

Streszczenie

Gruźlica wciąż pozostaje jedną z najpowszechniejszych chorób, która jest problemem zdrowotnym i społecznym na skalę światową, nie tylko w krajach rozwijających się, ale również w tych wysoko rozwiniętych, w tym w Polsce. Ważną rolę w rozwoju odpowiedzi przeciwprątkowej organizmu odgrywają makrofagi alweolarne, stanowiące pierwszą linię obrony w zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Komórki te rozwinęły szereg mechanizmów, chroniących je przed zakażeniem i eliminujących drobnoustroje, wśród których na szczególną uwagę zasługują czynniki bójcze, jak reaktywne formy tlenu i azotu, a także cytokiny, nasilające przeciwbakteryjne właściwości makrofagów i aktywujące inne komórki układu odpornościowego. Z drugiej strony, prątki gruźlicy posiadają liczne mechanizmy, pozwalające bakteriom na skuteczne unikanie zabijania przez makrofagi i wewnątrzkomórkowe namnażanie się w fagocytach. Jednymi z tych mechanizmów mogą być systemy naprawy podwójnych pęknięć DNA. Mtb posiadają charakterystyczny dla bakterii system rekombinacji homologicznej (HR), którego kluczowym białkiem jest RecA oraz system łączenia niehomologicznych końców (NHEJ), w którym najważniejszą rolę spełniają białko Ku i ligaza D.

Głównym celem niniejszej pracy, była ocena roli białka RecA systemu HR oraz białek Ku i ligazy D systemu NHEJ w ochronie *M. tuberculosis* przed bakteriobójczym działaniem makrofagów ludzkich, a także przed toksycznym działaniem zewnątrzpo pochodnych wolnych rodników, *in vitro*. Ponadto, oceniono także aktywność funkcjonalną makrofagów w odpowiedzi na zakażenie prątkami gruźlicy ze zinaktywowanymi genami kodującymi białka systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA.

W badaniach wykorzystano makrofagi uzyskane z ludzkiej linii monocytarno-makrofagowej THP-1 i/lub z monocytów wyizolowanych z kożuszka leukocytarno-płytkowego. Makrofagi zakażano zjadliwym szczepem dzikim Mtb (H37Rv) lub jego mutantami, nieposiadającymi genów kodujących: białko RecA ($\Delta recA$), białka Ku i ligazę D [$\Delta(ku, ligD)$] bądź wszystkie trzy białka [$\Delta(ku, ligD, recA)$] lub szczepami komplementacyjnymi, z ponownie wprowadzonymi prawidłowymi genami kodującymi w/w białka. Ponadto, jako kontrolę odpowiedzi makrofagów na zakażenie, zastosowano zabite pałeczki *E.coli*. Wszystkie użyte w pracy bakterie, przed zakażeniem nimi makrofagów, poddano lub nie poddano opsonizacji ludzką surowicą typu AB.

Pierwszy etap badań obejmował ocenę znaczenia systemów HR i NHEJ w przeżywalności szczepów Mtb, *in vitro*, w obecności donorów: tlenku azotu (NO),

anionorodnika ponadtlenkowego ($\cdot\text{O}_2^-$) lub jonu nadtlenoazotynowego (ONOO^-). Wykazano, że donor ONOO^- , niezależnie od użytego stężenia, nie powodował zahamowania wzrostu badanych szczepów Mtb. Z kolei DETA/NO będąca donorem NO oraz menadion (donor $\cdot\text{O}_2^-$) w równym stopniu hamowały wzrost i przeżywalność, zarówno szczepu dzikiego jak i jego mutantów. Wynika z tego, że systemy naprawy DNA na drodze HR lub NHEJ nie odgrywają istotnej roli w przeżywalności prątków gruźlicy poddanych działaniu NO lub $\cdot\text{O}_2^-$, *in vitro*.

