widmach MALDI-TOF MS w zakresie mas 1300-1850 Da (Ryc. 62). Na chwilę pisania pracy, nie udało się jeszcze ustalić ich struktury.

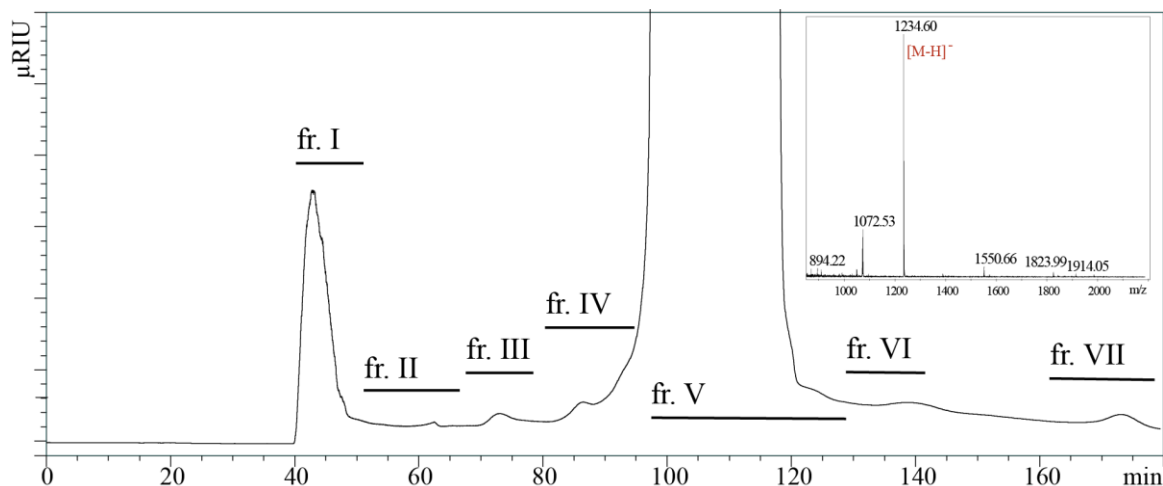
W kolejnych analizowanych frakcjach wzrasta liczba sygnałów od kwasów tłuszczowych, ale również pojawiają się dodatkowe sygnały pochodzące od aminokwasów (Gly, Ala). Dla fr. III pochodzącej z rozdziału medium pochodowlanego *B. holmesii* sygnał pochodzący od glicyny jest bardzo intensywny (δ_{C} 41,3 ppm/ δ_{H} 3,92 ppm), natomiast dla fr. III *B. pertussis* 186 jest praktycznie nieobserwowany. We frakcjach III pomiędzy gatunkami bakterii z rodzaju *Bordetella* można zaobserwować sygnały pochodzące od różnych aminokwasów.

7.4. Nieklasyczne *Bordetellae* – porównawcza analiza egzopolisacharydów

Badania egzopolisacharydów bakteryjnych uzupełniono o gatunki, nienależące do klasycznego "klastra *B. bronchiseptica*". W celach weryfikujących czy BOS jest produkowany przez inne gatunki bakterii z rodzaju *Bordetella* przeprowadzono dodatkowe hodowle *B. petrii* oraz *B. hinzii*. Zliofilizowane pożywki po hodowli

rozdzielano chromatograficznie na kolumnie filtracji żelowej. Zarówno hodowle jak i rozdziały chromatograficzne mediów przeprowadzono zgodnie z procedurami opisanymi dla klasycznych *Bordetellae*.

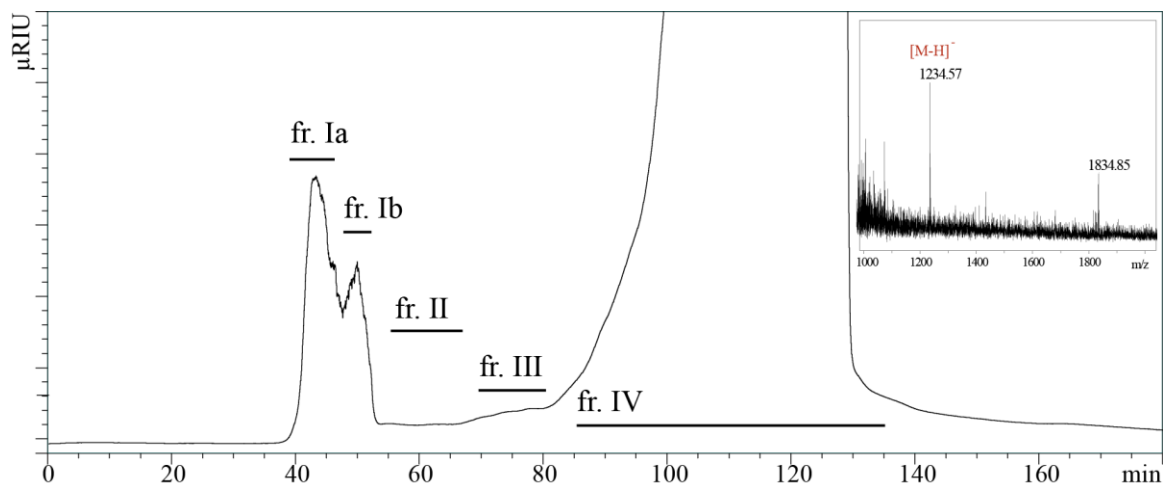
Dla rozdziału chromatograficznego medium pochodzanego *B. petrii* (Ryc. 74) zebrano następujące frakcje o czasach retencji: frakcja I (t_R 40-50 min), frakcja II (t_R 51-69 min), frakcja III (t_R 70-80 min), frakcja IV (t_R 81-97 min), frakcja V (t_R 98-130 min), frakcja VI (t_R 131-140 min) oraz frakcja VII (t_R 160-180 min).



Ryc. 74. Rozdział chromatograficzny medium pochodzanego *B. petrii* rejestrowany refraktometrycznie na kolumnie filtracji żelowej z dodatkowym widmem MALDI-TOF MS dla frakcji III. Widmo uzyskano w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.

Analizy identyfikujące obecność BOS we fr. III przeprowadzono technikami spektroskopii NMR i spektrometrii mas. W widmie MALDI-TOF MS (Ryc. 74) zidentyfikowano główny jon $[M-H]^-$ cząsteczki BOS o m/z 1234,60. Obecność oligosacharydu i podobieństwo składników monosacharydowych potwierdzano wykonując również serię eksperymentów NMR.

Podobnie wyizolowano frakcje z rozdziału chromatograficznego medium pochodzanego *B. hinzii* (Ryc. 75). Wykazują one pewne różnice w stosunku do poprzednich rozdziałów, frakcję I podzielono dodatkowo na frakcje Ia (t_R 40-45 min) i Ib (t_R 45-50 min). Pozostałe frakcje tzn.: frakcja II (t_R 51-65 min), frakcja III (t_R 66-80 min), frakcja IV (t_R 81-135 min) zebrano podobnie jak w poprzednich rozdziałach, mimo braku wyraźnego szczytu dla fr. III.

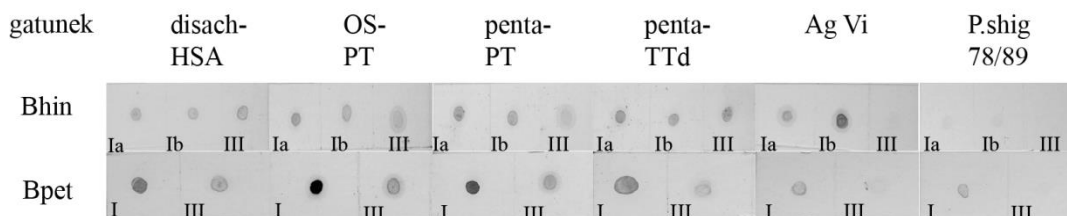


Ryc. 75. Rozdział chromatograficzny medium pochodzącego *B. hinzii* rejestrowany refraktometrycznie na kolumnie filtracji żelowej z dodatkowym widmem MALDI-TOF MS dla frakcji III. Widmo uzyskano w trybie reflektoru polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.

Pomimo prawie niewidocznego szczytu fr. III dla obu przedstawionych rozdzielów *B. hinzii* oraz *B. petrii* udało się potwierdzić obecność BOS o strukturze zgodnej z tą opisaną dla klasycznych *Bordetellae*. U *B. hinzii* i *B. petrii* na widmach NMR fr. III pojawiają się dodatkowe sygnały, również frakcja I wykazuje istotne różnice w porównaniu z poprzednio analizowanymi gatunkami.

Wyizolowane frakcje analizowano serologicznie techniką dot blot, z zastosowaniem tych samych surowic jak w podrozdziale 7.3.2.4. Anty-glikokoniugatowe surowice, reagują krzyżowo z analizowanymi egzopolisacharydami zarówno fr. I, Ia, Ib jak i fr. III. Dla fr. I *B. petrii* obserwowane reakcje krzyżowe są szczególnie intensywne, jednak bez dokładniejszych analiz tej frakcji trudno wyjaśnić przyczynę intensywności reakcji.

królicze surowice poliklonalne zawierające przeciwciała skierowane przeciwko:



Ryc. 76. Analiza serologiczna egzopolisacharydów (frakcja I oraz frakcja III) *B. hinzii* oraz *B. petrii* z surowicami króliczymi z kolekcji laboratorium

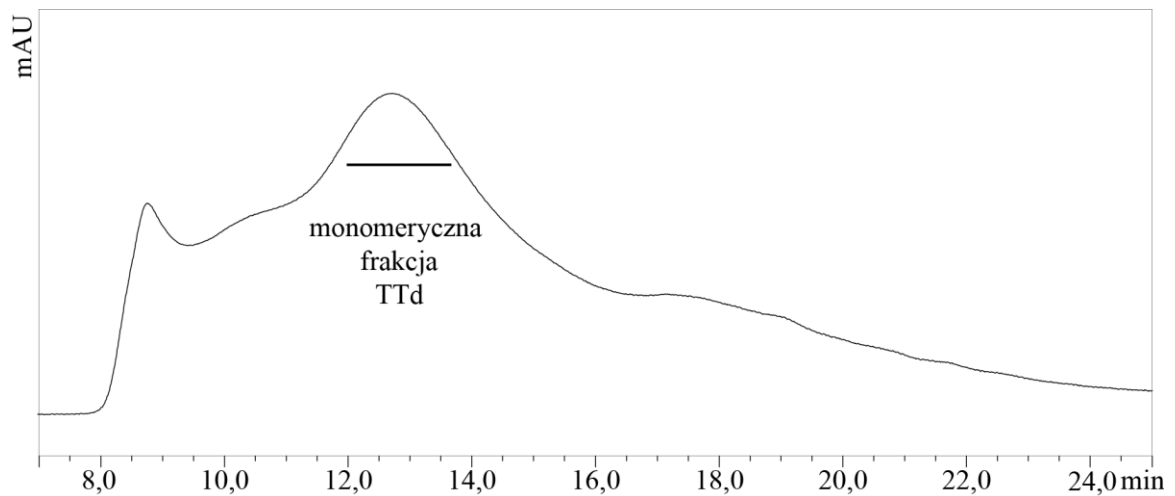
Surowica anty-Vi również reaguje krzyżowo z analizowanymi egzopolisacharydami we fr. I, Ia, Ib ale reakcja dla fr. III jest praktycznie nieobserwowana. Surowicę zawierającą poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko

LPS *P. shigelloides* 78/89 wykorzystano jako surowicę kontrolną i podobnie jak dla fr. I pozostałych gatunków, zawierającej długołańcuchowe glukany, zaobserwowano słabą reakcję krzyżową. Dla fr. III nie zaobserwowano reakcji krzyżowej. Powyższe obserwacje są zgodne z analogicznymi analizami serologicznymi przeprowadzonymi dla bakterii z klastra *B. bronchiseptica*.

7.5. Otrzymywanie i analiza glikokoniugatu BOS z toksoidem tężca

Kolejnym etapem badań nad BOS, była testowa próba otrzymania jego neoglikokoniugatu. Jako białko nośnikowe wybrano powszechnie stosowany toksoid tężca (Biomed, Kraków). W trakcie przechowywania preparatu TTd dochodzi do polimeryzacji białka i przed jego wykorzystaniem należy wyizolować jego monomeryczną formę. Gotowy preparat toksoidu tężca o stężeniu 1,64 mg/ml (2 ml) oczyszczano w systemie HPLC na kolumnie TSKgel G3000SW w PBS (Ryc. 77).

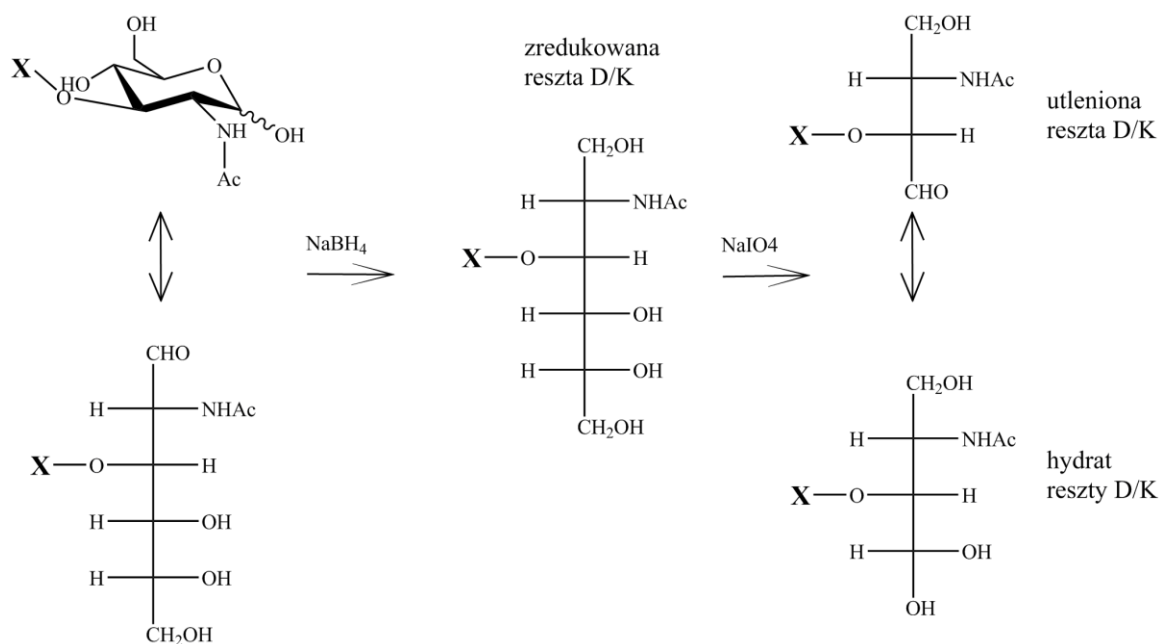
Stężenie głównej frakcji o czasie retencji 12-14 min zawierającej monomeryczny TTd po zagęszczeniu w koncentratorach wirówkowych wyniosło 2,89 mg/ml (350 μ l). Tak oczyszczony preparat białkowy wykorzystano do koniugacji z BOS.



Ryc. 77. Chromatograficzny rozdział preparatu toksoidu tężca (Biomed, Kraków) na kolumnie filtracji żelowej TSK gel G3000SW, pomiar rejestrowano przy długości fali 280 nm

Najpowszechniejszą, stosowaną metodą glikokoniugacji jest reakcja reduktywnej aminacji. Technika ta pozwala na koniugację poli- i oligosacharydów, zawierających w swojej strukturze reaktywne grupy aldehydowe, z białkiem nośnikowym, przy zachowaniu nienaruszonej struktury antygeny cukrowego. Celem uzyskania reaktywnych grup aldehydowych, wicynalne grupy hydroksylowe cząsteczki cukru należy poddać utlenianiu nadjodanem sodu. W BOS wicynalne grupy hydroksylowe zostały utworzone

po przeprowadzeniu reakcji redukcji końca redukującego. Schemat reakcji dla BOS przedstawiono na Ryc. 78. Jako „X” przedstawiono pozostałe cukry. Ostatecznie w wyniku przeprowadzonych reakcji na końcu redukującym powstaje aldotetroza (D-treozą), która w środowisku wodnym tworzy geminalne diole zwane hydratami, których sygnały potem można obserwować na widmach NMR w regionie węgla anomerycznego (δ_C 89,7 ppm, δ_H 4,96 ppm).



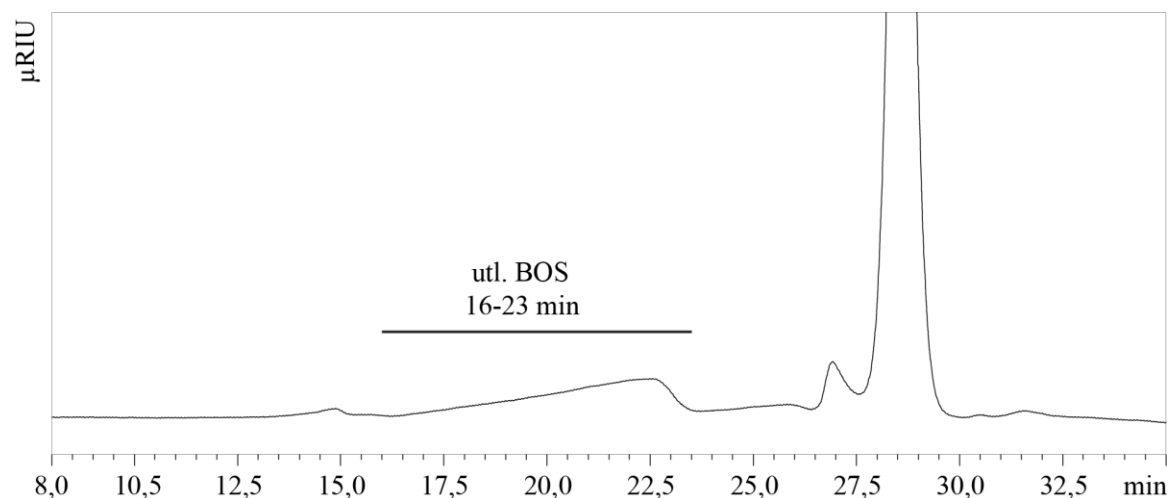
Ryc. 78. Schemat reakcji redukcji oraz utleniania dla BOS.

Przeprowadzono analizę oraz identyfikację redukującego końca, preparatów BOS *B. holmesii* oraz *B. pertussis* 186 (rozd. 7.3.2.2). Zredukowane preparaty BOS *B. holmesii* (0,75 mg) oraz *B. pertussis* 186 (1,75 mg) z wicynalnymi grupami hydroksylowymi, o potwierdzonej strukturze, poddano łagodnemu utlenianiu w obecności 0,1 M nadjodanu sodu. Utlenione oligocukry z reaktywną grupą aldehydową oczyszczano przy użyciu systemu HPLC na kolumnie typu TSKgel G3000PW (Ryc. 79). Po rozdziale odzyskano 0,23 mg utlenionego BOS *B. holmesii* oraz 1 mg utlenionego BOS *B. pertussis* 186.

Zebrane frakcje analizowano techniką spektroskopii NMR. Na Ryc. 80 przedstawiono fragment widma ¹H,¹³C HSQC-DEPT, na którym zidentyfikowano sygnał o przesunięciach chemicznych charakterystycznych dla hydratu reszty D/K (Tabela 19). Na podstawie przesunięć chemicznych utleniony BOS zidentyfikowano we frakcji o czasie retencji 16-23 min. Pozostałe frakcje zawierały małe ilości utlenionego BOS

WYNIKI

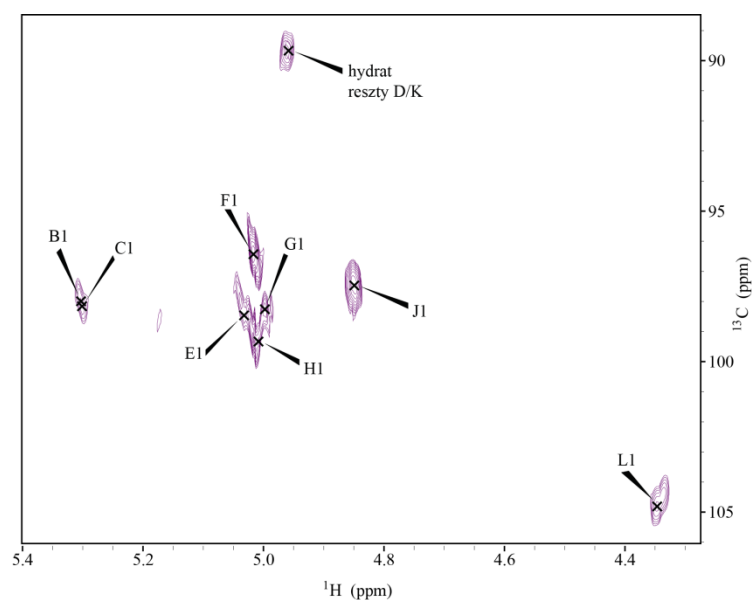
zanieczyszczonego związkami, których sygnały pochodzące od grup $-CH-$, $-CH_2$ i $-CH_3$ tworzą systemy spinowe przypominające te od kwasów tłuszczowych



Ryc. 79. Rozdział chromatograficzny BOS *B. pertussis* 186 po utlenianiu 0,1 M $NaIO_4$ na kolumnie filtracji żelowej TSK gel G3000PW (pomiar rejestrowano refraktometrycznie).

Tabela 19. Przesunięcia chemiczne utlenionej reszty D/K

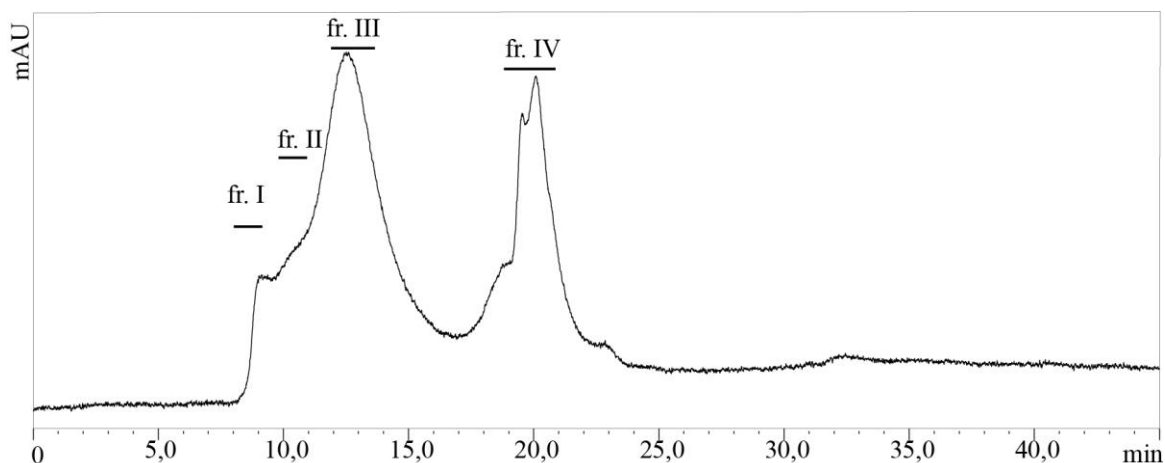
Reszta	Przesunięcia chemiczne [ppm]			
	C1	C2	C3	C4
	H1	H2	H3	H4
hydrat	89,7	78,8	48,4	62,34
D/K	4,96	3,73	4,36	4,15



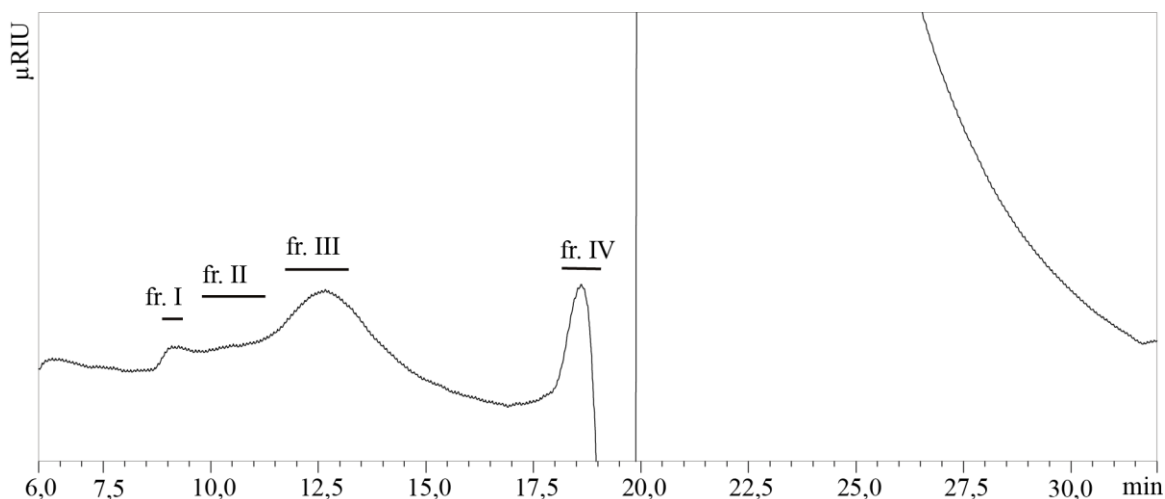
Ryc. 80. Region anomeryczny widma $^1H, ^{13}C$ HSQC-DEPT NMR utlenionego BOS *B. pertussis* 186

Utlenione preparaty BOS *B. holmesii* (0,23 mg) oraz BOS *B. pertussis* 186 (1 mg) były strukturalnie identyczne, dlatego zostały połączone i inkubowane z monomeryczną frakcją TTd (1 mg, 0,3 ml) w obecności $NaBCNH_3$. W 0,2 M buforze boranowym o pH 9

nadmiar molowy oligocukru do białka wyniósł ~ 150 . Mieszaninę reakcyjną po 14-dniowej inkubacji oczyszczano w systemie HPLC na kolumnie TSKgel G3000SW w PBS. Zebrano frakcje o czasach retencji 8-9,5 min (fr. I), 10-11,5 min (fr. II), 12-15,5 min (fr. III) oraz 16-23 (fr. IV). Postęp rozdziału monitorowano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 280$ nm oraz refraktometrycznie. Aby można było zaobserwować szczyty dla glikokoniugatów, które są mniej intensywne niż eluowane z kolumny sole o t_R 20-30 min, rozdział rejestrowany przez refraktrometr przedstawiono w powiększeniu.



Ryc. 81. Izolacja glikokoniugatu BOS-TTd zastosowaniem filtracji żelowej na kolumnie TSK gel G3000SW. Profil chromatograficzny rejestrowano przez pomiar absorbancji przy 280 nm

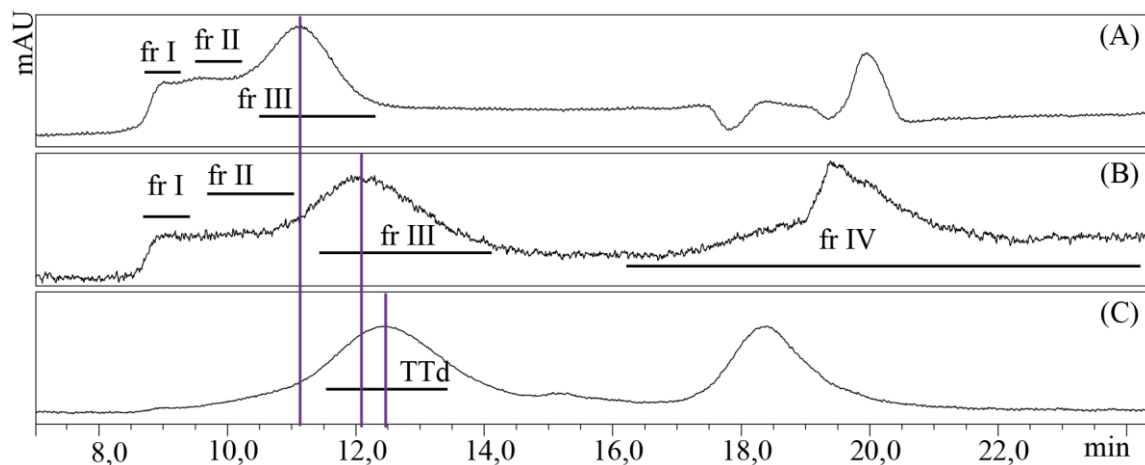


Ryc. 82. Izolacja glikokoniugatu BOS-TTd z zastosowaniem filtracji żelowej na kolumnie TSK gel G3000SW. Profil chromatograficzny rejestrowano refraktometrycznie

Ze względu na niewielką ilość materiału ($\sim 180\mu\text{l}$) i obecność nietypowych cukrów w preparacie, nie było możliwości oznaczenia zawartości cukrów metodą fenolową. Wyznaczono jedynie stężenie TTd w poszczególnych frakcjach na podstawie wartości absorbancji przy długości fali $\lambda = 280$ nm: fr. I-0,26 mg/ml ($180\mu\text{l}$), fr. II-0,86

mg/ml (180 μ l), fr. III-2,64 mg/ml (200 μ l), fr. IV-1 mg/ml (180 μ l). Nie pozwoliło to jednak na ustalenie stopnia podstawienia TTd przez oligocukier.

Kolumna TSK gel G3000SW jest rutynowo używana do oczyszczania glikokoniugatów tj. penta-TTd i OS-TTd. Na Ryc. 83 zestawiono profile rozdzielności chromatograficznych glikokoniugatów penta-TTd i BOS-TTd, którego masa cząsteczkowa jest porównywalna z koniugatem penta-TTd oraz zebranej wcześniej monomerycznej frakcji TTd. Na przedstawionych chromatogramach główna frakcja TTd ma t_R 12,5 min. Dla koniugatów obserwujemy przesunięcie w czasie retencji głównej frakcji, dla BOS-TTd t_R 12,1 min, a penta-TTd t_R 11,2 min. Przesunięcie t_R głównej frakcji, dla BOS-TTd świadczy o tym, że doszło do podstawienia białka nośnikowego przez oligocukier. Dla koniugatu penta-TTd to przesunięcie jest bardziej znaczące, co wskazuje na większe podstawienie nośnika oligocukrem.



Ryc. 83. Porównanie profili elucji glikokoniugatów penta-TTd (A), BOS-TTd (B) oraz monomerycznej frakcji TTd (C) na kolumnie filtracji żelowej, przy długości fali 280 nm

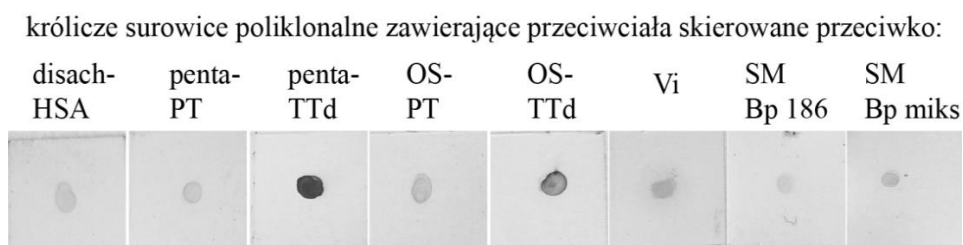
Możliwości przeprowadzenia analiz serologicznych były ograniczone brakiem monoswoistej surowicy skierowanej przeciwko BOS. Nowy glikokoniugat BOS-TTd analizowano technikami immunoenzymatycznymi wykorzystując dostępne w kolekcji laboratorium królicze surowice poliklonalne opisane w rozdziale „Materiały i metody” (podrozdział. 6.3.1):

- anty-penta-PT
- anty-OS-PT
- anty-OS-TTd
- anty-penta-TTd
- anty-Vi
- anty-disacharyd-HSA

WYNIKI

Kontrolę reaktywności anty-glikokoniugatowych króliczych surowic poliklonalnych, stanowiły glikokoniugaty penta-PT, OS-PT OS-TTd, penta-TTd oraz disacharyd-HSA (rozdz. 7.2.2).

W układzie homologicznym dla glikokoniugatu penta-TTd surowica zawierająca poliklonalne przeciwciała przeciwko koniugatowi penta-TTd reaguje z fr. I, II, III, natomiast w układzie częściowo heterologicznym surowica zawierająca poliklonalne przeciwciała przeciwko koniugatowi penta-PT reaguje krzyżowo z fr. I i II rozpoznając fragment cukrowy. Dla fr. III nie zaobserwowano reakcji. Glikokoniugaty o największym podstawieniu oligocukrem zidentyfikowano we fr. I i II. W analizach serologicznych koniugatu BOS-TTd (Ryc. 84) przedstawiono wyniki uzyskane dla fr I, w której podstawienie nośnika białkowego przez oligocukier jest największe.



Ryc. 84. Dot blot glikokoniugatu BOS-TTd (fr. I) z wybranymi surowicami

W teście dot blot (Ryc. 84) surowice z przeciwciałami skierowanymi przeciwko koniugatowi, w których antygenem białkowym jest toksoid tężca (anty-penta-TTd i anty-OS-TTd) reagują krzyżowo z glikokoniugatem BOS-TTd. Potwierdza to obecność w badanym preparacie nośnika białkowego (TTd). Pozostałe surowice anty-glikokoniugatowe również reagują, ale znacznie słabiej. Zawierają przeciwciała o swoistościach innych niż TTd (nośnikiem białkowym jest PT), a ich krzyżowa reaktywność z BOS związana jest z obecnością podobnych elementów w rozpoznawanych oligocukrach lub ich fragmentach. Obserwowane reakcje krzyżowe surowic anty-disach-HSA, anty-OS-PT oraz anty-penta-PT o znanych swoistościach może wywoływać obecna w BOS terminalna GlcNAc. Krzyżowo reagują również surowice zawierające przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym *B. pertussis* 186 i mieszaninie szczepów. Reakcję krzyżową zaobserwowano także dla surowicy anty-Vi dla powierzchniowego antygeny Vi, która rozpoznaje GalNAcA, który w BOS podstawiony jest dodatkowo przez grupę amidową na węglu karbonylowym (GalNAcAN) i który może być rozpoznawany przez pewną pulę

przeciwciał. Zaprezentowane wyniki sugerują, że BOS może być jednym z antygenów powierzchniowych bakterii z rodzaju *Bordetella*.

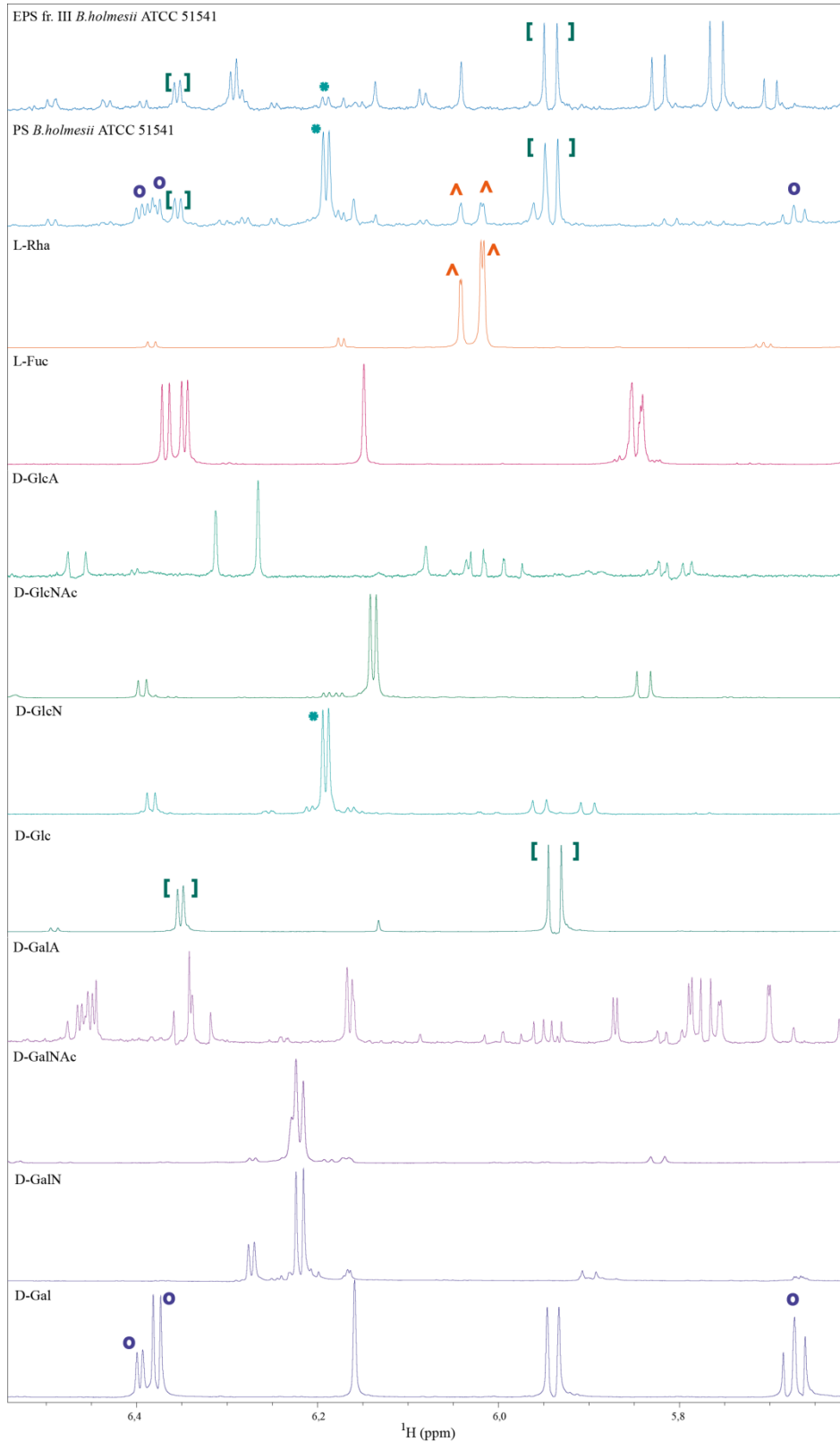
Pełna analiza właściwości antygenowych i podobieństwa do innych antygenów cukrowych *Bordetellae* wymaga przeprowadzenia immunizacji zwierząt i uzyskania przeciwciał rozpoznających BOS. Uzyskanie poliklonalnych surowic z przeciwciałami skierowanymi przeciwko BOS jest w planach.

7.6. Ustalanie absolutnej konfiguracji składników cukrowych techniką spektroskopii NMR

Absolutną konfigurację składników cukrowych PS *B. holmesii* oraz BOS próbowano potwierdzić metodą opisaną przez Yorka i wsp. Jest to metoda pozwalająca analizować obecność poszczególnych reszt cukrowych w konfiguracji D i L techniką NMR, w preparatach poli- i oligosacharydowych po ich przekonwertowaniu w pochodne z odpowiednim chiralnym reagentem. Polisacharydy poddano hydrolizie 2 M TFA i uzyskane monosacharydy przeprowadzono w pochodne *O*-(*S*)-2-metylomaślanu, a następnie analizowano ich absolutną konfigurację metodą spektroskopii ¹H NMR (York i in., 1997). Jako standardy zastosowano dostępne monosacharydy szeregu D, które najczęściej są składnikami polisacharydów bakteryjnych D-Gal, D-GalN, D-GalNAc, D-GalA, D-Glc, D-GlcN, D-GlcNAc, D-GlcA oraz cukry szeregu L L-Glc, L-Rha i L-Fuc. W swojej kolekcji laboratorium nie posiada jeszcze wszystkich standardów, dlatego analiza pochodnych cukrów nie może być kompletna. Do pełnej analizy brakuje przede wszystkim standardów szeregu L. Przy odpowiednio rozbudowanej kolekcji standardów metoda ta jest szybsza niż klasyczne analizy cukrowe i metylacyjne (maksymalnie 2 dni). Dodatkowo próbki rozpuszczone są w deuterowanym acetonie, więc każde widmo posiada wewnętrzny kalibrant (aceton-d₅, δ 2,050).

Pewnym utrudnieniem w tego rodzaju analizach jest dostęp do mniej „popularnych” monosacharydów. Najczęściej identyfikowane cukry jak D-Glc, D-Gal, D-GlcNAc czy D-GlcNAc są w miarę łatwo dostępne, natomiast trudniej jest uzyskać L-Glc, L-Gal, czy ich aminowane lub N-acetylowane formy. Dla nietypowych cukrów jak GalNAcAN czy GlcNAcA, nie istnieją komercyjnie dostępne standardy, dlatego nie było możliwości potwierdzenia tak nietypowych reszt w strukturze BOS. Dodatkową trudnością jest również złożoność polisacharydów. Większe zróżnicowanie w strukturze, powoduje nakładanie się sygnałów, co komplikuje analizy.

