

## **Zależność pomiędzy długością części O-swoistej lipopolisacharydu a potencjałem patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella***

Zakażenia wywołane nietyfoidalnymi szczepami *Salmonella* stanowią, obok zakażeń bakteriami *Campylobacter*, główną przyczynę zatruc pokarmowych w Unii Europejskiej i są poważnym problemem dla zdrowia publicznego. Coraz częściej, oprócz salmonelloz o typowym przebiegu, obserwuje się zakażenia prowadzące do wystąpienia objawów w postaci pozajelitowej lub posocznicy, szczególnie niebezpiecznej dla zdrowia i życia dzieci, osób starszych oraz osób z niedoborami odporności. Oporność bakterii na surowicę jest kluczowym czynnikiem zjadliwości dla rozwoju zakażeń układowych. Istotnym aspektem w procesie wirulencji bakterii *Salmonella* jest generowanie przez nie zmian w ich osłonach zewnętrznych, umożliwiającym im przetrwanie i namnożenie się w skrajnie niekorzystnym środowisku. Część szczepów *Salmonella* charakteryzuje rozkład długości cząsteczek lipopolisacharydu (LPS) na powierzchni komórki, w którym wyraźnie wyróżniają się trzy frakcje. Każda z nich charakteryzuje się różną liczbą powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego: LPS o niskiej masie cząsteczkowej (LMW-OAg, posiadający do 15 podjednostek), LPS długi (L-OAg, 16-35 podjednostek) oraz LPS bardzo długi (VL-OAg, ponad 100 podjednostek). Za regulację długości części O-swoistej LPS odpowiadają geny *wzz* oraz *wzz<sub>fepE</sub>* (*fepE*). Bakterie z rodzaju *Salmonella* są w stanie modulować syntezę i strukturę LPS w celu ochrony przed litycznym działaniem układu dopełniacza. W celu dokładnego poznania mechanizmów patogenności bakterii, istotne wydaje się być charakteryzowanie interakcji zachodzących pomiędzy składnikami osłon komórkowych bakterii, a składnikami układu immunologicznego gospodarza.

W niniejszej pracy doktorskiej analizowano wpływ rozkładu długości cząsteczek LPS na powierzchni komórek *Salmonella* na jej zdolność unikania odpowiedzi układu dopełniacza gospodarza. Zbadano jak pasażowanie w surowicy ludzkiej wpływa na przeżywalność, długość wytwarzanego lipopolisacharydu oraz kompozycję proteomu błony zewnętrznej bakterii *Salmonella* O48. W celu określenia roli różnych typów LPS w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez bakterie *S. Enteritidis*, skonstruowano panel chromosomalnych mutantów bakteryjnych o skróconej długości części O-swoistej LPS. Panel chromosomalnych mutantów obejmował 4 szczepy wytwarzające odpowiednio: jedną podjednostkę O-swoistą ( $\Delta wzy$ ), LMW-OAg ( $\Delta fepE \Delta wzz$ ), LMW-OAg i L-OAg ( $\Delta fepE$ ) oraz LMW-OAg i VL-OAg ( $\Delta wzz$ ). W celu dokładnej charakterystyki różnych typów LPS opracowano metodę pomiaru średniej długości części O-swoistej

z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Istotą opracowanej metody jest analiza w badanym preparacie proporcji między ilością składnika cukrowego, występującego w powtarzających się podjednostkach części O-swoistej, a jednym ze składników rdzenia LPS. Wykorzystując panel mutantów *S. Enteritidis* oceniono wpływ długości części O-swoistej LPS na patogenność bakterii w testach *in vitro* (określenie oddziaływania ze składnikami układu dopełniacza i stopnia pochłaniania przez komórki ssacze) oraz *in vivo* (określenie poziomu modelowej patogenności z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella*). Dodatkowo w pracy określono również wpływ długości części O-swoistej lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej utworzonych mutantów *S. Enteritidis*.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że pasażowanie bakterii *Salmonella* O48 w surowicy prowadzi do wzrostu przeżywalności bakterii oraz do zmian w ich osłonach komórkowych. Wśród białek występujących w większej ilości po dziewięciokrotnym pasażowaniu w surowicy w stosunku do szczepu przed pasażowaniem zidentyfikowano m.in. białka związane z reakcją na stres środowiskowy oraz białka związane z biosyntezą kwasów tłuszczowych. Z kolei zmiany w profilach LPS były niewielkie i widoczne głównie w frakcji L-OAg LPS. Przeprowadzona analiza panelu mutantów chromosomalnych o skróconej długości części O-swoistej LPS w testach *in vitro* wykazała kluczową rolę L-OAg LPS w ochronie bakterii *S. Enteritidis* przed litycznym działaniem surowicy. Wykazano również związek pomiędzy długością części O-swoistej LPS a właściwością proteolityczną białka PgtE. W eksperymentach z wykorzystaniem linii komórkowych wykazano natomiast zależność pomiędzy skracaniem części O-swoistej LPS a stopniem pochłaniania bakterii przez mysie makrofagi. Badania *in vivo* wykorzystujące model larw *Galleria mellonella* również wykazały, że mutanty *S. Enteritidis* o skróconej długości części O-swoistej LPS charakteryzują się różnym stopniem patogenności. Analizując proteom mutantów o skróconej długości części O-swoistej LPS wykazano, że wraz ze skracaniem LPS następuje wzrost ilości niektórych białek w porównaniu do szczepu dzikiego. Wśród białek występujących w większej ilości u badanych mutantów *S. Enteritidis* można wyróżnić m.in. białka związane z biosyntezą rzęsek oraz białka dwuskładnikowych systemów regulacyjnych.

Podsumowując, badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej przyniosły szereg informacji dotyczących roli długości części O-swoistej LPS w patogenezie zakażeń bakteriami *Salmonella*. Ponadto w pracy zidentyfikowano wpływ długości lipopolisacharydu na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej.