

Badania strukturalne antygenów O i identyfikacja loci O nietypowalnych izolatów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae jest patogenem występującym w szpitalach i jednym z patogenów priorytetowych, wskazanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako krytyczny ze względu na bardzo ograniczone możliwości leczenia powodowanych przez tę bakterię zakażeń. Lipopolisacharyd (LPS, antygen O) i polisacharyd otoczkowy (CPS, antygen K) to główne czynniki zjadliwości i antygeny powierzchniowe *K. pneumoniae* określające serotypy O i K, kodowane przez klastry genów nazywane *locus* O lub K. W przeciwieństwie do dużej zmienności strukturalnej w obrębie antygenów K, gatunek ten charakteryzuje się ograniczoną różnorodnością antygenów O (do tej pory zidentyfikowano 11 serotypów O). Cecha ta sprawia, że LPS jest atrakcyjnym celem dla terapii opartych na przeciwciałach (szczepionki oraz immunizacja bierna) jako alternatywy dla antybiotyków. Aby taka immunoterapia była skuteczna, ważne jest poszerzanie wiedzy na temat struktur antygenów O oraz dystrybucji serotypów wśród izolatów klinicznych *K. pneumoniae*.

Obecnie analiza strukturalna antygenów O jest wspierana przez bioinformatykę. Genotypowanie oparte na analizie porównawczej *loci* O (regionów *rfb*) i K za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) lub analizie wyników sekwencjonowania całego genomu (WGS) – w tym na analizach wykorzystujących ogólnodostępne narzędzie Kaptive (<https://kaptive-web.erc.monash.edu/>), zostało zaproponowane jako narzędzie diagnostyczne, a wyniki genotypowania wskazują na większą niż opisana dotychczas różnorodność antygeny O wśród izolatów *K. pneumoniae*.

Praca doktorska obejmowała grupę jedenastu LPS wyizolowanych z izolatów klinicznych *K. pneumoniae* (BIDMC 7B, ABC152, ABC122, BC738, BC13-986, 3936/19, Kp164, Kp165, Kp166, Kp174, Kp177). Szczepy te oceniono wstępnie jako nietypowalne, biorąc pod uwagę brak ich reaktywności z przeciwciałami skierowanymi przeciwko znanym serotypom O lub różnice w sekwencjach regionów *rfb*. Niniejsza praca doktorska realizowana była w ramach projektu OPUS16 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2019-2025) pt. „Nietypowalne antygeny O *Klebsiella pneumoniae* – struktura i seroepidemiologia”.

Wyizolowane lipopolisacharydy analizowano za pomocą spektroskopii ^1H , ^{13}C HR-MAS NMR (*high-resolution-magic angle spinning nuclear magnetic resonance*). W przypadku wybranych LPS, badania uzupełniono o izolację polisacharydów O-swoistych i analizę składu cukrowego metodami chemicznymi oraz za pomocą spektroskopii NMR. Dodatkowo, analizę strukturalną wzbogacono identyfikacją *locus* O za pomocą narzędzia Kaptive, analizując odpowiednio regiony *rfb* kodujące poszczególne serotypy O. Ze wszystkich 11 nietypowalnych izolatów *K. pneumoniae* wyizolowano DNA, poddano sekwencjonowaniu, a otrzymane sekwencje analizowano za pomocą oprogramowania Kaptive. Ponadto dla każdego izolatu przeprowadzono analizę MLST (ang. *multi-locus sequence typing*).

W wyniku przeprowadzonych analiz, badane lipopolisacharydy przydzielono do czterech grup: i) grupy 1 (szczepy BIDMC 7B, ABC122) reprezentującej fenotyp O2 wariant 1 (O2v1) z sekwencją insercyjną w regionie *rfb* (genotyp O2v2); ii) grupy 2 (szczepy ABC152, BC738, BC13-986, 3936/19) charakteryzującej się identycznym i nowym serotypem O13; iii) grupy 3 (szczepy Kp164, Kp165, Kp166) reprezentującej znany serotyp O4 oraz iv) grupy 4 (szczepy Kp174, Kp177) charakteryzującej się obecnością szorstkiego LPS, pozbawionego polisacharydu O-swoistego.

W wyniku przeprowadzonych badań opublikowane zostały dwa oryginalne osiągnięcia. W przypadku grupy 1 zidentyfikowano przyczynę rozbieżności pomiędzy serotypem przewidzianym przez Kaptive w oparciu o sekwencję *locus* O (O2v2; struktura podjednostki antygeny O: $\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)]- α -D-Galp-(1 \rightarrow) a zidentyfikowaną strukturą chemiczną (O2v1; strukturapodjednostki antygeny O; $\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow). W regionach *rfb* szczepów BIDMC 7B i ABC122 zidentyfikowano sekwencje insercyjne (IS) w genie *gmlB*, odpowiedzialnym za biosyntezę terminalnej reszty α -D-Galp w przypadku wariantu O2v2. Zjawisko poddano szerszej analizie w oparciu o analizę *in silico* 8130 genomów *K. pneumoniae* dostępnych w publicznych bazach danych (dn. 3 grudnia 2019). Dla ~10% serotypów O1v2 i ~28% O2v2 wykazano występowanie różnych typów sekwencji IS (np. ISR1, IS903B, ISKpn14 lub ISKpn26) w genach regionu *rfb* o potencjalnym znaczeniu dla fenotypu antygeny O (Artyszuk *et al.* 2020).

Drugim osiągnięciem było powiązanie jednego z nowych *loci* O *K. pneumoniae* (OL101) zidentyfikowanego u szczepów ABC152, BC738, BC13-986, 3936/19, dla którego dotychczas nieopisano kodowanej przez ten region struktury antygeny O, z nowo opisaną strukturą antygeny O, β -Kdop- $\rightarrow 3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp]_n. Izolaty te reprezentują nowy serotyp O13, stanowiący około 6,55% wszystkich 71377 analizowanych genomów *K. pneumoniae* dostępnych w bazach danych na dzień 27 lipca 2023 (Artyszuk *et al.* 2024).