WYNIKI



Ryc. 85. Porównanie profili widm NMR w zakresie 5,5-6,5 ppm dla *O*-(*S*)-2-metylomaślanowych pochodnych standardów cukrowych oraz PS *B. holmesii* i egzopolisacharydowej fr. III *B. holmesii*. Znaki „^o”, „*”, „^” wskazują które sygnały ze standardów można zidentyfikować w polisacharydach. Sygnały dla standardu D-Glc „[]” mają podobny profil do profili polisacharydów, ale wartości przesunięć różnią się.

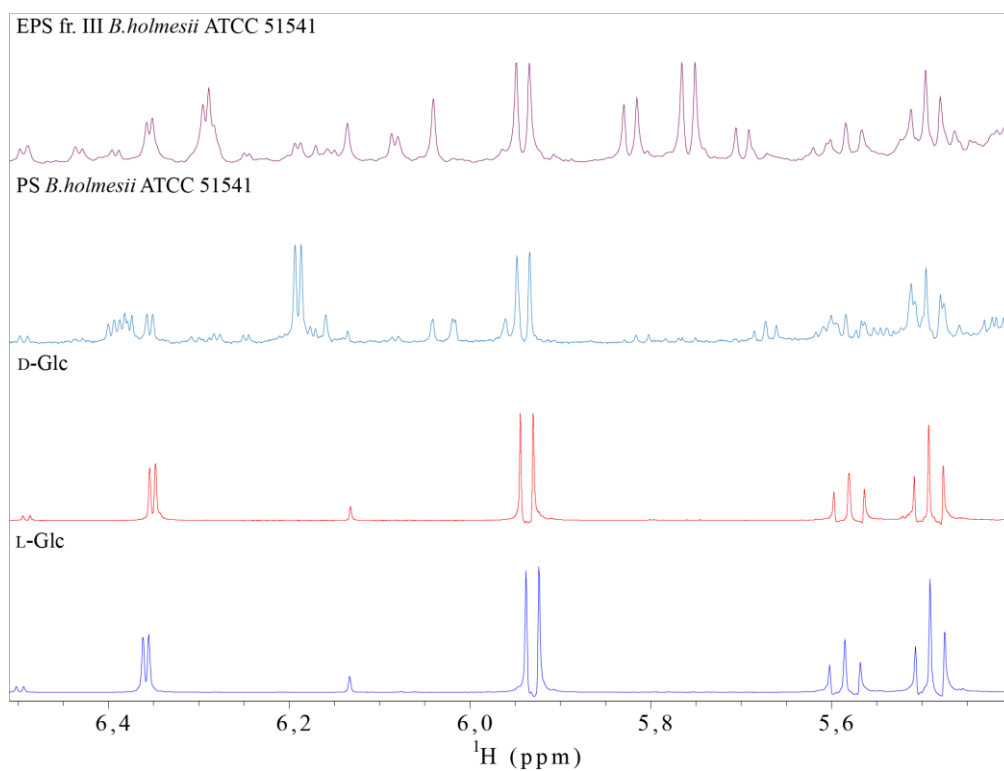
Na Ryc. 85 zaprezentowano profile jednowymiarowych widm ^1H NMR egzopolisacharydowej frakcji III z *B. holmesii* ATCC 51541, PS *B. holmesii* ATCC 51541 oraz wybranych standardów przeprowadzonych w pochodne *O*-(*S*)-2-metylomaślanu.

Na podstawie porównywania profili widm ^1H NMR oraz przesunięć chemicznych opisanych dla standardów w analizowanych próbkach dla PS *B. holmesii* ATCC 51541 możliwe było potwierdzenie obecności L-Rha oraz D-Gal. Stwierdzono także obecność pochodnej D-GlcN. N-acetylowane aminocukry w polisacharydach poddanych hydrolizie stężonymi kwasami tracą podstawienie grupą acetylową. Dlatego profil jednowymiarowego widma ^1H NMR polisacharydu, w którego strukturze obecny jest HexNAc będzie przypominał profil widma monosacharydu niepodstawionego przez grupę acetylową, co jest zgodne z danymi NMR wskazującymi na obecność GlcNAc w preparacie. W profilu widma ^1H NMR egzopolisacharydowej fr. III, która zawiera BOS oraz glukany również zidentyfikowano D-GlcN, która utraciła podstawioną grupę acetylową na skutek hydrolizy.

Na podstawie przeprowadzonych analiz techniką spektroskopii NMR oraz analiz cukrowych i metylacyjnych w obu preparatach zidentyfikowano D-Glc. Jednak na podstawie analiz przeprowadzonych metodą opisaną przez Yorika i wsp. w profilach jednowymiarowych widm ^1H NMR nie udało się jednoznacznie zidentyfikować Glc ani w konfiguracji D, ani konfiguracji L. W profilach widm PS *B. holmesii* i egzopolisacharydowej fr. III można zidentyfikować sygnały charakterystyczne dla standardów glukozy (Ryc. 86), ale wartości przesunięć chemicznych tych sygnałów różnią się zarówno w stosunku do D-Glc (Δ 0,005 ppm) jak i L-Glc (Δ 0,010 ppm).

Profile jednowymiarowych widm ^1H NMR dwóch standardów D-Glc oraz L-Glc są podobne. Można je odróżnić i określić absolutną konfigurację na podstawie różnych wartości przesunięć chemicznych poszczególnych sygnałów (Δ 0,006 ppm). Odpowiednio rozbudowana kolekcja standardów pozwoli szybciej ustalić absolutną konfigurację cukrów.

WYNIKI



Ryc. 86. Porównanie profili widm NMR w zakresie 5,5-6,5 ppm dla O-(S)-2-metyloakrylanowych pochodnych PS *B. holmesii* ATCC 51541, egzopolisacharydowej fr. III *B. holmesii* ATCC 51541, D-Glc oraz L-Glc

8. DYSKUSJA

Tradycyjnie krztusiec uważany jest za chorobę wieku dziecięcego, której czynnikiem etiologicznym jest bakteria *B. pertussis*. Objawem patognomicznym jest długotrwały kaszel przypominający pianie koguta wywołujący wymioty. W cięższym przebiegu infekcja pałeczką krztuśca prowadzi do zapalenia płuc, zaburzeń oddychania, bezdechu i nagłej śmierci szczególnie wśród niemowląt (Heininger, 2010). W latach 50. ubiegłego wieku w Polsce na krztusiec corocznie chorowało ok. kilkadziesiąt tysięcy dzieci. W 1950 zachorowało 22 006 dzieci, z czego 1 580 zmarło. Rok 1960 był rekordowy pod względem zachorowań, zdiagnozowano 95 968 przypadków. Wprowadzenie szczepionki pełnokomórkowej DTwP oraz obowiązku szczepień okazało się skuteczną metodą zapobiegania zakażeniom. Zaobserwowano znaczący spadek zachorowalności do poziomu ok. 200 przypadków rocznie (Paradowska-Stankiewicz i Augustynowicz, 2020). Obecnie pomimo powszechności szczepień ochronnych obserwuje się wzrost zachorowań na krztusiec. Zachorowania dotyczą nie tylko najbardziej wrażliwej grupy noworodków, ale również zaszczepionych nastolatków i dorosłych. Wprowadzenie szczepień wywołało przesunięcie wieku zachorowań. Częściej chorują dzieci poniżej 6 miesięcy życia, które nie przeszły jeszcze pełnego cyklu szczepień (McNabb i in., 2007). Zalecane jest szczepienie kobiet w ciąży i osób z najbliższego otoczenia noworodka, aby ograniczyć transmisję bakterii. Krztusiec przestał być jedynie chorobą wieku dziecięcego. Jedną z przyczyn wzrostu zachorowań jest zastąpienie szczepionki pełnokomórkowej, szczepionką bezkomórkową DTaP. Okres ochrony szczepionki bezkomórkowej jest krótszy, niż pełnokomórkowej. Zachorowania nastolatków i dorosłych powiązane są z czasem, który upłynął od ostatniej dawki szczepionki. Dorośli, u których minął okres ochrony, są źródłem transmisji bakterii i przenoszą je na niemowlęta. Zamiana szczepionki DTwP na szczepionkę DTaP, ma jeszcze jeden efekt. Ograniczenie liczby antygenów z ponad 3000 do maksymalnie 5 białkowych antygenów pałeczki krztuśca wywołało u bakterii dryf antygenowy (Cherry, 2019). U szczepów dzikich podlegających dryfowi zmianie uległy zarówno struktury, liczba jak i ilość bakteryjnych antygenów stosowanych w szczepionkach. Zaczynają dominować szczepy niewytwarzające większości białkowych czynników wirulencji obecnych w szczepionkach DTaP (Pawloski *et al.* 2014, Polak *et al.* 2018). Nie bez znaczenia jest również spadek akceptacji dla szczepień wśród społeczeństwa, co

przekłada się na zmniejszenie stanu zaszczepienia populacji przeciw krztuścowi (Paradowska-Stankiewicz i Augustynowicz, 2020).

Obecna definicja krztuśca różni się od tej sprzed 70 lat. Nowoczesne metody badawcze pozwoliły zidentyfikować gatunki, wywołujące chorobę o identycznych objawach, ale o mniejszym nasileniu, przez co mogą być trudniejsze w rozpoznaniu. Za zdecydowaną większość zdiagnozowanych przypadków krztuśca odpowiada *B. pertussis*, ale na drugie miejsce przebija się *B. holmesii*, natomiast *B. parapertussis* plasuje się na trzecim miejscu. Niewielka część przypadków to zakażenia mieszane (Mir-Cros i in., 2017; Njamkepo i in., 2011; Rodgers i in., 2013; Valero-Rello i in., 2019). *B. holmesii* jest dosyć ciekawą bakterią ponieważ nie jest typowym przykładem patogennych ssaczych *Bordetellae*. Jest blisko spokrewniona z *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* (Weyant i in., 1995), ale wyewoluowała od ptasich *Bordetellae* (Diavatopoulos i in., 2006). Do ludzkiego gospodarza przystosowała się stosunkowo niedawno (Linz i in., 2016). *B. holmesii* mogła uzyskać zdolność do wywoływania parakrztuśca poprzez horyzontalny transfer genów od *B. pertussis* (Harvill *et al.* 2014). Z bakterii wywołującej początkowo jedynie zakażenia u pacjentów immunosupresorowych, szybko została, drugą pod względem częstości diagnozowania, bakterią wywołującą krztusiec. *B. holmesii* jest czynnikiem etiologicznym krztuśca, ale nie produkuje większości antygenów białkowych takich jak PT, FHA, PRN i FIM, które są składnikami szczepionek DTaP. Powszechnie dostępne szczepionki przeciwkrztuścowe nie zapewniają ochrony przeciwko *B. holmesii* (Zhang i in., 2012). Muszą zatem istnieć inne, jeszcze nie zidentyfikowane czynniki wirulencji, które odpowiadają za rozwój krztuśca.

WHO pod koniec lat 90. zakwalifikowała krztusiec jako jedną z nawracających chorób o potencjale epidemiologicznym (WHO, 2017). Próby wprowadzenia nowych szczepionek przeciwkrztuścowych, świadczą o tym, że istnieje potrzeba stworzenia takiej szczepionki, która indukowałaby skuteczną i długotrwałą odporność. Z jednej strony poszukiwane są nowe powierzchniowe antygeny białkowe (Luu i in., 2020), a z drugiej strony obserwuje się trend odchodzenia od ściśle zdefiniowanych szczepionek acellularnych, w kierunku szczepionek opartych o pełne komórki bakteryjne (Dias i in., 2013; Lochter i in., 2017). Skupiono się na modyfikacjach, wciąż wykorzystywanej w wielu krajach, w tym także w Polsce, szczepionki pełnokomórkowej. Brazylijska szczepionka „Plow” po chemicznym usunięciu najbardziej reaktogennego antygeny LPS, zachowała podobny poziom immunogenności i ochrony poszczepiennej przy jednocześnie mniejszej reaktogenności w porównaniu ze szczepionką DTwP (Dias i in.,

2017). Inną perspektywą, która ma duże szanse okazać się sukcesem, wykazali się Locht i wsp. zmieniając sposób podania szczepionki na donosowy i genetycznie modyfikując bakterie, aby obniżyć poziom wytwarzanych egzotoksyn (Locht i in., 2017). Jednak w walce z krztuścem, potrzebna jest nie tylko neutralizacja egzotoksyn, ale również bakteriobójczość przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym. W Australii, skupiono się na udoskonaleniu szczepionki DTaP, poszukując nowych antygenów szczepionkowych. Dla *B. pertussis* zidentyfikowano 22 białka powierzchniowe, które mogą zostać potencjalnymi składnikami szczepionek (Luu i in., 2020). Przyjęte rozwiązania skupiają się jedynie na ochronie przed *B. pertussis*, ale nie biorą pod uwagę pozostałych bakterii z rodzaju *Bordetella*, które również są czynnikami etiologicznymi krztuśca, a które jak *B. holmesii* nie posiadają wspólnych antygenów białkowych. Zidentyfikowanie wspólnych elementów w strukturach antygenów powierzchniowych bakterii z rodzaju *Bordetella* pozwoliłoby na projektowanie bardziej uniwersalnych szczepionek zdolnych do wywołania ochrony nie tylko przed infekcjami *B. pertussis*.

Nasze podejście skupia się na pomijanych antygenach cukrowych. Jednym z czynników wirulencji, który nie wchodzi w skład szczepionki bezkomórkowej, a jest głównym antygenem powierzchniowym, obecnym u wszystkich bakterii wywołujących krztusiec jest endotoksyna. LOS *B. pertussis* składa się z lipidu A, oligosacharydu rdzenia oraz dystalnego trójcukru stanowiącego jedną podjednostkę oligosacharydową (Caroff i in., 2000). LOS *B. pertussis* pozbawiony jest typowego antygeny O, dlatego wspólnych elementów strukturalnych wśród *Bordetellae* poszukiwano początkowo w najbardziej stabilnym ewolucyjnie oligosacharydzie rdzenia. W pełnej formie OS *B. pertussis* jest rozgałęzionym dodekasacharydem o rzadko spotykanej strukturze, w której immunodominującym fragmentem jest dystalny trójcukier. W zależności od źródła literaturowego dystalny trójcukier traktowany jest jako pojedyncza podjednostka antygeny O (Caroff i in., 2000) lub jako część OS rdzenia (Preston i in., 2006). LOS jest antygenem T- niezależnym oraz dodatkowo jest toksyczny i reaktogeny, dlatego nie jest brany pod uwagę jako antygen szczepionkowy. Jednak wyizolowane z LOS oligosacharydy nie są toksyczne, a skoniugowane z białkiem nośnikowym stają się antygenami T-zależnymi. W przeprowadzonych wcześniej badaniach neoglikokoniugaty oparte o oligosacharydy wyizolowane z *B. pertussis* 186 spełniają kryteria składników szczepionki przeciwkrztuścowej (Koj i in., 2015; Niedziela i in., 2005). Ponieważ lipooligosacharyd *B. pertussis* jest składnikiem ewolucyjnie stabilnym, jego fragmenty

oligocukrowe są odpowiednie dla poszukiwań wspólnych antygenów szczepionkowych wśród lipopolisacharydów pozostałych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Zidentyfikowanie oraz wyizolowanie wspólnego elementu w strukturach LPS *Bordetellae* byłoby pierwszym krokiem do stworzenia neoglikokoniugatu, który mógłby zostać składnikiem szczepionki przeciwkrztuścowej, zapewniającej ochronę przed pozostałymi gatunkami wywołującymi parakrztusiec (*B. holmesii*, *B. parapertussis*) oraz choroby układu oddechowego (*B. bronchiseptica*). W drogach oddechowych pałeczka krztuśca rozwija się przez 3 tygodnie przed pojawieniem się pierwszych objawów napadowego kaszlu (WHO, 2014). Przeciwciała rozpoznające powierzchniowe struktury szybciej eliminowałyby bakterie z układu oddechowego, uniemożliwiając jego kolonizację przez chorobotwórcze patogeny.

Struktury LPS dla opisanych, wybranych szczepów klasycznych *Bordetellae* są znane i wśród nich można zaobserwować pewne wspólne elementy strukturalne. W zaprezentowanej pracy skonfrontowano dane literaturowe dotyczące poznanych struktur oligosacharydów rdzenia z danymi uzyskanymi po przeprowadzeniu badań strukturalnych LOS/ LPS dla szczepów *B. pertussis* 186 i 606, *B. parapertussis* 529 oraz *B. bronchiseptica* 530 i 1943. Dla analizowanych szczepów pojawiły się niewielkie różnice, w stosunku do źródeł literaturowych.

Porównawcze analizy heteropolisacharydów i oligosacharydów wyizolowanych z LOS/ LPS przeprowadzono technikami spektroskopii NMR. LPS izolowano metodą ekstrakcji wodno-fenolowej według Westphala i Janna (Westphal i Jann, 1965). Otrzymany LPS poddawano łagodnej hydrolizie 1,5% kwasem octowym, a produkty reakcji rozdzielano na kolumnie filtracji żelowej. Uzyskane frakcje poli- i oligosacharydowe analizowano rejestrując widma NMR. Analizy prowadzono w łagodnych warunkach, aby zachować natywną strukturę PS i OS i zminimalizować niebezpieczeństwo zmian w strukturach podczas preparacji, ale mimo wszystko w kwasowych warunkach dochodzi do powstania różnych form Kdo. Obecność różnych form Kdo powoduje, że na widmach NMR pojawia się więcej sygnałów, ponieważ zmieniło się otoczenie bezpośrednio związanych reszt cukrowych, które mają inne przesunięcia chemiczne na końcu redukującym. Najbardziej obszerne wyniki dotyczące struktur LPS *B. bronchiseptica* i *B. parapertussis* opisano w pracy Prestona i wsp., którzy stosowali bardziej agresywne metody izolacji polisacharydów. Przeprowadzali wielogodzinną hydrolizę LPS w 2% kwasie octowym, LPS poddawano również hydrolizie w kwasie fluorowodorowym przez 1 h lub 24 h oraz deaminacji (Preston i in.,

2006). W takich warunkach może dochodzić do niekontrolowanej degradacji natywnego PS.

Początkowo antygen O dla klasycznych *Bordetellae* zdefiniowano jako homopolimer kwasu 2,3-diacetamido- α -L-2,3-dideoksygalaktouronowego (Di Fabio i in., 1992). Dla *B. parapertussis* twierdzenie pozostaje prawdziwe, ale po przeanalizowaniu łańcucha O-swoistego dla czterech szczepów *B. bronchiseptica* wyróżniono 3 typy O-PS (Buboltz i in., 2009; Preston i in., 2006; Vinogradov i in., 2010). W trakcie analiz heteropolisacharydów *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* zidentyfikowano również dodatkowy pentasacharydowy fragment łączący polisacharyd O-swoisty z OS rdzenia (Preston i in., 2006).

Dla *B. bronchiseptica* ustalono, że oligosacharyd rdzenia jest dodekasacharydem zawierającym dystalny trójcukier (Preston i in., 2006). Na podstawie danych literaturowych spodziewano się typowej budowy LPS dla szczepów *B. bronchiseptica* posiadanych w kolekcji laboratorium. Brak łańcucha O-swoistego okazał się zaskoczeniem. Zarówno szczep *B. bronchiseptica* 530 jak i *B. bronchiseptica* 1943 są szczepami szorstkimi. Wyizolowane LPS rozdzielano elektroforetycznie i inkubowano ze swoistymi surowicami rozpoznającymi pełną strukturę OS *B. pertussis* 186 (surowica anty-OS-PT), jej terminalny pentasacharydowy fragment, którego immunodominującym epitopem jest dystalny trójcukier (surowice anty-penta-PT i anty-penta-TTd) oraz terminalny dwucukrowy epitop dystalnego trójcukru (surowica anty-disach-HSA). LPS *B. bronchiseptica* 530 i 1943 w analizach serologicznych nie reaguje z surowicami anty-penta-PT, anty-penta-TTd i anty-disach-HSA, a z surowicą zawierającą poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko pełnej cząsteczce OS rdzenia reaguje bardzo słabo, co jest potwierdzeniem obecności krótkiego rdzenia i braku kluczowych reszt cukrowych w strukturze. Porównując zarejestrowane widma $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT głównych oligosacharydowych frakcji do znanych struktur rdzenia szczepów *B. pertussis* 186 i *B. pertussis* 606 ustalono, że najmniejszy wspólny OS rdzenia jest heptasacharydem pozbawionym α -D-GlcpN oraz terminalnej α -D-Hepp. W analizowanych strukturach nie zidentyfikowano również dystalnego trójcukru.

Według pracy Prestona i wsp. rdzeń *B. parapertussis* częściowo pozbawiony jest α -D-GalpNA oraz terminalnej L- α -D-Hepp (Ryc. 5). Wykazali również, że dystalny trójcukier jest zupełnie nieobecny. Jako jedną z możliwości wskazano mutację punktową w genie *wlbH*, którego produkty biosyntezy odpowiedzialne są za przyłączenie dystalnego trójcukru do OS rdzenia. Nie zaobserwowano jednak braku genu *wlbH* ani

produktów jego biosyntezy u analizowanych szczepów *B. parapertussis*, więc kwestia przyczyny nieobecności dystalnego trójcukru pozostaje nierozstrzygnięta. O nieobecności dystalnego trójcukru świadczy również brak charakterystycznego prążka A (wolnowędrująca forma dodekasacharydu z lipidem A) w rozdziale elektroforetycznym, ale w pracy nie umieszczono ryciny z rozdziału analizowanych LPS. Przeprowadzając hydrolizę w kwasie fluorowodorowym autorzy zidentyfikowali natomiast dodatkowy pentasacharydowy fragment, który łączy antygen O z α -D-GlcN rdzenia (Preston i in., 2006).

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych analizach heteropolisacharydu *B. parapertussis* 529 różnią się w stosunku do powyższych danych literaturowych. W analizach serologicznych krzyżowe reakcje LPS *B. parapertussis* 529 z surowicą zawierającą poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko pełnej strukturze OS rdzenia *B. pertussis* 186 są słabe, ale krzyżowe reakcje z surowicą zawierającą przeciwciała rozpoznające terminalny dwucukrowy epitop oraz terminalny pentasacharydowy fragment zawierający dystalny trójcukier potwierdzają obecność immunodominującego epitopu w strukturze OS *B. parapertussis* 529, wbrew danym opublikowanym przez Prestona i wsp. Na podstawie porównań zarejestrowanych widm ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT dla dwóch głównych frakcji OS *B. parapertussis* 529 do znanych struktur rdzenia szczepów *B. pertussis* 186 i 606 zidentyfikowano dwie formy OS. Na widmach NMR we frakcji, o t_R zbliżonym do t_R dodekasacharydu *B. pertussis* 186 zidentyfikowano terminalną L- α -D-Hepp, α -D-GalpNA oraz słabe sygnały od dystalnego trójcukru. Na widmach NMR zarejestrowanych dla frakcji o t_R odpowiadającemu nonasacharydowi *B. pertussis* 606 również zidentyfikowano terminalną L- α -D-Hepp, ale sygnały pochodzące od dystalnego trójcukru oraz reszty α -D-GalpNA były nieobecne. Zamiast reszty α -D-GalpNA w analizowanej frakcji zidentyfikowano α -D-GlcN. Największym zaskoczeniem w trakcie analiz LPS *B. parapertussis* 529 było zidentyfikowanie w strukturze dystalnego trójcukru, który według danych opublikowanych przez Prestona i wsp. jest nieobecny, a w jego miejscu do α -D-GlcN przyłączony jest pentasacharydowy łącznik.

W trakcie analiz heteropolisacharydów *B. parapertussis* 529 oraz *B. bronchiseptica* 530 i 1943 nie zidentyfikowano pentasacharydowego łącznika, do którego, według opublikowanych prac, przyłączony jest antygen O. Nie przeprowadzono hydrolizy LPS kwasem fluorowodorowym, aby odtworzyć warunki pozwalające na identyfikację pentasacharydowego łącznika, ale tej wielkości dodatkowy

oligosacharydowy fragment powinien móc zostać zidentyfikowany na rozdiale elektroforetycznym oraz na widmach NMR po przeprowadzeniu standardowych rozdzielów i analiz. Pewnym wyjaśnieniem może być brak antygeny O u posiadanych szczepów *B. bronchiseptica*. Jednakże w LPS *B. parapertussis* 529, która syntetyzuje antygen O, również nie zidentyfikowano łącznika, chociaż nowo zidentyfikowana dodatkowa GlcN może być ewentualnym miejscem jego przyłączenia. Wg danych literaturowych (Preston i in., 2006) w strukturze łącznika można wyróżnić fragment strukturalnie podobny do dystalnego trójcukru, który w łączniku podstawiony jest przez α -D-GalNAc a w dystalnym trójcukrze przez α -D-GlcNAc. Przeciwciała skierowane przeciwko terminalnemu pentasacharydowi *B. pertussis* 186 mogłyby krzyżowo rozpoznawać łącznik, który w swojej strukturze zawiera podobny fragment. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, aby surowica anty-glikokoniugatowa anty-disach-HSA rozpoznająca swoiście dwucukrowy fragment dystalnego trójcukru w strukturze OS reagowała nieswoiście rozpoznając fragment łącznika, a nie trójcukru.

Dla przeprowadzenia pełnych porównawczych analiz OS rdzenia bakterii z rodzaju *Bordetella*, badania uzupełniono o *B. holmesii*, która również jest czynnikiem etiologicznym krztuśca. *B. holmesii* charakteryzuje się wzrostem arytmetycznym, ale na bogatym medium BHI nie zaobserwowano problemów z uzyskaniem odpowiedniego przyrostu masy bakteryjnej. Przy zmianie medium BHI na syntetyczną pożywkę Stainer-Scholte dedykowaną do produkcji szczepionek przeciwkrztuścowych, zaobserwowano spowolnienie wzrostu *B. holmesii*. Nagromadzenie odpowiedniej ilości masy bakterii do izolacji LPS, okazało się sporym wyzwaniem. Modyfikowano zarówno skład pożywki jak i sposób zakładania hodowli, a efekty były zadowalające w minimalnym stopniu. Hodowle bakteryjne przeprowadzono na trzech rodzajach podłoża i z każdego rodzaju zbierano osobno masę bakteryjną i przeprowadzano izolację LPS. Z konieczności większość analiz przeprowadzono na niewielkiej ilości materiału. Rozdział elektroforetyczny LPS w zależności od pożywki nieznacznie się różni, co mogłoby być przyczyną wątpliwości, czy w trakcie hodowli nie doszło do niewykrytego zakażenia. Czystość hodowli kontrolowano na bieżąco, przeprowadzając biotypowanie bakterii techniką opartą o spektrometrię mas. W momencie rozpoczęcia badań nad strukturami heteropolisacharydowych fragmentów LPS *B. holmesii* ATCC 51541 szczegółowo opisana była jedynie struktura lipidu A (Bouchez i in., 2017). Rejestrując widma MALDI-TOF MS lipidu A, weryfikowano prawidłowo przeprowadzone izolacje LPS *B. holmesii* ATCC 51541. Po przeprowadzeniu porównawczych analiz OS technikami

spektroskopii NMR i spektrometrii mas ustalono, że struktura oligosacharydu rdzenia, referencyjnego szczepu *B. holmesii* ATCC 51541 jest tożsama ze strukturą OS *B. pertussis* 606. Analizy potwierdzano również w reakcjach serologicznych. Surowica zawierająca poliklonalne przeciwciała przeciwko dwucukrowemu epitopowi (anty-disach-HSA) nie rozpoznawała tych fragmentów w strukturze OS rdzenia, co wskazywało na nieobecność w strukturze immunodominującego dystalnego trójcukru. Surowice rozpoznające pełną cząsteczkę OS rdzenia (anty-OS-PT) oraz terminalny pentasacharyd (anty-penta-PT) reagowały krzyżowo z oligosacharydem rdzenia *B. holmesii*, aczkolwiek reakcja surowicy na pentasacharydowy fragment nie była zbyt intensywna. Przeciwciała w surowicy anty-penta-PT rozpoznały jedynie proksymalny fragment pentasacharydu.

Strukturę antygeny O i wielkość podjednostki również analizowano technikami spektroskopii NMR i spektrometrii mas oraz potwierdzano przeprowadzając dodatkowo analizy chemiczne. Po raz pierwszy określono wielkość podjednostki (876,32 Da) łańcucha O-swoistego *B. holmesii* ATCC 51541 oraz ustalono jego strukturę $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]$.

Wśród OS *Bordetellae* zidentyfikowano heksasacharyd jako najmniejszy wspólny strukturalnie mianownik. W badaniach przeprowadzonych dla różnych szczepów *E. coli* generowane przeciwciała rozpoznawały krzyżowo oligosacharydy rdzenia szczepów szorstkich wśród szczepów gładkich (Lukasiewicz i in., 2003). Taki minimalny wspólny element w strukturze lipopolisacharydów *Bordetellae* mógłby posłużyć do przygotowania uniwersalnej szczepionki przeciwkrtuścowej chroniącej przed zakażeniami różnymi gatunkami bakterii z rodzaju *Bordetella*.

Duża heterogenność struktur cukrowych, nawet pomiędzy poszczególnymi szczepami, stanowi spore utrudnienie przy projektowaniu uniwersalnej koniugatowej szczepionki opartej o polisacharydy izolowane z LPS. Do cukrowych czynników wirulencji oprócz LPS, zalicza się również egzopolisacharydy oraz polisacharydy kapsularne, które również są składnikami szczepionek. W genomach bakterii z rodzaju *Bordetella* zidentyfikowano geny odpowiedzialne za syntezę CPS i EPS. Obecność polisacharydu kapsularnego u *B. pertussis* od kilkadziesiąt lat pozostaje przedmiotem badań. Analiza genomów różnych szczepów *B. pertussis* wykazuje obecność genów syntezujących kapsuły, ale nie udało się wyizolować produktów ich biosyntezy i przedstawić struktury poszukiwanego CPS. Wśród klasycznych *Bordetellae*

(*B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica*) zidentyfikowano geny kodujące polisacharyd kapsularny typu II, który wykazuje homologię do antygeny Vi. Jednak jedynie u *B. bronchiseptica* geny odpowiedzialne za biosyntezę polisacharydu kapsularnego są nienaruszone i mogłyby syntetyzować CPS (Parkhill i in., 2003). W genomach *B. holmesii* oraz *B. hinzii* również wykryto geny kodujące CPS, ale podobnie jak u klasycznych bakterii z rodzaju *Bordetella*, są one нефункционалне. Dla genomu *B. hinzii* opisano także geny kodujące dodatkową kapsułę oraz homopolimer o strukturze podobnej do struktury celulozy (β -1,4-Glc) (Linz i in., 2016). Jednak pomimo scharakteryzowania sekwencji kodujących CPS dla *Bordetellae*, nie wykazano istnienia kapsuły. W pracy Neo i wsp. przedstawiono pośrednie dowody na obecność polisacharydów kapsularnych. Według autorów publikacji CPS zbudowany jest tak jak antygen Vi z homopolimeru GalNAcA, a niska intensywność reakcji serologicznej z surowicą anti-Vi, wskazuje na krótkołańcuchowy charakter polisacharydu kapsularnego, dlatego wprowadzono dla niego nazwę „mikrokapsuła”. Struktura tej mikrokapsuły nie została przedstawiona, stworzono natomiast mutanty *B. pertussis* z delecją genów odpowiedzialnych za syntezę CPS. Na podstawie zdjęć z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, barwienia bakterii na obecność CPS oraz testu immunodetekcyjnego wykrywającego antygen Vi z użyciem mysiej surowicy zawierającej poliklonalne przeciwciała przeciwko antygenowi Vi autorzy wykazali obecność mikrokapsuły na powierzchni bakterii (Neo i in., 2010). Aczkolwiek autorzy artykułu sami przyznali, że na podstawie używanego przez nich testu barwiącego CPS (opartego o wybielacz optyczny) nie byli w stanie odróżnić szczepu dzikiego wytwarzającego kapsułę od mutantu z delecją, który jej nie wytwarza. Polisacharydy kapsularne o tej samej strukturze, a za takie uważa się mikrokapsułę i antygen Vi, powinny mieć podobne funkcje. Natomiast autorzy publikacji wykazali brak związku pomiędzy typowymi funkcjami CPS jak hamowanie zabijania zależne od dopełniacza, a obecnością genów kodujących kapsuły. W kolejnej pracy również nie przedstawiono struktury mikrokapsuły, a ponownie skupiono się na analizach genetycznych i wykazano, że u mutantów z delecją genów CPS, które nie syntetyzują białek transportowych kapsuły, dochodzi do zmniejszenia produkcji czynników wirulencji i ograniczenia adherencji bakterii (Hoo i in., 2014). W artykułach przedstawiono dowody pośrednie na obecność mikrokapsuły, brakuje natomiast analiz wyizolowanego „czystego” materiału, co wprowadza wątpliwości, czy autorom faktycznie udało się wykryć kapsułę. Podobne wątpliwości można mieć po analizach prac dotyczących Bps, czyli egzopolisacharydu

który może być produkowany przez kilka bakterii z rodzaju *Bordetella*. Według przytoczonych publikacji Bps jest homopolimerem GlcNAc. W opublikowanych pracach również stworzono mutanty z delecją genów odpowiedzialnych za syntezę Bps, na których prowadzono badania, ale pomimo przedstawienia metody izolacji, nie przedstawiono bezpośrednich analiz strukturalnych wyizolowanego polisacharydu (Conover i in., 2010, 2012). We wszystkich dotychczasowych badaniach struktura przedstawiana jest pośrednio, bez charakterystyki wyizolowanego materiału.

Zaprezentowane w pracy wyniki stoją w pewnej kontrze do doniesień literaturowych. W laboratorium specjalizujemy się w analizach struktur heteropolisacharydowych, dlatego skupiono się na izolacjach i analizach strukturalnych polisacharydów. Nie zajmowano się badaniami genetycznymi, chociaż może warto w przyszłości uzupełnić wyniki o analizy genomów. W syntetycznym medium pohodowlanym, które nie było ekstrahowane ani traktowane enzymatycznie tak jak przy omówionych analizach Bps, wykryto długołańcuchowe egzopolisacharydy oraz znacznie krótszy egzooligosacharyd. Analizowane bakterie z klastra *B. bronchiseptica* produkują dwa rodzaje glukanów o prostej homopolimerowej strukturze $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow]$ i $[\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow]$. Pewnym zaskoczeniem okazało się odkrycie w medium pohodowlanym oligosacharydu o dosyć skomplikowanej strukturze, nie przypominającej swoją budową ani homopolimerowego Bps (GlcNAc), ani mikrokapsuły (GalNAcA). Strukturę nowoodkrytego oligosacharydu zdefiniowano na podstawie analiz przeprowadzonych technikami spektroskopii NMR, spektrometrii mas oraz klasycznymi analizami chemicznymi. Strukturę zdefiniowano jako heksasacharyd $\alpha\text{-Glc}\text{pNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Gal}\text{pNAcAN}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-Glc}\text{p}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Gal}\text{pNAcAN}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Glc}\text{pNAcA}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha/\beta\text{-Glc}\text{pNAc}$.

Dla scharakteryzowanego oligosacharydu wprowadzono nazwę BOS (*Bordetella oligosaccharide*) ze względu na zdecydowaną odmiennosć od hipotetycznych struktur Bps i mikrokapsuły oraz jego obecność w mediach pohodowlanych u wszystkich analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*, w tym także u gatunków nienależących do klasycznych *Bordetellae* (*B. hinzii* oraz *B. petrii*).

BOS zdefiniowano jako heksasacharyd o masie 1235,5 Da. Na widmach MALDI-TOF MS zidentyfikowano główny, dominujący jon $[M\text{-H}]^-$ o m/z 1234,5 co sugeruje, że wyizolowany BOS jest krótkim oligosacharydem. Jednak czas retencji frakcji, w której został zidentyfikowany pokrywa się z czasami retencji dla polisacharydów o masach w zakresie 2000- 3000 Da, co wskazuje, że BOS może mieć większą masę, a więc

i bardziej zróżnicowaną strukturę niż początkowo sądzono. W wyniku dalszych analiz widm masowych zidentyfikowano cząsteczkę BOS w formie dimeru. Jednak nie udało się ustalić w jaki sposób dwie cząsteczki byłyby ze sobą połączone. Przeprowadzone analizy chemiczne oraz analizy widm NMR pozwoliły zidentyfikować w BOS wolny redukujący koniec, którego sygnały od protonu anomerycznego nie wykazywały korelacji do innego systemu spinowego. Wolny koniec redukujący mógłby być połączony labilnym wiązaniem z lipidową kotwicą podobnie jak u polisacharydów kapsularnych opisywanych w literaturze (Cooper i in., 2015). We frakcji zawierającej BOS zidentyfikowano sygnały pochodzące od grup -CH, -CH₂ i -CH₃ tworzących złożone systemy spinowe przypominające te od kwasów tłuszczowych, które mogłyby pełnić rolę kotwicy dla cząsteczki, ale nie udało się jeszcze ustalić ich struktury, ani typu wiązania jakim połączone są z BOS.

Struktura BOS została opisana, ale równie ważnym elementem kolejnych analiz jest poznanie jego antygenowych właściwości, oraz ustalenie czy jest to nietypowy egzooligosacharyd produkowany przez *Bordetellae*, czy też może jest to oligosacharyd kapsularny związany z powierzchnią komórki bakteryjnej. Krzyżowe reakcje poliklonalnych surowic na pełne komórki bakterii *B. pertussis* (anty-SM Bp 186 i anty-SM Bp miks) z BOS sugerują, że może być on związany z zewnętrzną błoną osłony komórkowej. Na zarejestrowanych zdjęciach *B. holmesii* ATCC 51541 (Ryc. 13 D) z hodowli płynnej zaobserwowano bakterie w skupisku, połączone ze sobą zewnątrzkomórkową substancją śluzową, co jest typowe dla bakterii wytwarzających polisacharydy kapsularne. Z drugiej strony BOS został jednak wyizolowany z medium pohodowlanego, więc możliwe, że jako egzooligosacharyd bierze udział w tworzeniu biofilmu.

BOS jest zupełnie nowym odkryciem i laboratorium nie posiada swoistej surowicy go rozpoznającej. W przeprowadzonych w pracy analizach serologicznych, BOS reaguje krzyżowo z surowicami anty-glikokoniugatowymi anty-penta-PT, anty-OS-PT oraz anty-disach-HSA. Przyczyną tych krzyżowych reakcji może być obecność w jego strukturze terminalnej GlcNAc, która w OS *B. pertussis* 186, jest immunodominującym epitopem rozpoznawanym przez przeciwciała z surowic anty-glikokoniugatowych. Pewna pula przeciwciał surowic anty-glikokoniugatowych może krzyżowo rozpoznawać terminalną N-acetylowaną glukozaminę w strukturach BOS i OS. W ramach wstępnych przygotowań do dalszych badań podjęto testową próbę stworzenia glikokoniugatu BOS z białkiem nośnikowym. Po aktywacji końca redukującego BOS

przeprowadzono jego koniugację z toksoidem tężca. Ilość wyizolowanego materiału nie pozwoliła na ocenienie stopnia podstawienia białka przez oligocukier. Posiadane surowice anti-penta-TTd i anti-OS-TTd rozpoznały nośnik białkowy, ale ze względu na brak monoswoistej surowicy anti-BOS nie można było potwierdzić obecności oligocukru w koniugacie. Pośrednim potwierdzeniem obecności BOS w preparacie były reakcje krzyżowe wykorzystanych surowic anti-glikokoniugatowych (anti-disach-HSA, anti-penta-PT oraz anti-OS-PT), które nie rozpoznają białka nośnikowego. Kolejnym krokiem w badaniach będzie immunizacja zwierząt i analiza reaktywności surowic i właściwości ochronnych przeciwciał anti-BOS-TTd.

