

1. STRESZCZENIE

Yersinia enterocolitica O:3 (YeO3) jest Gram-ujemną pałeczką zdolną do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (0 do 44°C) i jest czynnikiem etiologicznym zakażeń układu pokarmowego u ludzi oraz fakultatywnym patogenem wewnątrzkomórkowym oraz wywołuje chorobę zwaną jersiniozą. Zakażenia mogą również występować po transfuzji krwi, ze względu na szerokie spektrum wzrostu tej bakterii. Posiada całe spektrum cech wirulencji, takich jak cukrowe antygeny powierzchniowe: lipopolisacharyd (LPS), enterobakteryjny wspólny antygen (ECA) oraz prawdopodobnie egzopolisacharyd (EPS). Dodatkowo obecność plazmidu wirulencji *pYV* niesie geny zjadliwości kodujące adhezyny i białka błony zewnętrznej.

Dodatkowo do czynników wirulencji tego gatunku bakterii z pewnością należą mało scharakteryzowane do tej pory pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV). Są one nośnikiem wzorców molekularnych, takich jak LPS, peptydoglikan, kwasy nukleinowe, które są rozpoznawane przez receptory rozpoznające wzorce molekularne na powierzchni komórek układu odpornościowego, np. receptory Toll-podobne TLR. Na skutek oddziaływania z komórkami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, OMV są zdolne do aktywacji inflamasomu oraz aktywacji mechanizmów obronnych gospodarza, co prowadzi do produkcji mediatorów stanu zapalnego i cytokin. Nadmierna aktywacja i rozregulowanie homeostazy może prowadzić do rozwoju ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej SIRS i sepsy. Układ dopełniacza stanowi jeden z głównych mechanizmów efektorowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Jego aktywacja podczas zakażenia prowadzi do opsonizacji drobnoustroju w wyniku interakcji z przeciwciałami, kolektyną MBL lub fikolinami, co ułatwia eliminację patogenu, przy czym jego niekontrolowana nadaktywacja może prowadzić do rozwoju reakcji zapalnej oraz sepsy i wstrząsu septycznego. Istnieje niewiele doniesień badających aktywację dopełniacza przez OMV, z punktu widzenia zależnej od temperatury struktury cukrowych czynników wirulencji, takich jak np. LPS.

Realizowana praca doktorska stanowiła część projektu OPUS 16 realizowanego w konsorcjum złożonym z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi oraz Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu i Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Nadrzędnym celem była charakterystyka OMV *Y. enterocolitica* O:3 i ich oddziaływania z ludzkim układem dopełniacza. Miało to służyć ocenie, czy OMV wybranego

gatunku bakterii mogą służyć jako „tarcza” dla bakterii przed działaniem układu dopełniacza i aktywator reakcji zapalnej. *Y. enterocolitica* O:3 stanowiła ciekawy model do realizacji zaplanowanych badań, gdyż jej LPS, główny czynnik wirulencji, posiada unikatowe (w tym zależne od temperatury) cechy strukturalne związane z jego ogólnym schematem budowy oraz dysponowano biblioteką mutantów o różnych chemotypach LPS (S, Ra, Re i Rd1).

W ramach badań wstępnych przeprowadzono weryfikację struktur LPS i ECA dla czterech szczepów o chemotypach S, Ra, Re i Rd1. Wykryto niezidentyfikowane wcześniej glikofory regionów rdzenia wewnętrznego zbudowane z większej liczby reszt Kdo (LPS o chemotypie Re) i heptoz (LPS o chemotypie Rd1). W przypadku LPS Re wykazano obecność dużej ilości ECA_{PG}. Ważnym etapem była również wnikliwa analiza struktur lipidów A zarówno w LPS izolowanym z bakterii, jak i w LPS obecnym w OMV, który to region LPS jest kluczowym aktywatorem komórek układu odpornościowego przez TLR4. Otrzymano także wstępne wyniki strukturalne sugerujące wytwarzanie EPS przez wybrany szczep *Y. enterocolitica* O:3, o strukturze $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow]_n$.

Kluczowym etapem pracy doktorskiej był wybór i optymalizacja procedur izolacji OMV. Otrzymane OMV scharakteryzowano z zastosowaniem technik fizykochemicznych – DLS i NTA, mikroskopii TEM, spektrometrii mas oraz spektroskopii NMR. Wykazano, że *Y. enterocolitica* O:3 uwalnia OMV, a ich liczba i rozmiary powiązane są z temperaturą hodowli (37, 22 i 4°C) oraz różnią się w zależności od chemotypu LPS. Porównano struktury LPS, głównego czynnika wirulencji, w preparatach bakteryjnych oraz pochodzących z OMV. Pokazano, że OMV izolowane ze szczepów S, Ra, Re i Rd1 skutecznie aktywują układ dopełniacza człowieka, w szczególności jego drogę lektynową, za aktywację której odpowiedzialne jest oddziaływanie lektyny wiążącej mannan (MBL) najprawdopodobniej z EPS będącym homopolimerem mannozy, obecnym na powierzchni OMV lub współizolowanym z OMV. Z grupy liganów dla MBL pochodzących z preparatów OMV *Y. enterocolitica* O:3 wykluczono białka, materiał genetyczny oraz mannany podłoża hodowlanego LB. Wybrane do badań OMV nie były rozpoznawane przez ludzkie fikoliny 1, 2 oraz 3.

Wykazano, że wszystkie preparaty OMV i LPS chemotypu S stymulowały komórki linii THP-1 do ekspresji mRNA dla genów IL-8, IL-10, IL-6 i TNF- α , przy czym w przypadku IL-6 i IL-8 oba typy preparatów (LPS i OMV), biorąc pod uwagę średnie wartości przedstawione na wykresach stymulowały komórki silniej, jeśli izolowane były z hodowli

bakteryjnej prowadzonej w niższych temperaturach: 22°C i 4°C. Zaobserwowano korelację otrzymanych wyników ze strukturą lipidów A w LPS obecnych w preparatach OMV. OMV były zdolne do hamowania bójczej aktywności surowicy NHS względem bakterii, gdzie kluczową rolę w ochronie zapewniała liczba wydzielanych OMV, jak i obecność polisacharydu O-swoistego w LPS na ich powierzchni. Badane pęcherzyki izolowane z gładkiego szczepu (chemotyp S), podane zwierzętom dootrzewnowo, przedostawały się do krążenia i akumulowały w narządach, gdzie głównym miejscem akumulacji znakowanych fluorescencyjnie OMV była wątroba, a następnie płuca, nerki i węzły chłonne. Uzyskane wyniki potwierdzają postawioną w projekcie badawczym hipotezę, że OMV *Y. enterocolitica* O:3 mogą służyć bakterii jako „tarcza” przed działaniem układu dopełniacza i stanowić silny aktywator reakcji zapalnej, co ma znaczenie dla dalszego rozumienia rozwoju sepsy.