

Katarina Stojković
Różnorodność strukturalna glikoform antygenów O
Klebsiella pneumoniae

Streszczenie

Klebsiella pneumoniae jest Gram-ujemną pałeczką o dużej zjadliwości, atakującą głównie osoby z obniżoną odpornością. Bakteria ta może wywoływać zapalenie płuc, zakażenia w obrębie przewodu pokarmowego oraz układu moczowego. *K. pneumoniae* wraz z *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* jest jednym z przodujących gatunków bakterii Gram-ujemnych, jeśli chodzi o wywoływanie sepsy. Charakterystyczną cechą *K. pneumoniae* jest antybiotykooporność – największe znaczenie ma w tym przypadku zdolność do wytwarzania β -laktamaz hydrolizujących pierścieni β -laktamowy antybiotyków. W ostatnim czasie szczególny niepokój budzą szczepy wytwarzające karbapenemazy, czyli enzymy zdolne do hydrolizy karbapenemów (traktowanych często jako „leki ostatniej szansy” w leczeniu zakażeń *K. pneumoniae*).

Do głównych cukrowych antygenów powierzchniowych *K. pneumoniae* należą: lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna) oraz antygen otoczkowy (antygen kapsularny, K, polisacharyd otoczkowy, CPS). Częsteczką LPS zbudowana jest z trzech odrębnych regionów: zakotwiczonego w błonie komórkowej lipidu A, połączonego przez oligocukier rdzenia z polisacharydem O-swoistym (antygenem O, O-PS). Toksyczność LPS jest związana z częścią lipidową, natomiast część polisacharydowa wykazuje właściwości immunogenne i determinuje serotyp O.

W związku z tym, że obecne sposoby zapobiegania i leczenia zakażeń wywoływanych przez *K. pneumoniae* są niewystarczające, istnieje potrzeba opracowywania nowych strategii terapeutycznych. Za obiecujące antygeny w immunoterapii uznano antygeny kapsularne i O-PS LPS. W porównaniu z antygenami O pozostałych członków rodziny *Enterobacteriaceae*, O-PS *K. pneumoniae* wykazują ograniczoną różnorodność. Liczba wyróżnionych serotypów O *K. pneumoniae* (7 wraz z ich podtypami) jest znacznie mniejsza niż liczba antygenów K tego gatunku (ok. 78), w związku z czym immunoterapia skierowana przeciwko antygenom O wydaje się być bardziej obiecującym podejściem.

Realizowana praca doktorska stanowiła część europejskiego projektu Klebsicure (EUROSTARS, E!7563, 2012 – 2015 r.) realizowanego w konsorcjum złożonym z dwóch firm biotechnologicznych - Arsanis Biosciences GmbH (Wiedeń, Austria), GATC Biotech AG (Konstancja, Niemcy) oraz Instytutu Biologii Zakażeń im. Maxa Plancka (Berlin, Niemcy) i Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. Celem projektu i zarazem jego tytułem było „Opracowanie strategii terapeutycznej opartej na biernej

immunizacji przeciwciałami monoklonalnymi oraz strategii diagnostycznej skierowanej przeciwko ostrym infekcjom wywoływanym przez *Klebsiella*”. Antygenami, które wybrano na cel terapeutyczny otrzymywanych przeciwciał były O-PS LPS *K. pneumoniae*. W związku z tym, integralną częścią realizowanego projektu, a tym samym nadrzędnym celem realizowanej przeze mnie pracy doktorskiej, były izolacje, oczyszczanie, analiza strukturalna, degradacje wybranych LPS *K. pneumoniae*, a następnie izolacja i analiza strukturalna otrzymanych O-PS. Stanowiło to etap poprzedzający przygotowanie biotynylowanych sond do selekcji przeciwciał monoklonalnych i dalszej charakterystyki tych przeciwciał przez lidera konsorcjum. Początkowo zakładano, że istnieje ograniczona liczba serotypów O, jednak wstępne testy serologiczne oraz analizy genów odpowiedzialnych za biosyntezę LPS, wykonane przez członków konsorcjum wskazały na różnorodność serotypów O1, O2 oraz O3, których dotyczy niniejsza praca (Guachalla i in. 2017; Stojkovic i in. 2017; Szijártó i in. 2016).

W celu wyjaśnienia modyfikacji strukturalnych serotypów O2 i O1 zależnych od obecności operonu *gmlABC*, przeprowadzono kompletną analizę strukturalną wybranych O-PS LPS *K. pneumoniae* serotypów O2 i O1 (szcypy: Kp26 – O2 *gml*⁻, PCM-27 – O2 *gml*⁺, Kp4 – O1 *gml*⁻, Kp24 – O1 *gml*⁺), wykorzystując metody spektroskopii NMR. Przesłanką było doniesienie jednego z konsorcjantów, że obecność operonu *gmlABC* może odpowiadać za modyfikację powtarzającej się podjednostki antygeny O o strukturze $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Gal}\text{f}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}\text{p}\text{-(1}\rightarrow$ opisaną już wcześniej jako D-galaktan-I (gal-I) i występującej w serotypach O2 i O1. W przypadku szczepów *gml*⁺ (PCM-27 – O2 i Kp24 – O1) wykazano występowanie modyfikacji strukturalnej antygeny O, polegającej na obecności terminalnej reszty $\alpha\text{-D-Gal}\text{p}$ w gal-I, a tak zmodyfikowaną podjednostkę nazwano galaktanem-III (gal-III). W przypadku szczepów *gml*⁻ (Kp26 – O2, Kp4 – O1) stwierdzono brak tej dodatkowej reszty cukrowej. Skład cukrowy badanych O-PS potwierdzono również przy pomocy metod chemicznych (analiza cukrowa i metylacyjna). Istotnym etapem tej części badań były analizy strukturalne O-PS zestawu obejmującego szczep dziki, mutant kontrolny oraz mutant otrzymany w wyniku transformacji szczepu dzikiego wektorem zawierającym operon *gmlABC*. Wykazano, że obecność operonu *gmlABC* odpowiedzialna jest za zaobserwowaną modyfikację gal-I do gal-III.

Dla frakcji O-PS szczepów *K. pneumoniae* 5505 Δ *cps*, PCM-11 i Kp81 o serotypie O3 przeprowadzono analizę strukturalną metodami NMR oraz spektrometrii mas MALDI-TOF w celu ustalenia struktury oraz wielkości podjednostki antygeny O w każdym ze szczepów. Stwierdzono występowanie pięciu reszt mannozy w podjednostce antygeny O szczepu 5505 Δ *cps* (znana struktura dla serotypu O3), czterech mannoz w szczepie PCM-11 (serotyp O3a) oraz trzech mannoz w szczepie Kp81 (serotyp O3b).

Istotnym elementem pracy była ocena przydatności spektroskopii HR-MAS NMR do analizy struktur O-PS bezpośrednio na powierzchni komórki bakteryjnej oraz z wykorzystaniem niezdegradowanych preparatów LPS. Zebrano widma HR-MAS-NMR dla serii mas bakteryjnych oraz kompletnych LPS i porównywano je z utworzoną wcześniej biblioteką widm NMR wyizolowanych antygenów O. Wykazano, że istnieje możliwość stosunkowo szybkiej identyfikacji serotypu

K. pneumoniae na podstawie kompletu widm ^1H oraz $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT dla LPS przy użyciu metody HR-MAS NMR. Określenie serotypu na podstawie widm otrzymanych wyłącznie dla masy bakteryjnej było znacznie utrudnione ze względu na występowanie dodatkowych sygnałów pochodzących od zanieczyszczeń.