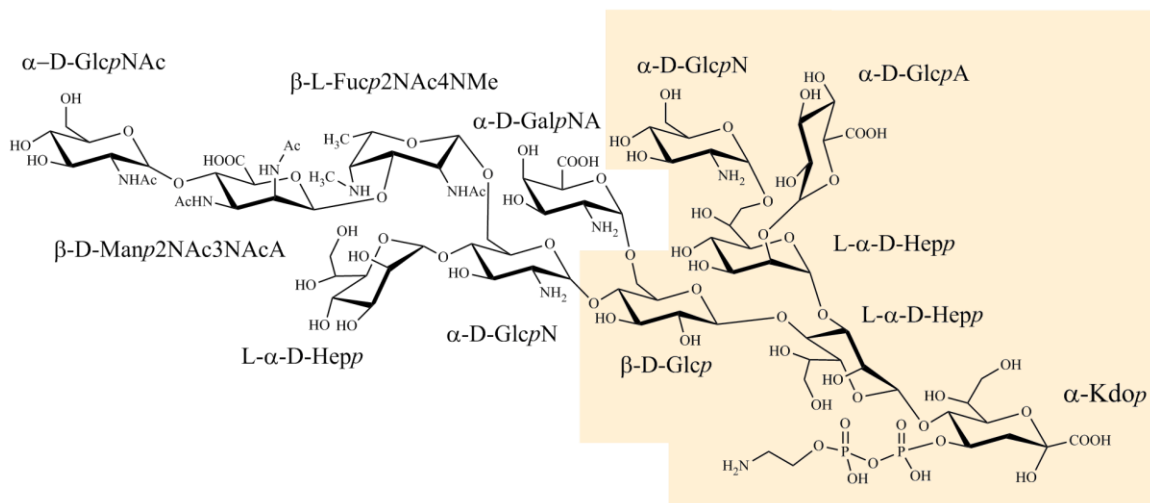
Skuteczna szczepionka przeciwkrztuścowa powinna indukować odporność funkcjonalną w postaci neutralizacji toksyny, blokowania adherencji bakterii, opsonizacji, aktywacji komplementu i zabijania bakterii. Niewystarczająca skuteczność obecnie stosowanych szczepionek przeciwkrztuścowych wynika z tego, że ich składniki nie wywołują pełnej odpowiedzi immunologicznej. Rozwiązaniem jest zastosowanie składnika powierzchniowego komórki bakteryjnej. Wówczas generowane przeciwciała o aktywności bakteriobójczej rozpoznają struktury powierzchniowe bakterii, z udziałem dopełniacza atakują błonę zewnętrzną wykazując aktywność bakteriobójczą. Prowadzi to do eliminacji bakterii z dróg oddechowych. Duża heterogenność struktur cukrowych, nawet pomiędzy poszczególnymi szczepami, stanowi spore utrudnienie przy projektowaniu uniwersalnej koniugatowej szczepionki opartej o polisacharydy izolowane z LPS. Większą homogenicznością charakteryzuje się nowoodkryty *Bordetella oligosaccharide* (BOS), dzięki temu ma potencjał aby zostać uniwersalnym antygenem szczepionkowym dla bakterii z rodzaju *Bordetella*. BOS został wykryty w medium pochodowlanym, ale dotychczas przeprowadzone badania wskazują raczej na jego kapsularny charakter. Ustalenie jego przyporządkowania do EPS lub CPS jest istotną kwestią, natomiast jeżeli nie jest on oligosacharydem kapsularnym, to istnieje możliwość, że jako wydzielany egzooligosacharyd bierze udział w tworzeniu biofilmu.

Wśród struktur cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* zidentyfikowano wspólne elementy, które mogłyby zostać potencjalnymi szczepionkowymi antygenami przeciwkrztuścowymi. Zarówno heksasacharydowy fragment OS izolowany z LPS jak i nowoodkryty BOS mogą zostać składnikami szczepionki glikokoniugatowej generującej powstanie przeciwciał bakteriobójczych, zapewniających długotrwałą ochronę przed zakażeniem różnymi *Bordetellae*, w tym także zakażeniami mieszanymi. Glikokoniugaty oparte o oligosacharydowe fragmenty izolowane z LOS *B. pertussis* 186 generują

powstanie bakteriobójczych przeciwciał (Koj i in., 2015). BOS jest jednak dużą niewiadomą i potrzebne są dodatkowe badania w celu ustalenia czy jest związany z powierzchnią bakterii oraz czy wytworzony glikokoniugat ma właściwości antygenowe i będzie indukował powstawanie swoistych przeciwciał. Nawet jeżeli przeciwciała skierowane przeciwko BOS nie będą miały właściwości bakteriobójczych to z drugiej strony mogą hamować adhezję i zapobiegać kolonizacji bakterii w drogach oddechowych gospodarza. Niezależnie od rodzaju wytworzonych przeciwciał glikokoniugatowa szczepionka oparta o BOS chroniłaby przed transmisją i zakażeniami bakteriami wywołującymi krztusiec i chorobami układu oddechowego wywołanymi przez bakterie z rodzaju *Bordetella*.

9. WNIOSKI

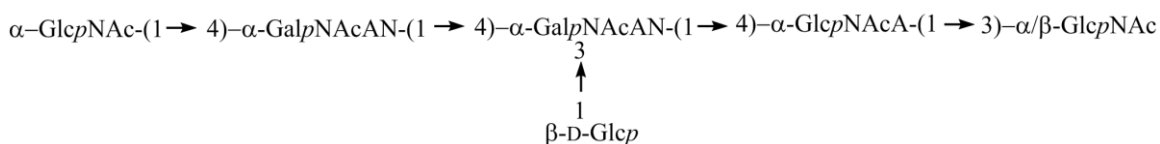
1. Weryfikacja struktur OS rdzenia dla *B. pertussis* 186 i 606, *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* 530 i 1943 wykazała, że podstawowy schemat struktury oligosacharydu rdzenia jest zachowany u wszystkich rozpatrywanych gatunków należących do klasycznych *Bordetellae*.
 - a) Minimalny OS rdzenia dla *Bordetellae* zdefiniowano jako heksasacharyd, w którego skład wchodzi reszty cukrowe: Kdo, 3,4-L- α -D-Hepp, 2,7-L- α -D-Hepp, α -D-GlcpN, α -D-GlcpA oraz β -D-Glcp. Minimalny OS w pełnej strukturze OS *B. pertussis* 186 zaznaczono kolorem na Ryc. 87.



Ryc. 87. Pełna struktura OS *B. pertussis* 186 z zaznaczoną kolorem minimalną strukturą OS rdzenia zidentyfikowaną u wszystkich analizowanych szczepów *Bordetellae*

- b) OS rdzenia *B. pertussis* 606 jest nonasacharydem. β -D-Glcp minimalnego OS rdzenia w pozycji 4 jest podstawiona przez L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpN-(1 \rightarrow), a w pozycji 6 przez α -D-GalpNA.
- c) Oligosacharyd *B. pertussis* 186 jest dodekasacharydem. α -D-GlcpN w pozycji 6 jest dodatkowo podstawiona przez dystalny trójcukier złożony z α -D-GlcpNAc, β -D-Manp2NAc3NAcA oraz β -L-Fucp2NAc4NMe.
- d) *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943 zidentyfikowano jako szczepy szorstkie, których LPS pozbawiony jest łańcucha O-swoistego. β -D-Glcp minimalnego OS rdzenia w pozycji 6 jest podstawiona przez α -D-GalpNA. Podstawienie β -D-Glcp w pozycji 4 przez L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpN-(1 \rightarrow), jest niekompletne. Szczepy *B. bronchiseptica* 530 i 1943, nie są typowymi przedstawicielami swojego gatunku, ponieważ nie wytwarzają antygenu O. Na powierzchni ekspresjonują LOS

5. Gatunki wywołujące krztusiec o łagodniejszych objawach (*B. parapertussis* i *B. holmesii*) nie ekspresjonują na swojej powierzchni OS zawierającego dystalny trójcukier.
6. Surowice uzyskane w wyniku immunizacji koniugatami opartymi o terminalne fragmenty OS, nie rozpoznają wewnętrznego wspólnego heksasacharydowego regionu OS rdzenia *Bordetellae*, zwłaszcza w przypadku szczepów szorstkich. Także surowice zawierające poliklonalne przeciwciała przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym nie rozpoznają najkrótszych OS rdzenia wśród *Bordetellae*.
7. W projektowaniu koniugatów indukujących powstawanie przeciwciał przeciwkrztuścowych istotne jest, aby neoglikokoniugat zawierał oligosacharydowy fragment wspólny dla wszystkich analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Minimalny OS z nośnikiem białkowym mógłby stanowić nowy składnik zapewniający krzyżową reaktywność.
8. Bakterie z rodzaju *Bordetella* wytwarzają egzopolisacharydy o prostej homopolimerowej strukturze [$\rightarrow 4$]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) i [$\rightarrow 6$]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow).
9. Wyizolowano oraz ustalono strukturę nowego, nieopisanego wcześniej składnika cukrowego typu EPS/CPS. Ze względu na oligosacharydowy charakter wprowadzono nowe określenie glikanu wykrytego początkowo u *B. holmesii*, a później u wszystkich analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Zaproponowano nazwę BOS (*Bordetella oligosaccharide*), która pozostaje w konwencji nazewnictwa innych polisacharydów opisywanych dla *Bordetellae*.



Ryc. 89. BOS *Bordetella oligosaccharide*

- a) W skład BOS wchodzi reszty cukrowe jak: α -N-acetyloglukozamina (α -Glc p NAc), β -glukoza (β -Glc p), 4-podstawiony 2-acetamido-2-deoksy-galaktouronoamid (4- α -Gal p NAcAN), 3,4-podstawiony 2-acetamido-2-deoksy-galaktouronoamid (3,4- α -Gal p NAcAN), 4-podstawiony kwas 2-acetamido-2-deoksy-glukuronowy (4- α -Glc p NAcA) oraz 3-podstawiona N-acetyloglukozamina w konfiguracji α i β (3- α/β -Glc p NAc).
- b) Ilość BOS izolowanego z medium jest zmienna w zależności od gatunku, szczepu, a nawet warunków hodowli.

- c) Funkcja BOS nie jest znana. Jedynie na zasadzie analogii do funkcji innych egzopolisacharydów i polisacharydów kapsularnych można zasugerować udział BOS w adherencji bakterii do komórek gospodarza i w tworzeniu biofilmu.
- d) Na widmach NMR zarejestrowanych dla frakcji zawierającej BOS zidentyfikowano dodatkowe sygnały -CH, -CH₂ i -CH₃ mogące pochodzić od kwasów tłuszczowych. Ich struktura nie została jeszcze ustalona, ale wydaje się, że mogą one funkcjonować jako element kotwiczący BOS w zewnętrznej błonie osłony komórkowej bakterii. Nie ustalono również miejsca podstawienia kwasów tłuszczowych w cząsteczce BOS. Na ewentualne miejsce przyłączenia wskazuje obecność GlcNAc w konfiguracji α i β na końcu redukującym.
- 10.** Surowice zawierające poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym *B. pertussis* oraz surowica anty-Vi, która wg danych literaturowych, rozpoznaje GalNAcA w strukturze mikrokapsuły, reagują krzyżowo z BOS. Reakcje te potwierdzają przypuszczenia, że BOS może być pewną formą otoczki.
- 11.** Zastosowane w trakcie realizacji badań techniki spektroskopii NMR pozwoliły na:
- a) Szybką analizę porównawczą preparatów OS i BOS uzyskanych z różnych bakterii z rodzaju *Bordetella* z wykorzystaniem sygnałów strukturalnych grup reporterowych w widmach jednowymiarowych ¹H i ³¹P.
- b) Analizę ograniczonej zmienności strukturalnej w obrębie OS rdzenia na podstawie danych uzyskanych w eksperymentach dwuwymiarowych, ze wskazaniem uniwersalnej dla badanych szczepów i gatunków struktury minimalnej.
- c) Identyfikację nietypowych reszt GalNAcA oraz ich form amidowych (GalNAcAN) w strukturze BOS.

10. LITERATURA

- Anderson, R.M., May, R.M., 1990. Immunisation and herd immunity. *Lancet* 335, 641–645.
- Aricò, B., Rappuoli, R., 1987. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J. Bacteriol.* 169, 2847–2853.
- Ashworth, L.A., Robinson, A., Irons, L.I., Morgan, C.P., Isaacs, D., 1983. Antigens in whooping cough vaccine and antibody levels induced by vaccination of children. *Lancet* 2, 878–881.
- Aslanabadi, A., Ghabili, K., Shad, K., Khalili, M., Sajadi, M.M., 2015. Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. *Lancet Infect. Dis.* 15, 1480–1484.
- Austin, B., 2014. The Family Alcaligenaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 729–757.
- Bart, M.J., Harris, S.R., Advani, A., Arakawa, Y., Bottero, D., Bouchez, V., Cassiday, P.K., Chiang, C.-S., Dalby, T., Fry, N.K., Gaillard, M.E., van Gent, M., Guiso, N., Hallander, H.O., Harvill, E.T., He, Q., van der Heide, H.G.J., Heuvelman, K., Hozbor, D.F., Kamachi, K., Karataev, G.I., Lan, R., Lutyńska, A., Maharjan, R.P., Mertsola, J., Miyamura, T., Octavia, S., Preston, A., Quail, M.A., Sintchenko, V., Stefanelli, P., Tondella, M.L., Tsang, R.S.W., Xu, Y., Yao, S.-M., Zhang, S., Parkhill, J., Mooi, F.R., 2014. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio* 5, e01074.
- Batey, R.G., Smits, A.F., 1976. The isolation of *Bordetella bronchiseptica* from an outbreak of canine pneumonia. *Aust. Vet. J.* 52, 184–186.
- Bemis, D.A., Greisen, H.A., Appel, M.J., 1977. Bacteriological variation among *Bordetella bronchiseptica* isolates from dogs and other species. *J. Clin. Microbiol.* 5, 471–480.
- Bergfors, E., Trollfors, B., Taranger, J., Lagergård, T., Sundh, V., Zackrisson, G., 1999. Parapertussis and pertussis: Differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int. J. Infect. Dis.* 3, 140–146.
- Bhat, U.R., Krishnaiah, B.S., Carlson, R.W., 1991. Re-examination of the structures of the lipopolysaccharide core oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Carbohydr. Res.* 220, 219–227.
- Blennow, M., Granström, M., 1989. Adverse reactions and serologic response to a booster dose of acellular pertussis vaccine in children immunized with acellular or whole-cell vaccine as infants. *Pediatrics* 84, 62–67.
- Bordet, J., Gengou, O., 1906. Le microbe de la coqueuiche, in: *Ann. Inst. Pasteur. Institut Pasteur, Paris*, pp. 731–741.
- Bouchez, V., AlBitar-Nehmé, S., Novikov, A., Guiso, N., Caroff, M., 2017. *Bordetella holmesii*: Lipid A Structures and Corresponding Genomic Sequences Comparison in Three Clinical Isolates and the Reference Strain ATCC 51541. *Int J Mol Sci* 18.
- Bravo, D., Silva, C., Carter, J.A., Hoare, A., Alvarez, S.A., Blondel, C.J., Zaldívar, M., Valvano, M.A., Contreras, I., 2008. Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* 57, 938–946.
- Buboltz, A.M., Nicholson, T.L., Karanikas, A.T., Preston, A., Harvill, E.T., 2009. Evidence for Horizontal Gene Transfer of Two Antigenically Distinct O Antigens in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 77, 3249–3257.
- Burns, V.C., Pishko, E.J., Preston, A., Maskell, D.J., Harvill, E.T., 2003. Role of

- Bordetella* O Antigen in Respiratory Tract Infection. *Infect Immun* 71, 86–94.
- Caroff, M., Aussel, L., Zarrouk, H., Martin, A., Richards, J.C., Th  risod, H., Perry, M.B., Karibian, D., 2001. Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. *J. Endotoxin Res.* 7, 63–68.
- Caroff, M., Brisson, J., Martin, A., Karibian, D., 2000. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett.* 477, 8–14.
- Caroff, M., Deprun, C., Richards, J.C., Karibian, D., 1994. Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *J. Bacteriol.* 176, 5156–5159.
- Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J.M., Haeffner-Cavaillon, N., 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4, 915–926.
- Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O.M., Deora, R., 2016. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 74, ftv108.
- Cattelan, N., Jennings-Gee, J., Dubey, P., Yantorno, O.M., Deora, R., 2017. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect. Immun.* 85.
- Cherry, J.D., 2019. The 112-Year Odyssey of Pertussis and Pertussis Vaccines-Mistakes Made and Implications for the Future. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131(2), 209–217.
- Conover, M.S., Redfern, C.J., Ganguly, T., Sukumar, N., Sloan, G., Mishra, M., Deora, R., 2012. BpsR Modulates *Bordetella* Biofilm Formation by Negatively Regulating the Expression of the Bps Polysaccharide. *J. Bacteriol.* 194, 233–242.
- Conover, M.S., Sloan, G.P., Love, C.F., Sukumar, N., Deora, R., 2010. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol. Microbiol.* 77, 1439–1455.
- Cooper, C.A., Mainprize, I.L., Nickerson, N.N., 2015. Genetic, Biochemical, and Structural Analyses of Bacterial Surface Polysaccharides, in: Krogan, P., Nevan J., Babu, P., Mohan (Eds.), *Prokaryotic Systems Biology, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 295–315.
- Decker, M.D., Edwards, K.M., Steinhoff, M.C., Rennels, M.B., Pichichero, M.E., Englund, J.A., Anderson, E.L., Deloria, M.A., Reed, G.F., 1995. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* 96, 557–566.
- Dehottay, P.M.H., Goffin, P., Santos, F.B. dos, TEUSINK, B., 2017. Chemically defined medium for the industrial scale culture of a species of *Bordetella*. US9765294B2.
- Di Fabio, J.L., Caroff, M., Karibian, D., Richards, J.C., Perry, M.B., 1992. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 76, 275–281.
- Dias, W. de O., Prestes, A.F.R.O., S.Cunegundes, P., Silva, E.P., Raw, I., 2017. Immunization against Pertussis: An Almost Solved Problem or a Headache in Public Health. *Vaccines*.
- Dias, W.O., van der Ark, A.A.J., Sakauchi, M.A., Kubrusly, F.S., Prestes, A.F.R.O., Borges, M.M., Furuyama, N., Horton, D.S.P.Q., Quintilio, W., Antoniazzi, M., Kuipers, B., van der Zeijst, B.A.M., Raw, I., 2013. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 339–348.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., van der Heide, H.G.J., van Gent, M., Liew, S., Relman, D.A., Mooi, F.R., 2006. Characterization of a Highly Conserved Island in

- the Otherwise Divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* Genomes. J. Bacteriol. 188, 8385–8394.
- Drab, M., Krajniak, J., & Grzelakowski, K. P. (2016). The New Methodology and Chemical Contrast Observation by Use of the Energy-Selective Back-Scattered Electron Detector. Microsc. Microanal., 22(6), 1369–1373..
- Duus, J., Gottfredsen, C.H., Bock, K., 2000. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. Chem. Rev. 100, 4589–4614.
- Dworkin, M.S., Sullivan, P.S., Buskin, S.E., Harrington, R.D., Olliffe, J., MacArthur, R.D., Lopez, C.E., 1999. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. Clin. Infect. Dis. 28, 1095–1099.
- Edwards, K.M., Meade, B.D., Decker, M.D., Reed, G.F., Rennels, M.B., Steinhoff, M.C., Anderson, E.L., Englund, J.A., Pichichero, M.E., Deloria, M.A., 1995. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. Pediatrics 96, 548–557.
- El Hamidi, A., Novikov, A., Karibian, D., Perry, M.B., Caroff, M., 2009. Structural characterization of *Bordetella parapertussis* lipid A. J Lipid Res 50, 854–859.
- Eldering, G., Kendrick, P., 1938. *Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. J. Bacteriol. 35, 561–572.
- Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G., Mohn, W.W., 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. Appl. Environ. Microbiol. 69, 275–284.
- Evans, D.G., Maitland, H.B., 1939. The toxin of Br. bronchiseptica and the relationship of this organism to *H. pertussis*. The Journal of Pathology and Bacteriology 48, 67–78.
- Felix, A., Margaret Pitt, R., 1934. A new antigen of *B. typhosus*: its relation to virulence and to active and passive immunisation. The Lancet, Originally published as Volume 2, Issue 5787 224, 186–191.
- Ferry, N.S., 1911. Etiology of Canine Distemper. The Journal of Infectious Diseases 8, 399–420.
- Fine, P.E., Clarkson, J.A., 1987. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. Rev. Infect. Dis. 9, 866–883.
- Fry, N.K., Duncan, J., Malnick, H., Warner, M., Smith, A.J., Jackson, M.S., Ayoub, A., 2005. *Bordetella petrii* clinical isolate. Emerging Infect. Dis. 11, 1131–1133.
- Fulton, T.R., Phadke, V.K., Orenstein, W.A., Hinman, A.R., Johnson, W.D., Omer, S.B., 2016. Protective Effect of Contemporary Pertussis Vaccines: A Systematic Review and Meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 62, 1100–1110.
- Gamian, A., Mieszala, M., Katzenellenbogen, E., Czarny, A., Zal, T., Romanowska, E., 1996. The occurrence of glycine in bacterial lipopolysaccharides. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13, 261–268.
- Ghosh, H.K., Tranter, J., 1979. *Bordetella bronchicanis* (*bronchiseptica*) infection in man: review and a case report. J. Clin. Pathol. 32, 546–548.
- Glare, E.M., Paton, J.C., Premier, R.R., Lawrence, A.J., Nisbet, I.T., 1990. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28, 1982–1987.
- Goodnow, R.A., 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev. 44, 722–738.

- Greenfield, L.K., Whitfield, C., 2012. Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr. Res.* 356, 12–24.
- Guiso, N., 2015. *Bordetella pertussis*, in: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J. (Eds.), *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Academic Press, Boston, pp. 1507–1527.
- Guthrie, J.L., Robertson, A.V., Tang, P., Jamieson, F., Drews, S.J., 2010. Novel Duplex Real-Time PCR Assay Detects *Bordetella holmesii* in Specimens from Patients with Pertussis-Like Symptoms in Ontario, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1435–1437.
- Hamidou Soumana, I., Linz, B., Harvill, E.T., 2017. Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Front. Microbiol.* 8, 28.
- Hart, P.J., O’Shaughnessy, C.M., Siggins, M.K., Bobat, S., Kingsley, R.A., Goulding, D.A., Crump, J.A., Reyburn, H., Micoli, F., Dougan, G., Cunningham, A.F., MacLennan, C.A., 2016. Differential Killing of *Salmonella enterica* Serovar Typhi by Antibodies Targeting Vi and Lipopolysaccharide O:9 Antigen. *PLoS One* 11.
- Harvill, E.T., Goodfield, L.L., Ivanov, Y., Smallridge, W.E., Meyer, J.A., Cassidy, P.K., Tondella, M.L., Brinkac, L., Sanka, R., Kim, M., Losada, L., 2014. Genome Sequences of Nine *Bordetella holmesii* Strains Isolated in the United States. *Genome Announc.* 2.
- Heininger, U., 2010. Update on pertussis in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 163–173.
- Hester, S.E., Goodfield, L.L., Park, J., Feaga, H.A., Ivanov, Y.V., Bendor, L., Taylor, D.L., Harvill, E.T., 2015. Host Specificity of Ovine *Bordetella parapertussis* and the Role of Complement. *PLoS ONE* 10, e0130964.
- Heyns, K., Kiessling, G., 1967. Strukturaufklärung des vi-antigens aus *Citrobacter freundii* (E. coli) 5396/38. *Carbohydr. Res.* 3, 340–353.
- Holst, O., 2011. Structure of the Lipopolysaccharide Core Region, in: Knirel, Y.A., Valvano, M.A. (Eds.), *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*. Springer, Vienna, pp. 21–39.
- Hoo, R., Lam, J.H., Huot, L., Pant, A., Li, R., Hot, D., Alonso, S., 2014. Evidence for a Role of the Polysaccharide Capsule Transport Proteins in Pertussis Pathogenesis. *PLoS One* 9.
- Ibsen, P., Møller, S., Heron, I., 1988. Lipopolysaccharides in a traditional pertussis vaccine. *J. Biol. Stand.* 16, 299–309.
- Ivanov, Y.V., Linz, B., Register, K.B., Newman, J.D., Taylor, D.L., Boschert, K.R., Le Guyon, S., Wilson, E.F., Brinkac, L.M., Sanka, R., Greco, S.C., Klender, P.M., Losada, L., Harvill, E.T., 2016. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5452–5459.
- Jacobsen, N.E., 2007. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Jansson, P.-E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., Lönngrén, J., 1976. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical Communications of the University of Stockholm* 8, 1–74a.
- Jefferson, T., Rudin, M., DiPietrantonj, C., 2003. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 21, 2003–2014.
- Jenkinson, D., 1988. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10

- year community study. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 296, 612–614.
- Johnson, K. G., & Perry, M. B. (1976). Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(1), 29–34.
- Kamiya, H., Otsuka, N., Ando, Y., Odaira, F., Yoshino, S., Kawano, K., Takahashi, H., Nishida, T., Hidaka, Y., Toyozumi-Ajisaka, H., Shibayama, K., Kamachi, K., Sunagawa, T., Taniguchi, K., Okabe, N., 2012. Transmission of *Bordetella holmesii* during Pertussis Outbreak, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1166–1169.
- Kaslow, H.R., Burns, D.L., 1992. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J.* 6, 2684–2690.
- Kerstens, K., Hinz, K.-H., Hertle, A., Segers, P., Lievens, A., Siegmann, O., De Ley, J., 1984. *Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34, 56–70.
- Klein, N.P., Bartlett, J., Fireman, B., Baxter, R., 2016. Waning Tdap Effectiveness in Adolescents. *Pediatrics* 137, e20153326.
- Ko, K.S., Peck, K.R., Oh, W.S., Lee, N.Y., Lee, J.H., Song, J.-H., 2005. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2516–2519.
- Koj, S., Ługowski, C., Niedziela, T., 2015. *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide-derived neoglycoconjugates – new components of pertussis vaccine. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 69, 1013–1030.
- Koj, S., Niedziela, T., Ługowski, C., 2019. *Bordetella pertussis* LOS-derived oligosaccharide with pertussis toxin glycoconjugate and its application in the prophylaxis and treatment of infections caused by *Bordetella pertussis*. EP3003389B1.
- Koj, S., Niedziela, T., Ługowski, C., 2018. *Bordetella pertussis* LOS-derived oligosaccharide with pertussis toxin glycoconjugate and its application in the prophylaxis and treatment of infections caused by *Bordetella pertussis*. US9878051B2.
- Koj, S., Niedziela, T., Ługowski, C., 2014. A method of identifying gram-negative bacteria using the MALDI-TOF MS method. WO2014035270A1.
- Kristensen, K.H., Lautrop, H., 1962. A family epidemic caused by the whooping-cough bacterium *Bordetella bronchiseptica*. *Ugeskr. Laeg.* 124, 303–308.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lang, Y., Zhao, X., Liu, L., Yu, G., 2014. Applications of mass spectrometry to structural analysis of marine oligosaccharides. *Mar. Drugs* 12, 4005–4030.
- Lee, W., Tonelli, M., Markley, J.L., 2015. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* 31, 1325–1327.
- Lin, A., Apostolovic, D., Jahnmatz, M., Liang, F., Ols, S., Tecleab, T., Wu, C., van Hage, M., Solovay, K., Rubin, K., Loch, C., Thorstensson, R., Thalen, M., Loré, K., 2020. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. *J. Clin. Invest.*
- Linz, B., Ivanov, Y.V., Preston, A., Brinkac, L., Parkhill, J., Kim, M., Harris, S.R., Goodfield, L.L., Fry, N.K., Goringe, A.R., Nicholson, T.L., Register, K.B., Losada, L., Harvill, E.T., 2016. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC Genomics* 17.
- Liston, S.D., Ovchinnikova, O.G., Whitfield, C., 2016. Unique lipid anchor attaches Vi antigen capsule to the surface of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U S A 113, 6719–6724.
- Locht, C., Antoine, R., 1995. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* 77, 333–340.
- Locht, C., Papin, J.F., Lecher, S., Debrie, A.-S., Thalen, M., Solovay, K., Rubin, K., Mielcarek, N., 2017. Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection. *J. Infect. Dis.* 216, 117–124.
- Lockyer, K., Gao, F., Derrick, J.P., Bolgiano, B., 2015. Structural correlates of carrier protein recognition in tetanus toxoid-conjugated bacterial polysaccharide vaccines. *Vaccine* 33, 1345–1352.
- Long, S.S., Edwards, K.M., Mertsola, J., 2018. *Bordetella pertussis* (Pertussis) and Other *Bordetella* Species, in: Long, S.S., Prober, C.G., Fischer, M. (Eds.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (Fifth Edition). Elsevier, pp. 890-898.e3.
- Lugowski, C., Niedziela, T., Jachymek, W., 1996. Anti-endotoxin antibodies directed against *Escherichia coli* R-1 oligosaccharide core-tetanus toxoid conjugate bind to smooth, live bacteria and smooth lipopolysaccharides and attenuate their tumor necrosis factor stimulating activity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16, 31–38.
- Lukasiewicz, J., Jachymek, W., Niedziela, T., Dzieciatkowska, M., Lakomska, J., Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Szymaniec, S., Misiuk-Hojlo, M., Lugowski, C., 2003. Serological characterization of anti-endotoxin serum directed against the conjugate of oligosaccharide core of *Escherichia coli* type R4 with tetanus toxoid. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 37, 59–67.
- Lund, S.J., Rowe, H.A., Parton, R., Donachie, W., 2001. Adherence of ovine and human *Bordetella parapertussis* to continuous cell lines and ovine tracheal organ culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 194, 197–200.
- Luu, L.D.W., Octavia, S., Aitken, C., Zhong, L., Raftery, M.J., Sintchenko, V., Lan, R., 2020. Surfaceome analysis of Australian epidemic *Bordetella pertussis* reveals potential vaccine antigens. *Vaccine* 38, 539–548.
- Martini, H., Detemmerman, L., Soetens, O., Yusuf, E., Piérard, D., 2017. Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR. *PLoS ONE* 12, e0175587.
- Mazengia, E., Silva, E.A., Peppe, J.A., Timperi, R., George, H., 2000. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2330–2333.
- McGirr, A., Fisman, D.N., 2015. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics* 135, 331–343.
- McNabb, S.J.N., Jajosky, R.A., Hall-Baker, P.A., Adams, D.A., Sharp, P., Anderson, W.J., Javier, A.J., Jones, G.J., Nitschke, D.A., Worshams, C.A., Richard, R.A., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2007. Summary of notifiable diseases --- United States, 2005. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54, 1–92.
- McNicholas, P.A., Batley, M., Redmond, J.W., 1987. The reactions of 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid (KDO) in dilute acid. *Carbohydr. Res.* 165, 17–22.
- Mielcarek, N., Debrie, A.-S., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A.B., Creusy, C., Engle, J., Goldman, W.E., Loch, C., 2006. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2, e65.
- Mir-Cros, A., Codina, G., Martín-Gómez, M.T., Fàbrega, A., Martínez, X., Jané, M., Van Esso, D., Cornejo, T., Rodrigo, C., Campins, M., Pumarola, T., González-López, J.J., 2017. Emergence of *Bordetella holmesii* as a Causative Agent of Whooping Cough, Barcelona, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1856–1859.
- Mooi, F.R., van Loo, I.H.M., van Gent, M., He, Q., Bart, M.J., Heuvelman, K.J., de

- Greeff, S.C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., Mertsola, J., 2009. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging Infect. Dis.* 15, 1206–1213.
- Nadji, S., Chopin, M.-C., Bourdon, C., Desbarbieux, R., Marissael, J.-M., Armand, S., Wallet, F., Loiez, C., 2018. Spondylodiscitis caused by *Bordetella holmesii*, a misrecognized pathogen emerging in invasive infections. *Int. J. Infect. Dis.* 75, 95–97.
- Neo, Y., Li, R., Howe, J., Hoo, R., Pant, A., Ho, S., Alonso, S., 2010. Evidence for an intact polysaccharide capsule in *Bordetella pertussis*. *Microbes and Infect.* 12, 238–245.
- Ner, Z., Ross, L.A., Horn, M.V., Keens, T.G., MacLaughlin, E.F., Starnes, V.A., Woo, M.S., 2003. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant* 7, 413–417.
- Niedziela, T., Lukasiewicz, J., Jachymek, W., Dzieciatkowska, M., Lugowski, C., & Kenne, L. (2002). Core oligosaccharides of *Plesiomonas shigelloides* O54:H2 (strain CNCTC 113/92): Structural and serological analysis of the lipopolysaccharide core region, the O-antigen biological repeating unit, and the linkage between them. *J. Biol. Chem.*, 277(14), 11653–11663.
- Niedziela, T., Letowska, I., Lukasiewicz, J., Kaszowska, M., Czarnecka, A., Kenne, L., Lugowski, C., 2005. Epitope of the Vaccine-Type *Bordetella pertussis* Strain 186 Lipooligosaccharide and Antiendotoxin Activity of Antibodies Directed against the Terminal Pentasaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate. *Infect. Immun.* 73, 7381–7389.
- Nilsson, M., Norberg, T., 2000. Synthesis of a spacer-containing disaccharide fragment of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 327, 261–267.
- Nisola, G.M., Tuuguu, E., Farnazo, D.M.D., Han, M., Kim, Y., Cho, E., Chung, W.-J., 2010. Hydrogen sulfide degradation characteristics of *Bordetella* sp. Sulf-8 in a biotrickling filter. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 1131–1138.
- Njamkepo, E., Bonacorsi, S., Debruyne, M., Gibaud, S.A., Guillot, S., Guiso, N., 2011. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected Pertussis[▽]. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4347–4348.
- Nwodo, U.U., Green, E., Okoh, A.I., 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14002–14015.
- Odanaka, K., Iwatsuki, M., Satho, T., Watanabe, M., 2017. Identification and characterization of a brilliant yellow pigment produced by *Bordetella pertussis*. *Microbiol. Immunol.* 61, 490–496.
- Paradowska-Stankiewicz, I., Augustynowicz, E., 2020. Szczepienia.info [WWW Document]. Szczepienia.Info. URL <https://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/krztusiec/> (accessed 2.18.20).
- Parise, G., Mishra, M., Itoh, Y., Romeo, T., Deora, R., 2007. Role of a Putative Polysaccharide Locus in *Bordetella* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* 189, 750–760.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeño-Tárraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O’Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K.,

- Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G., Maskell, D.J., 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 35, 32–40.
- Pawloski, L.C., Queenan, A.M., Cassiday, P.K., Lynch, A.S., Harrison, M.J., Shang, W., Williams, M.M., Bowden, K.E., Burgos-Rivera, B., Qin, X., Messonnier, N., Tondella, M.L., 2014. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 119–125.
- Petersson, C., Niedziela, T., Jachymek, W., Kenne, L., Zarzecki, P., Lugowski, C., 1997. Structural studies of the O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* strain PCM 1206 lipopolysaccharide containing D-allothreonine. *Eur. J. Biochem.* 244, 580–586.
- Pittet, L.F., Emonet, S., François, P., Bonetti, E.-J., Schrenzel, J., Hug, M., Altwegg, M., Siegrist, C.-A., Posfay-Barbe, K.M., 2014. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction. *PLoS ONE* 9, e88936.
- Pittet, L.F., Posfay-Barbe, K.M., 2015. *Bordetella holmesii* infection: current knowledge and a vision for future research. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13, 965–971.
- Polak, M., Zasada, A.A., Mosiej, E., Krysztopa-Grzybowska, K., Witkowski, L., Rzczkowska, M., Piekarska, K., Lutyńska, A., 2018. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland—a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes and Infect.*
- Preston, A., Petersen, B.O., Duus, J.Ø., Kubler-Kielb, J., Ben-Menachem, G., Li, J., Vinogradov, E., 2006. Complete structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 281, 18135–18144.
- Raetz, C.R.H., Reynolds, C.M., Trent, M.S., Bishop, R.E., 2007. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 295–329.
- Rappuoli, R., 2004. From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat. Med.* 10, 1177–1185.
- Roberts, I.S., 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 285–315.
- Rodas, C., Mamani, R., Blanco, J., Blanco, J.E., Wiklund, G., Svennerholm, A.-M., Sjöling, Å., Iniguez, V., 2011. Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 15, 132–137.
- Rodgers, L., Martin, S.W., Cohn, A., Budd, J., Marcon, M., Terranella, A., Mandal, S., Salamon, D., Leber, A., Tondella, M.-L., Tatti, K., Spicer, K., Emanuel, A., Koch, E., McGlone, L., Pawloski, L., Lemaile-Williams, M., Tucker, N., Iyer, R., Clark, T.A., Diorio, M., 2013. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010–2011. *Clin. Infect. Dis.* 56, 322–331.
- Saito, M., Odanaka, K., Otsuka, N., Kamachi, K., Watanabe, M., 2016. Development of vaccines against pertussis caused by *Bordetella holmesii* using a mouse intranasal challenge model. *Microbiol. Immunol.* 60, 599–608.
- Scheifele, D.W., Halperin, S.A., Ferguson, A.C., 2001. Assessment of injection site reactions to an acellular pertussis-based combination vaccine, including novel use of skin tests with vaccine antigens. *Vaccine* 19, 4720–4726.
- Shepard, C.W., Daneshvar, M.I., Kaiser, R.M., Ashford, D.A., Lonsway, D., Patel, J.B., Morey, R.E., Jordan, J.G., Weyant, R.S., Fischer, M., 2004. *Bordetella holmesii*

- bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin. Infect. Dis.* 38, 799–804.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., 2012. *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, 7th ed. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Spilker, T., Liwiński, A.A., LiPuma, J.J., 2008. Identification of *Bordetella* spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 504–506.
- Stark, D., Riley, L.A., Harkness, J., Marriott, D., 2007. *Bordetella petrii* from a clinical sample in Australia: isolation and molecular identification. *J. Med. Microbiol.* 56, 435–437.
- Szu, S.C., 2013. Development of Vi conjugate - a new generation of typhoid vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 12, 1273–1286.
- Szvalb, A.D., Rolston, K.V., Mori, N., Tarrand, J.J., Mulanovich, V.E., 2018. Infections with the agent of “kennel cough” in patients with cancer. *J. Infect.*
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., Ishii, S., 1982. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21, 5516–5522.
- Tatti, K.M., Sparks, K.N., Boney, K.O., Tondella, M.L., 2011. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens ▽. *J Clin Microbiol* 49, 4059–4066.
- Tatti, K.M., Wu, K.-H., Tondella, M.L., Cassiday, P.K., Cortese, M.M., Wilkins, P.P., Sanden, G.N., 2008. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61, 264–272.
- Tazato, N., Handa, Y., Nishijima, M., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J., 2015. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4830–4838.
- Tizolova, A., Guiso, N., Guillot, S., 2013. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for the biological diagnosis of pertussis syndrome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 89–96.
- Tsai, C.M., Frasch, C.E., 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119, 115–119.
- Valero-Rello, A., Henares, D., Acosta, L., Jane, M., Jordan, I., Godoy, P., Muñoz-Almagro, C., 2019. Validation and Implementation of a Diagnostic Algorithm for DNA Detection of *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* in a Pediatric Referral Hospital in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 57.
- van der Zee, A., Groenendijk, H., Peeters, M., Mooi, F.R., 1996. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 640–647.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K., Hinz, K.H., 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rügger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 849–858.
- Vandamme, P., Hommez, J., Vancanneyt, M., Monsieurs, M., Hoste, B., Cookson, B., Wirsing von König, C.H., Kersters, K., Blackall, P.J., 1995. *Bordetella hinzii* sp.

- nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 37–45.
- Vandamme, P.A., Peeters, C., Cnockaert, M., Inganäs, E., Falsen, E., Moore, E.R.B., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Spilker, T., LiPuma, J.J., 2015. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3674–3682.
- Vinogradov, E., 2007. The structure of the core-O-chain linkage region of the lipopolysaccharide from *Bordetella hinzii*. *Carbohydr. Res.* 342, 638–642.
- Vinogradov, E., 2002. Structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Bordetella hinzii*. *Carbohydr. Res.* 337, 961–963.
- Vinogradov, E., King, J.D., Pathak, A.K., Harvill, E.T., Preston, A., 2010. Antigenic Variation among *Bordetella*: *Bordetella bronchiseptica* strain MO149 expresses a novel o chain that is poorly immunogenic. *J. Biol. Chem.* 285, 26869–26877.
- Vliegenthart, J.F.G., Kamerling, J.P., 2007. 2.04 - 1H NMR Structural-Reporter-Group Concepts in Carbohydrate Analysis, in: Kamerling, H. (Ed.), *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier, Oxford, pp. 133–191.
- Volk, W. A., Salomonsky, N. L., & Hunt, D. (1972). *Xanthomonas sinensis* cell wall lipopolysaccharide. I. Isolation of 4,7-anhydro- and 4,8-anhydro-3-deoxy-octulosonic acid following acid hydrolysis of *Xanthomonas sinensis* lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 247(12), 3881–3887.
- von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R.A., Rösick, U., Göbel, U.B., Gross, R., 2001. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1257–1265.
- Wang, F., Grundmann, S., Schmid, M., Dörfler, U., Roherer, S., Charles Munch, J., Hartmann, A., Jiang, X., Schroll, R., 2007. Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere* 67, 896–902.
- Warfel, J.M., Merkel, T.J., 2013. *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* 6, 787–796.
- Warfel, J.M., Zimmerman, L.I., Merkel, T.J., 2014. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 787–792.
- Wei, S.-H., Chao, Y.-N., Huang, S.-E., Lee, T.-F., Chang, L.-Y., 2011. Adverse effects of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine in 6- to 7-year-old children. *Pediatr. Neonatol.* 52, 38–41.
- Weiss, A., 2006. The Genus *Bordetella*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer New York, New York, NY, pp. 648–674.
- Wen, Z., Zhang, J.-R., 2015. Bacterial Capsules, in: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J. (Eds.), *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 33–53.
- Wendelboe, A.M., Van Rie, A., Salmaso, S., Englund, J.A., 2005. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, S58-61.
- Westphal, O., Jann, K., 1965. Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol water and further application of procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5, 83–

91.

- Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F., Steigerwalt, A.G., O'Connor, S.P., Whitney, A.M., Daneshvar, M.I., Moss, C.W., Brenner, D.J., 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1–7.
- WHO, 2017. The Immunological Basis for Immunization Series module 4: pertussis. World Health Organization.
- WHO, 2014. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis* : update 2014 (Technical documents No. WHO/IVB/14.03). World Health Organization.
- WHO, 1991. WHO meeting on case definition of pertussis (No. MIM/EPI/PERT/91.1). Geneva : World Health Organization, Geneva.
- Woolfrey, B.F., Moody, J.A., 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 243–255.
- Yih, W.K., Silva, E.A., Ida, J., Harrington, N., Lett, S.M., George, H., 1999. *Bordetella holmesii*-Like Organisms Isolated from Massachusetts Patients with Pertussis-Like Symptoms. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 441–443.
- York, W.S., Hantus, S., Albersheim, P., Darvill, A.G., 1997. Determination of the absolute configuration of monosaccharides by 1H NMR spectroscopy of their per-O-(S)-2-methylbutyrate derivatives. *Carbohyd. Res.* 300, 199–206.
- Zaia, J., 2004. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev* 23, 161–227.
- Zhang, X., Weyrich, L.S., Lavine, J.S., Karanikas, A.T., Harvill, E.T., 2012. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1771–1779.
- Zintgraff, J., Irazu, L., Lara, C.S., Rodriguez, M., Santos, M., 2018. The classical *Bordetella* species and MALDI-TOF technology: a brief experience. *J. Med. Microbiol.* 67, 1737–1742.

11.SPIS RYCIN I TABEL

Ryc. 1. Przebieg krztuśca wg WHO 2014	19
Ryc. 2. Budowa osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych	31
Ryc. 3. Ogólna budowa lipopolisacharydu; P-reszty fosforanowe, Hep-heptoza, Kdo-kwas 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowy, GlcN-glukozamina, Glc-glukoza, GlcA-kwas glukuronowy, GlcNAc-N-acetyloglukozamina, Gal-galaktoza, GalN-galaktozamina	32
Ryc. 4. Struktura LOS <i>B. pertussis</i> 1414 (Caroff i in., 2000).....	35
Ryc. 5. Porównanie LPS wybranych bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i> wg Preston i wsp. 2006 oraz Vinogradov 2002, 2007.....	37
Ryc. 6. Stan epidemiologiczny krztuśca w Polsce w latach 1950-2017 (Źródło danych: biuletyny roczne „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce” oraz „Szczepienia ochronne w Polsce” (wyd: NIZP-PZH, GIS). Data ostatniej aktualizacji 02.01.2020 http://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/krztusiec/3/#jak-wiele-zachorowan-na-krztusiec-wystepuje-w-Polsce)	40
Ryc. 7. Schemat blokowy pomiaru za pomocą spektrometru masowego.....	46
Ryc. 8. Przykładowe korelacje możliwe do zaobserwowania na dwuwymiarowych widmach protonowych podczas analizy poli- i oligosacharydów. Kolorem czerwonym zaznaczono korelacje dla eksperymentu COSY, niebieskim dla TOCSY, a zielonym dla NOESY	50
Ryc. 9. Przykładowe korelacje możliwe do zaobserwowania na dwuwymiarowych widmach protonowo - węglowych podczas analizy oligosacharydów. Kolorem fioletowym zaznaczono korelacje dla eksperymentu HSQC, różowym dla HMBC, a brązowym dla HSQC-TOCSY	51
Ryc. 10. Profil jednowymiarowego widma ¹ H NMR oligosacharydu.....	51
Ryc. 11. Gęstość optyczna [OD] hodowli bakteryjnych <i>B. pertussis</i> 186 (Bp186), <i>B. pertussis</i> 606 (Bp606), <i>B. parapertussis</i> 529 (Bpp529), <i>B. holmesii</i> (Bhol) <i>B. bronchiseptica</i> 530 (Bb530), <i>B. bronchiseptica</i> 1943 (Bb1943) prowadzonych przez 72 h w probówkach typu Schott.....	69
Ryc. 12. Wzrost <i>B. holmesii</i> na pożywce BHI w bioreaktorze. Wskaźniki pomiarowe – pH i poziom natlenowania medium pO ₂ [%].....	70
Ryc. 13. <i>B. holmesii</i> ATCC 51541. Ryc. A i C szerokość pola widzenia FOV 2,8 μm, powiększenie 100 000x, wskaźnik skali 200 nm, detektor Everhard - Thornley. Ryc. B i D szerokość pola widzenia FOV 2,0 μm, powiększenie 150 000x, wskaźnik skali 100 nm, detektor InLens SE1.....	71
Ryc. 14. Analiza reaktywności przeciwciał z wybranymi glikokoniugatami (penta-PT, OS-PT, disach-HSA), LPS <i>P. shigelloides</i> 78/89, LPS <i>E. coli</i> R3 oraz antygenem Vi	73
Ryc. 15. Reakcja króliczych surowic anty-glikokoniugatowych z LPS wybranych bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	74
Ryc. 16. Rozdział elektroforetyczny LPS bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i> . Od lewej: <i>B. pertussis</i> 186 (Bp186), <i>B. pertussis</i> 606 (Bp606), <i>B. parapertussis</i> 529 (Bpp529), <i>B. bronchiseptica</i> 1943 (Bb1943), <i>B. bronchiseptica</i> 530 (Bb530), <i>B. holmesii</i> (Bhol_2017, Bhol_2018, Bhol_2019 faza wodna – fw, międzyfaza – mf oraz faza fenolowa – ff).....	75
Ryc. 17. Zestawienie blotów po rozdziale elektroforetycznym i transferze na membrany nitrocelulozowe inkubowanych z surowicami: anty-Bp miks (A), anty-OS-PT (B) oraz anty-penta-PT (C).....	77

SPIS RYCIN I TABEL

Ryc. 18. Zestawienie blotów po rozdiale elektroforetycznym LPS <i>B. holmesii</i> inkubowanych z poliklonalnymi surowicami króliczymi: anti-SM Bp186 (A), anti-SM Bp miks (B), anti-OS-PT (C) oraz anti-penta-PT (D).....	78
Ryc. 19. Rozdział hydrolizatów heteropolisacharydów bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i> : <i>B. pertussis</i> 606 (A), <i>B. pertussis</i> 186 (B), <i>B. bronchiseptica</i> 530 (C), <i>B. bronchiseptica</i> 1943 (D), <i>B. parapertussis</i> 529 (E) i <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 (F) na kolumnie filtracji żelowej Superdex 30 pg. Chromatogramy rejestrowano refraktometrycznie. Niebieskim kolorem zaznaczono główne frakcje OS rdzenia...	79
Ryc. 20. Porównanie profili jednowymiarowych widm NMR dla głównych oligosacharydowych frakcji analizowanych bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	80
Ryc. 21. Jednowymiarowe widmo ³¹ P dla głównych oligosacharydowych frakcji analizowanych bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	82
Ryc. 22. Fragment widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT głównej frakcji (fr. VI) po rozdiale hydrolizatu OS <i>B. pertussis</i> 606.....	83
Ryc. 23. Struktura OS <i>B. pertussis</i> 606	86
Ryc. 24. Fragmenty widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT frakcji VII po rozdiale hydrolizatu OS <i>B. pertussis</i> 186.....	87
Ryc. 25. Struktura OS <i>B. pertussis</i> 186	88
Ryc. 26. Fragment widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT frakcji III po rozdiale hydrolizatu PS <i>B. bronchiseptica</i> 530	89
Ryc. 27. Fragment widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT głównej frakcji (fr. V) po rozdiale hydrolizatu PS <i>B. bronchiseptica</i> 1943.....	90
Ryc. 28. Fragment widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT frakcji VII po rozdiale hydrolizatu PS <i>B. parapertussis</i> 529	92
Ryc. 29. Struktura OS <i>Bordetellae</i> z zaznaczonym minimalnym OS struktury we wszystkich analizowanych gatunkach i szczepach. * w krótszej formie OS <i>B. parapertussis</i> 529 reszta α-D-GalpNA jest zastąpiona przez α-D-GlcpN.....	93
Ryc. 30. Widma MALDI-TOF MS lipidu A <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 z różnych preparacji LPS. Widma uzyskano w trybie reflektromu polaryzacji ujemnej z użyciem DHB jako matrycy.....	94
Ryc. 31. Struktura lipidu A <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	95
Ryc. 32. Rozdział hydrolizatu PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 na kolumnie filtracji żelowej Superdex 30 pg. Pomiar rejestrowano refraktometrycznie.....	95
Ryc. 33. Fragment widma MALDI-TOF MS fr. VIII OS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 w trybie reflektromu polaryzacji dodatkowo z użyciem THAP jako matrycy	96
Ryc. 34. Fragment widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT frakcji VIII po rozdiale hydrolizatu heteropolisacharydu <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	97
Ryc. 35. Struktura OS rdzenia <i>B. holmesii</i> ATCC 51541.....	98
Ryc. 36. Chromatogram lotnych pochodnych składników cukrowych otrzymanych w wyniku analizy cukrowej PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	99
Ryc. 37. Fragment widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT O-polisacharydu (frakcji I) po rozdiale hydrolizatu PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	100
Ryc. 38. Widma NMR O - PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 ¹ H, ¹ H NOESY (A) i ¹ H, ¹³ C HMBC (B). Kolorem czerwonym zaznaczono połączenia pomiędzy monosacharydowymi składnikami podjednostki.....	102
Ryc. 39. Widmo MALDI TOF MS w trybie reflektromu polaryzacji dodatkowo z wykorzystaniem matrycy DHB, wykonane w 26 dniu eksperymentu, w którym O - PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 poddano hydrolizie 48% HF, w temp. -20°C.....	103
Ryc. 40. Powiększony fragment widma MALDI TOF MS w trybie reflektromu polaryzacji dodatkowo z wykorzystaniem matrycy DHB, wykonanego w 26 dniu eksperymentu, w	

SPIS RYCIN I TABEL

którym O - PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 poddano hydrolizie 48% HF, w temp. - 20°C, w zakresie <i>m/z</i> 899-1776, interpretacja jonów w Tabeli 13.....	104
Ryc. 41. Struktura powtarzającej się podjednostki antygeny O <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	105
Ryc. 42. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. holmesii</i> na kolumnie filtracji żelowej. Rozdział monitorowano refraktometrycznie, na dolnym panelu przedstawiono rozdział w zmniejszonej skali.....	107
Ryc. 43. Profile jednowymiarowych widm NMR analizowanych egzopolisacharydowych frakcji I (A) oraz frakcji III (B) wyizolowanych z medium pochodowlanego <i>B. holmesii</i> ATCC 51541, z dodatkowym widmem MALDI-TOF MS dla frakcji III (C) wykonanym w trybie reflektrom polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą....	109
Ryc. 44. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. pertussis</i> 186 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę	110
Ryc. 45. Porównanie profili ¹ H NMR analizowanych egzopolisacharydowych frakcji I <i>B. pertussis</i> 186 (A) i <i>B. holmesii</i> (B) oraz frakcji III <i>B. pertussis</i> 186 (C) i <i>B. holmesii</i> (D), z dodatkowymi widmami MALDI-TOF MS dla frakcji III <i>B. pertussis</i> 186 (E) i <i>B. holmesii</i> (F) wykonanymi w trybie reflektrom polaryzacji ujemnej.....	111
Ryc. 46. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. pertussis</i> 606 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę	112
Ryc. 47. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. parapertussis</i> 529 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę	113
Ryc. 48. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. bronchiseptica</i> 530 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę	113
Ryc. 49. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. bronchiseptica</i> 1943 na kolumnie filtracji żelowej, rozdział monitorowano refraktometrycznie zmniejszając skalę	114
Ryc. 50. Porównanie profili jednowymiarowych widm ¹ H NMR dla frakcji III ze wszystkich rozdziałów medium pochodowlanych bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	114
Ryc. 51. Fragmenty widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT frakcji I z rozdziału medium pochodowlanego <i>B. holmesii</i>	116
Ryc. 52. Widma NMR egzopolisacharydowej fr. I <i>B. holmesii</i> ¹ H, ¹ H NOESY (A) i ¹ H, ¹³ C HMBC (B) bez rozprzęgania. Kolorem czerwonym zaznaczono połączenia pomiędzy resztami	118
Ryc. 53. Fragment widma MALDI-TOF MS frakcji III po rozdziale chromatograficznym medium pochodowlanego <i>B. pertussis</i> 186 w trybie reflektrom polaryzacji dodatniej	119
Ryc. 54. Widmo ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT dla egzopolisacharydowej frakcji III <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	121
Ryc. 55. Widmo ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT egzopolisacharydowej frakcji III <i>B. pertussis</i> 186	122
Ryc. 56. Fragmenty widm NMR egzopolisacharydowej fr. III <i>B. holmesii</i> ¹ H, ¹ H NOESY (A) i ¹ H, ¹³ C HMBC bez rozprzęgania (B). Kolorem niebieskim zaznaczono połączenia pomiędzy resztami	124
Ryc. 57. Rozdział chromatograficzny preparatu BOS <i>B. pertussis</i> 186 po redukcji, rozdział monitorowano refraktometrycznie	127

SPIS RYCIN I TABEL

Ryc. 58. Region anomeryczny widm ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT NMR zredukowanego BOS dla <i>B. pertussis</i> 186 (A) i <i>B. holmesii</i> (B).....	127
Ryc. 59. Fragment widma MALDI-TOF MS fr. III <i>B. holmesii</i> (A), <i>B. pertussis</i> 186 (B) oraz BOS <i>B. holmesii</i> po redukcji (C). Widma wykonano w trybie liniowym polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.....	129
Ryc. 60. Fragment widma ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT frakcji III <i>B. pertussis</i> 186 przed (sygnały w kolorze niebiesko-czerwonym, pH~5) i po N-acetylacji (sygnały w kolorze zielono-różowym, pH~9).....	130
Ryc. 61. Fragment widma korelacji ^1H , ^{15}N frakcji III <i>B. holmesii</i> . Oznaczono obserwowane dublety pochodzące od sygnałów grup CONH_2 reszt F i H. Uzyskane widma nie pozwoliły na ich jednoznaczne przypisanie do odpowiednich reszt.....	131
Ryc. 62. Zebrane widma masowe frakcji III po rozdziale chromatograficznym mediów pochodowlanych <i>B. pertussis</i> 186, <i>B. pertussis</i> 606, <i>B. parapertussis</i> 529, <i>B. holmesii</i> <i>B. bronchiseptica</i> 1943 oraz <i>B. bronchiseptica</i> 530 *oś y to intensywność sygnałów.....	132
Ryc. 63. Widmo ESI MS frakcji III po rozdziale chromatograficznym medium pochodowlanego <i>B. holmesii</i>	133
Ryc. 64. Widmo fragmentacyjne MALDI-TOF MS jonu o m/z 1234,4 wykonane w trybie reflektrom polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.....	134
Ryc. 65. Chromatogram lotnych pochodnych składników cukrowych otrzymanych w wyniku analizy cukrowej fr. III <i>B. holmesii</i>	135
Ryc. 66. Chromatogram lotnych pochodnych składników cukrowych otrzymanych w wyniku analizy metylacyjnej BOS <i>B. holmesii</i>	136
Ryc. 67. Widmo masowe 1-O-Ac-2,3,4,5,6-penta-O-Me-glucitolu.....	137
Ryc. 68. Widmo masowe 3,5-di-O-Ac-2-N-Ac-1,4,6-tri-O-2-N-Me-glucitolu.....	137
Ryc. 69. Widmo masowe 1,3,5-tri-O-Ac-2-N-Ac-4,6-di-O-2-N-Me-glucitolu.....	138
Ryc. 70. Widmo masowe 1,5,6-tri-O-Ac-2,3,4-tri-O-Me-glucitolu oraz 1,4,5-tri-O-Ac-2,3,6-tri-O-Me-glucitolu.....	138
Ryc. 71. Zaproponowana struktura BOS bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	139
Ryc. 72. Analiza serologiczna egzopolisacharydów (fr. I oraz fr. III) bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i> z surowicami króliczymi z kolekcji laboratorium.....	140
Ryc. 73. Fragment widma ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT z profilem ^1H NMR fr. V z rozdziału chromatograficznego medium <i>B. holmesii</i>	142
Ryc. 74. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. petrii</i> rejestrowany refraktometrycznie na kolumnie filtracji żelowej z dodatkowym widmem MALDI-TOF MS dla frakcji III. Widmo uzyskano w trybie reflektrom polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.....	143
Ryc. 75. Rozdział chromatograficzny medium pochodowlanego <i>B. hinzii</i> rejestrowany refraktometrycznie na kolumnie filtracji żelowej z dodatkowym widmem MALDI-TOF MS dla frakcji III. Widmo uzyskano w trybie reflektrom polaryzacji ujemnej z DHB jako matrycą.....	144
Ryc. 76. Analiza serologiczna egzopolisacharydów (frakcja I oraz frakcja III) <i>B. hinzii</i> oraz <i>B. petrii</i> z surowicami króliczymi z kolekcji laboratorium.....	144
Ryc. 77. Chromatograficzny rozdział preparatu toksoidu tężca (Biomed, Kraków) na kolumnie filtracji żelowej TSK gel G3000SW, pomiar rejestrowano przy długości fali 280 nm.....	145
Ryc. 78. Schemat reakcji redukcji oraz utleniania dla BOS.....	146

SPIS RYCIN I TABEL

Ryc. 79. Rozdział chromatograficzny BOS <i>B. pertussis</i> 186 po utlenianiu 0,1 M NaIO ₄ na kolumnie filtracji żelowej TSK gel G3000PW (pomiar rejestrowano refraktometrycznie).....	147
Ryc. 80. Region anomeryczny widma ¹ H, ¹³ C HSQC-DEPT NMR utlenionego BOS <i>B. pertussis</i> 186.....	147
Ryc. 81. Izolacja glikokoniugatu BOS-TTd zastosowaniem filtracji żelowej na kolumnie TSK gel G3000SW. Profil chromatograficzny rejestrowano przez pomiar absorbancji przy 280 nm.	148
Ryc. 82. Izolacja glikokoniugatu BOS-TTd z zastosowaniem filtracji żelowej na kolumnie TSK gel G3000SW. Profil chromatograficzny rejestrowano refraktometrycznie.	148
Ryc. 83. Porównanie profili elucji glikokoniugatów penta-TTd (A), BOS-TTd (B) oraz monomerycznej frakcji TTd (C) na kolumnie filtracji żelowej, przy długości fali 280 nm.	149
Ryc. 84. Dot blot glikokoniugatu BOS-TTd (fr. I) z wybranymi surowicami	150
Ryc. 85. Porównanie profili widm NMR w zakresie 5,5-6,5 ppm dla O-(S)-2-metylomaślanowych pochodnych standardów cukrowych oraz PS <i>B. holmesii</i> i egzopolisacharydowej fr. III <i>B. holmesii</i> . Znaki „ ^o ”, „*”, „^” wskazują które sygnały ze standardów można zidentyfikować w polisacharydach. Sygnały dla standardu D-Glc „[]” mają podobny profil do profili polisacharydów, ale wartości przesunięć różnią się.	152
Ryc. 86. Porównanie profili widm NMR w zakresie 5,5-6,5 ppm dla O-(S)-2-metylomaślanowych pochodnych PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541, egzopolisacharydowej fr. III <i>B. holmesii</i> ATCC 51541, D-Glc oraz L-Glc	154
Ryc. 87. Pełna struktura OS <i>B. pertussis</i> 186 z zaznaczoną kolorem minimalną strukturą OS rdzenia zidentyfikowaną u wszystkich analizowanych szczepów <i>Bordetellae</i> . 168	
Ryc. 88. Podjednostka PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	169
Ryc. 89. BOS <i>Bordetella oligosaccharide</i>	170
Tabela 1. Morfologia bakterii z klastra <i>B. bronchiseptica</i>	27
Tabela 2. Sekwencje docelowe w DNA klastra <i>B. bronchiseptica</i>	29
Tabela 3. Antygeny klastra <i>B. bronchiseptica</i>	30
Tabela 4. Warunki wzrostu bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	53
Tabela 5. Składy pożywek do hodowli bakterii z rodzaju <i>Bordetella</i>	54
Tabela 6. Skład żeli elektroforetycznych stosowanych w elektroforezie preparatów LPS60	
Tabela 7. Skład buforów stosowanych w elektroforezie preparatów LPS oraz w teście immunoblotingu.....	60
Tabela 8. Porównanie wzrostu <i>B. holmesii</i> na syntetycznych mediach hodowlanych (250 ml).....	70
Tabela 9. Wartości średnie ¹ H, ¹³ C przesunięć chemicznych dla OS analizowanych <i>Bordetellae</i>	84
Tabela 10. Połączenia między resztami cukrowymi obserwowane w eksperymentach ¹ H, ¹ H NOESY i ¹ H, ¹³ C HMBC dla OS <i>B. pertussis</i> 606.....	85
Tabela 11. Przesunięcia chemiczne O - PS <i>Bordetella holmesii</i> ATCC 51541.....	99
Tabela 12. Połączenia między resztami cukrowymi obserwowane w eksperymentach ¹ H, ¹ H NOESY i ¹ H, ¹³ C HMBC dla PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541	101
Tabela 13. Interpretacja zidentyfikowanych jonów obserwowanych w widmie masowym MALDI TOF MS wybranej podjednostki PS <i>B. holmesii</i> ATCC 51541 w zakresie m/z 899-1776.....	104

SPIS RYCIN I TABEL

Tabela 14. Masowe ilości zebranych frakcji w poszczególnych rozdzielach chromatograficznych zebranych z hodowli ok 250 ml.....	115
Tabela 15. Przesunięcia chemiczne dla egzopolisacharydowej frakcji I <i>B. holmesii</i>	117
Tabela 16. ^1H , ^{13}C przesunięcia chemiczne BOS <i>Bordetellae</i> . Widma zarejestrowano w D_2O w temp. 298 K i skalibrowano na sygnał acetonu δ_{C} 31,05 ppm/ δ_{H} 2,225 ppm. Mniejszą czcionką podano odchylenia standardowe sygnałów pomiędzy widmami zarejestrowanymi dla różnych gatunków.....	122
Tabela 17. Połączenia między resztami cukrowymi obserwowane w eksperymentach ^1H , ^1H NOESY i ^1H , ^{13}C HMBC dla BOS <i>Bordetellae</i>	125
Tabela 18. Przesunięcia chemiczne dla zredukowanej reszty D/K.....	128
Tabela 19. Przesunięcia chemiczne utlenionej reszty D/K.....	147

12. MATERIAŁY DODATKOWE

Tabela S 1. Tabela wartości przesunięć chemicznych ^1H , ^{13}C dla OS analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Widma zarejestrowano w D_2O w temp. 298 K i skalibrowano na sygnał HOD

Symbol literowy	Reszta	Bakteria	Atom	1	2 (3ax)	3 (3eq)	4	5	6a	7a (6b)	8a (7b)	8b
Kdo	4,7-anhKdof	Bp186	^1H			3,11	4,39	4,02	4,14	3,89	3,66	3,60
Kdo	4,7-anhKdof	Bp186	^{13}C		203,2	42,8	77,4	83,7	75,4	83,6	61,1	
Kdo	4,7-anhKdof	Bp606	^1H			3,12	4,38	4,02	4,13	3,89	3,66	3,60
Kdo	4,7-anhKdof	Bp606	^{13}C		203,1	42,9	77,4	83,7	75,4	83,6	61,1	
Kdo	4,7-anhKdof	Bb530	^1H				4,35	4,00	4,15	3,89	3,64	3,58
Kdo	4,7-anhKdof	Bb530	^{13}C		201,7		77,2	83,4	75,4	83,6	61,2	
Kdo	4,7-anhKdof	Bb1943	^1H			3,12	4,35	4,00	4,14	3,88	3,63	3,57
Kdo	4,7-anhKdof	Bb1943	^{13}C			42,8	77,3	83,3	75,3	83,7	61,1	
Kdo	4,7-anhKdof	Bpp529	^1H				4,39	4,02	4,15	3,89		
Kdo	4,7-anhKdof	Bpp529	^{13}C				77,3	84,5	75,7	83,8		
Kdo	4,7-anhKdof	Bhol	^1H			3,12	4,39	4,02	4,14	3,89	3,66	3,60
Kdo	4,7-anhKdof	Bhol	^{13}C		202,9	42,8	77,4	83,8	75,4	83,7	61,1	
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bp186	^1H			3,11	4,51	4,12	4,08	3,74	3,67	3,58
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bp186	^{13}C		203,2	38,9	75,7	80,1	74,7	84,8	61,7	
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bp606	^1H			3,11	4,50	4,12	4,08	3,74	3,67	3,58
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bp606	^{13}C		203,3	39,1	75,7	80,2	74,7	84,8	61,8	
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bb530	^1H				4,51	4,12	4,08	3,73	3,67	3,58
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bb530	^{13}C		201,7		75,5	79,8	74,6	84,7	61,8	
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bb1943	^1H			3,10	4,51	4,11	4,07	3,73	3,66	3,57
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bb1943	^{13}C			38,9	75,6	79,8	74,6	84,7	61,8	
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bpp529	^1H				4,51	4,12	4,09	3,74	3,65	3,58
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bpp529	^{13}C				75,6	80,4	74,7	84,7	61,7	
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bhol	^1H			3,09	4,51	4,12	4,08	3,74	3,67	3,58
Kdo'	4,7-anhKdof'	Bhol	^{13}C		203,2	38,8	75,8	80,2	74,7	84,8	61,8	
A	4- α -D-GlcpN	Bp186	^1H	5,45	3,26	3,87	3,56	3,86	3,98	3,73		
A	4- α -D-GlcpN	Bp186	^{13}C	97,4	54,3	68,7	78,3	70,5	67,0			
A	4- α -D-GlcpN	Bp606	^1H	5,47	3,31	3,94	3,63	3,73	3,78	3,73		
A	4- α -D-GlcpN	Bp606	^{13}C	97,4	54,5	70,3	74,9	71,9	60,5			
A	4- α -D-GlcpN	Bb530	^1H									

MATERIAŁY DODATKOWE

A	4- α -D-GlcpN	Bb530	¹³ C									
A	4- α -D-GlcpN	Bb1943	¹ H									
A	4- α -D-GlcpN	Bb1943	¹³ C									
A	4- α -D-GlcpN	Bpp529	¹ H	5,34	3,00	3,65	3,38	3,61	3,79	3,71		
A	4- α -D-GlcpN	Bpp529	¹³ C	98,9	54,8	73,0	69,6	73,8	60,2			
A	4- α -D-GlcpN	Bhol	¹ H	5,48	3,33	3,94	3,63	3,74	3,78	3,73		
A	4- α -D-GlcpN	Bhol	¹³ C	97,3	54,5	70,3	74,9	71,9	60,5			
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bp186	¹ H	5,38	3,91	3,90	3,85	3,45	4,18	3,71		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bp186	¹³ C	99,7	79,6	70,5	66,6	72,2	68,0	70,3		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bp606	¹ H	5,38	3,86	3,90	3,84	3,46	4,18	3,70		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bp606	¹³ C	99,7	79,9	70,5	66,6	72,2	68,0	70,3		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bb530	¹ H	5,40	4,01	3,96	4,35	3,62	4,24	3,74		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bb530	¹³ C	99,7	79,7	69,7	71,2	71,4	67,8	69,1		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bb1943	¹ H	5,40	3,95	3,91	4,10	3,62	4,20	3,74		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bb1943	¹³ C	99,8	80,0	70,2	68,9	71,4	67,9	69,4		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bpp529	¹ H	5,26	4,21	4,06	4,31	3,60	4,28	3,72		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bpp529	¹³ C	100,4	77,1	70,8	70,1	71,7	67,8	69,2		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bhol	¹ H	5,39	3,85	3,91	3,84	3,45	4,17	3,70		
B	2,7-L- α -D-Hepp	Bhol	¹³ C	99,7	79,8	70,4	66,5	72,1	67,9	70,3		
C	L- α -D-Hepp	Bp186	¹ H	4,84	3,97	3,77	3,78	3,63	3,92	3,62		
C	L- α -D-Hepp	Bp186	¹³ C	103,1	70,1	70,5	66,0	72,2	68,4	62,5		
C	L- α -D-Hepp	Bp606	¹ H	5,27	3,96	3,64	3,78	3,55	3,90	3,65	3,62	
C	L- α -D-Hepp	Bp606	¹³ C	101,2	70,1	70,3	65,8	72,5	68,5	62,5		
C	L- α -D-Hepp	Bb530	¹ H	5,30	3,95	3,73	3,87	3,53	4,00	3,60		
C	L- α -D-Hepp	Bb530	¹³ C	100,4	70,6	71,8	65,3	72,5	68,2	62,4		
C	L- α -D-Hepp	Bb1943	¹ H	5,29	3,95	3,71	3,86	3,53	3,98	3,60		
C	L- α -D-Hepp	Bb1943	¹³ C	100,3	70,4	72,0	65,2	72,5	68,1	62,4		
C	L- α -D-Hepp	Bpp529	¹ H									
C	L- α -D-Hepp	Bpp529	¹³ C									
C	L- α -D-Hepp	Bhol	¹ H	5,27	3,96	3,74	3,81	3,54	3,94	3,62		
C	L- α -D-Hepp	Bhol	¹³ C	101,2	70,1	70,5	65,9	72,5	68,5	62,7		
D	α -D-GalpNA	Bp186	¹ H	5,16	3,47	4,03	4,18	4,29				
D	α -D-GalpNA	Bp186	¹³ C	94,3	50,5	66,7	69,7	72,3	174,6			
D	α -D-GalpNA	Bp606	¹ H	5,16	3,44	4,03	4,15	4,33				
D	α -D-GalpNA	Bp606	¹³ C	94,5	50,5	66,7	69,7	72,3	175,1			
D	α -D-GalpNA	Bb530	¹ H	5,22	3,49	4,07	4,23	4,52				

MATERIAŁY DODATKOWE

D	α -D-GalpNA	Bb530	¹³ C	94,9	50,3	66,1	69,1	71,3	172,9			
D	α -D-GalpNA	Bb1943	¹ H	5,20	3,47	4,06	4,21	4,50				
D	α -D-GalpNA	Bb1943	¹³ C	94,8	50,3	66,2	69,2	71,3	173,3			
D	α -D-GalpNA	Bpp529	¹ H									
D	α -D-GalpNA	Bpp529	¹³ C									
D	α -D-GalpNA	Bhol	¹ H	5,17	3,47	4,04	4,16	4,33				
D	α -D-GalpNA	Bhol	¹³ C	94,4	50,5	66,7	69,7	72,3	175,1			
E	α -D-GlcpN	Bp186	¹ H	5,11	3,26	3,86	3,44	3,69	3,78	3,72		
E	α -D-GlcpN	Bp186	¹³ C	96,0	54,2	69,8	69,4	72,2	60,2			
E	α -D-GlcpN	Bp606	¹ H	5,12	3,28	3,85	3,45	3,70	3,78	3,72		
E	α -D-GlcpN	Bp606	¹³ C	96,0	54,1	69,8	69,4	72,2	60,2			
E	α -D-GlcpN	Bb530	¹ H	5,13	3,26	3,84	3,42	3,66	3,78	3,72		
E	α -D-GlcpN	Bb530	¹³ C	95,5	54,1	69,8	69,4	72,0	60,2			
E	α -D-GlcpN	Bb1943	¹ H	5,12	3,26	3,82	3,43	3,67	3,77	3,72		
E	α -D-GlcpN	Bb1943	¹³ C	95,5	54,1	69,9	69,3	72,2	60,2			
E	α -D-GlcpN	Bpp529	¹ H	5,10	3,11	3,78	3,40	4,01	3,81	3,72		
E	α -D-GlcpN	Bpp529	¹³ C	96,3	54,3	70,9	69,6	73,7	60,3			
E	α -D-GlcpN	Bhol	¹ H	5,12	3,28	3,86	3,44	3,70	3,78	3,72		
E	α -D-GlcpN	Bhol	¹³ C	96,0	54,1	69,8	69,4	72,2	60,2			
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bp186	¹ H	5,07	3,91	3,88	4,17	3,52	3,96	3,67	3,65	
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bp186	¹³ C	97,7	73,3	79,7	72,1	71,3	68,9	62,8		
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bp606	¹ H	5,07	3,90	3,84	4,23	3,54	3,95	3,67	3,65	
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bp606	¹³ C	97,7	73,5	79,9	71,7	71,3	68,9	62,7		
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bb530	¹ H	5,07	3,89	3,97	4,17	3,65	3,98	3,67	3,63	
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bb530	¹³ C	97,5	74,8	79,8	72,5	71,4	68,2	62,6		
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bb1943	¹ H	5,07	3,87	3,97	4,17	3,65	3,96	3,66	3,63	
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bb1943	¹³ C	97,5	74,5	79,9	72,4	71,4	68,1	62,6		
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bpp529	¹ H	5,05	3,91	4,18	4,03	3,53	4,10	3,65	3,61	
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bpp529	¹³ C	98,3	70,4	77,8	74,4	71,4	68,0	62,7		
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bhol	¹ H	5,07	3,90	3,84	4,23	3,53	3,93	3,67	3,65	
F	3,4-L- α -D-Hepp	Bhol	¹³ C	97,8	73,3	76,7	71,7	71,4	68,9	62,7		
H	α -D-GlcpA	Bp186	¹ H	4,97	3,52	3,67	3,39	4,03				
H	α -D-GlcpA	Bp186	¹³ C	100,9	72,0	71,5	72,2	73,8				
H	α -D-GlcpA	Bp606	¹ H	4,97	3,52	3,69	3,39	4,04				
H	α -D-GlcpA	Bp606	¹³ C	101,0	71,9	71,6	72,3	73,8	176,6			
H	α -D-GlcpA	Bb530	¹ H	4,97	3,53	3,73	3,47	4,27				

MATERIAŁY DODATKOWE

H	α -D-GlcpA	Bb530	¹³ C	100,9	71,6	72,6	71,6	71,8	173,5			
H	α -D-GlcpA	Bb1943	¹ H	4,94	3,52	3,68	3,47	4,25				
H	α -D-GlcpA	Bb1943	¹³ C	100,9	71,6	72,5	71,5	71,8	173,3			
H	α -D-GlcpA	Bpp529	¹ H	5,10	3,48	3,75	3,37	4,00				
H	α -D-GlcpA	Bpp529	¹³ C	100,3	72,1	72,7	72,5	73,7	176,4			
H	α -D-GlcpA	Bhol	¹ H	4,99	3,52	3,68	3,39	4,03				
H	α -D-GlcpA	Bhol	¹³ C	101,0	71,9	71,6	72,3	73,8	176,6			
I	α -D-GlcpA	Bp186	¹ H	4,94	3,51	3,66	3,38	4,02				
I	α -D-GlcpA	Bp186	¹³ C	101,0	72,1	71,5	72,2	73,9	176,6			
I	α -D-GlcpA	Bp606	¹ H	4,96	3,51	3,67	3,37	4,01				
I	α -D-GlcpA	Bp606	¹³ C	101,1	72,1	71,5	72,2	73,8	176,7			
I	α -D-GlcpA	Bb530	¹ H	4,94	3,52	3,72	3,46	4,24				
I	α -D-GlcpA	Bb530	¹³ C	100,9	71,7	72,4	71,7	71,8	174,2			
I	α -D-GlcpA	Bb1943	¹ H	4,92	3,52	3,68	3,46	4,23				
I	α -D-GlcpA	Bb1943	¹³ C	100,9	71,7	72,4	71,6	71,9	173,7			
I	α -D-GlcpA	Bpp529	¹ H	5,04	3,48	3,75	3,37	4,00				
I	α -D-GlcpA	Bpp529	¹³ C	100,5	72,1	72,7	72,5	73,7	176,4			
I	α -D-GlcpA	Bhol	¹ H	4,95	3,52	3,67	3,38	4,01				
I	α -D-GlcpA	Bhol	¹³ C	101,2	72,1	71,6	72,2	73,9	176,7			
J	4,6- β -D-Glcp	Bp186	¹ H	4,38	3,28	3,55	3,40	3,68	3,75	3,89		
J	4,6- β -D-Glcp	Bp186	¹³ C	101,7	73,4	76,2	79,0	72,9	66,9			
J	4,6- β -D-Glcp	Bp606	¹ H	4,39	3,27	3,56	3,44	3,67	3,76	3,89		
J	4,6- β -D-Glcp	Bp606	¹³ C	101,4	73,4	76,4	78,9	72,9	67,2			
J	4,6- β -D-Glcp	Bb530	¹ H	4,39	3,24	3,37	3,54	3,21	3,81	3,88		
J	4,6- β -D-Glcp	Bb530	¹³ C	102,4	73,4	75,9	74,5	70,3	67,7			
J	4,6- β -D-Glcp	Bb1943	¹ H	4,38	3,22	3,37	3,53	3,21	3,79	3,87		
J	4,6- β -D-Glcp	Bb1943	¹³ C	102,2	73,4	75,9	74,6	70,3	67,7			
J	4,6- β -D-Glcp	Bpp529	¹ H	4,36	3,31	3,60	3,43	3,67	3,95	3,79		
J	4,6- β -D-Glcp	Bpp529	¹³ C	103,0	73,0	76,3	79,2	71,3	66,3			
J	4,6- β -D-Glcp	Bhol	¹ H	4,40	3,27	3,55	3,44	3,66	3,76	3,89		
J	4,6- β -D-Glcp	Bhol	¹³ C	101,4	73,4	76,4	79,0	73,0	67,3			
L	4- β -D- Manp2NAc3NAcA	Bp186	¹ H	4,96	4,21	4,18	3,81	3,86				
L	4- β -D- Manp2NAc3NAcA	Bp186	¹³ C	99,6	51,4	53,1	78,5	70,4	174,7			
M	3- β -L- Fucp2NAc4NMe	Bp186	¹ H	4,49	3,66	4,08	3,67	3,95	1,36			

MATERIAŁY DODATKOWE

M	3-β-L-Fucp2NAc4NMe	Bp186	¹³ C	100,6	50,7	78,1	62,2	67,7	16,4			
N	α-D-GlcpNAc	Bp186	¹ H	5,02	3,73	3,59	3,39	3,62	3,73	3,68		
N	α-D-GlcpNAc	Bp186	¹³ C	96,6	53,4	70,4	69,4	71,7	59,8			
E'	α-D-GlcpN	Bb530	¹ H	5,15	3,30	3,86	3,42	3,69				
E'	α-D-GlcpN	Bb530	¹³ C	95,3	54,1	69,9	69,4	72,2				
E'	α-D-GlcpN	Bb1943	¹ H	5,14	3,30	3,84	3,41	3,66				
E'	α-D-GlcpN	Bb1943	¹³ C	95,2	54,1	69,9	69,4	72,2				
S	α-D-GlcpN	Bpp529	¹ H	4,90	2,67	3,71	3,28	3,63	3,78	3,71		
S	α-D-GlcpN	Bpp529	¹³ C	96,6	54,9	72,6	70,1	71,6	60,5			
EtN		Bp186	¹ H	3,16	3,97							
EtN		Bp186	¹³ C	40,2	61,0							
EtN		Bp606	¹ H	3,13								
EtN		Bp606	¹³ C	40,5								
EtN		Bb530	¹ H	3,17	3,99							
EtN		Bb530	¹³ C	40,1	61,4							
EtN		Bb1943	¹ H	3,16	3,99							
EtN		Bb1943	¹³ C	40,0	61,4							
EtN'		Bp606	¹ H	3,18								
EtN'		Bp606	¹³ C	39,8								
EtN'		Bb530	¹ H	3,19	4,09							
EtN'		Bb530	¹³ C	39,9	62,2							
EtN'		Bb1943	¹ H	3,18	4,08							
EtN'		Bb1943	¹³ C	39,9	62,2							