Następnie, ocenie poddano znaczenie systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu prątków gruźlicy w makrofagach uzyskanych z komórek THP-1. Wykazano, że wszystkie badane szczepy Mtb charakteryzowały się podobnym wzrostem wewnątrz fagocytów, aż do 4 dnia od momentu zakażenia. Natomiast, w 6 dniu hodowli zaobserwowano, że potrójny mutant, pozbawiony genów kodujących białka obu systemów napraw DNA, namnażał się znacząco słabiej w porównaniu do szczepu dzikiego i pozostałych mutantów. Wykazano również, że zdolność mutantu $\Delta(ku,ligD,recA)$, do podobnego jak szczepu dzikiego wewnątrzkomórkowego wzrostu, była przywrócona w wyniku ponownego wprowadzenia do bakterii prawidłowych genów kodujących białka: RecA, Ku i LigD (szczepy komplementacyjne). Jednocześnie, zaobserwowano, że żywotność makrofagów zakażonych szczepem dzikim i jego potrójnym mutantem, w 6 dniu hodowli po zakażeniu, była na podobnym poziomie. Zablockowanie produkcji NO lub $\cdot\text{O}_2^-$ w makrofagach nasiliło wewnątrzkomórkowe namnażanie się mutantu $\Delta(ku,ligD,recA)$ do poziomu szczepu dzikiego, co potwierdza, że żaden z tych czynników, *per se* nie indukuje podwójnych pęknięć DNA i nie jest zdolny zahamować namnażania się potrójnego mutantu w makrofagach. Osłabiony wewnątrzkomórkowy wzrost szczepu $\Delta(ku,ligD,recA)$, w 6 dniu po zakażeniu, zaobserwowano także w makrofagach uzyskanych z monocytów wyizolowanych z kożuszka leukocyarno-płytkowego.

W ramach realizacji kolejnego etapu pracy, zbadano aktywność funkcjonalną makrofagów uzyskanych z linii THP-1 w odpowiedzi na zakażenie szczepami Mtb pozbawionymi białek uczestniczących w systemie naprawy HR i NHEJ. Oceniono produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), NO oraz cytokin (TNF- α , IL-12 i IL-10).

Szczepy Mtb pozbawione białka RecA [$\Delta(ku,ligD,recA)$ i $\Delta recA$] nie hamowały produkcji RFT przez makrofagi stymulowane PMA, a ponadto pobudzały fagocyty do uwalniania znamiennych ilości NO. Przeciwnie, szczep dziki Mtb i mutant $\Delta(ku,ligD)$ znacząco obniżały zależną od PMA produkcję RFT przez makrofagi i nie indukowały uwalniania tlenu azotu przez te komórki. Doświadczenia kontrolne z użyciem *E.coli* wykazały, że makrofagi po zakażeniu zabitymi pałeczkami okrężnicy uwalniały znaczące

ilości NO oraz RFT. Ponadto, odmienna odpowiedź funkcjonalna makrofagów na zakażenie badanymi szczepami Mtb nie była związana z żywotnością fagocytów. Przedstawione wyniki sugerują, że pozbawienie Mtb białka RecA, ale nie białek systemu NHEJ, osłabia zdolność prątków gruźlicy do hamowania aktywności bakteriobójczej makrofagów.

Oceniając produkcję cytokin, zaobserwowano, że szczep dziki oraz mutant NHEJ w większym stopniu, niż Mtb pozbawione białka RecA, bądź też bakterie *E.coli*, stymulowały makrofagi do uwalniania TNF- α . Ponadto, poziom ekspresji mRNA TNF- α był na podobnym poziomie, niezależnie od użytego szczepu. Nie zaobserwowano natomiast uwalniania IL-12 przez zakażone makrofagi, a ekspresja mRNA podjednostki p35 IL-12 w fagocytach była na tym samym poziomie, bez względu na użyty szczep Mtb. W przypadku IL-10, makrofagi zakażone mutantami $\Delta(ku,ligD,recA)$ lub $\Delta(ku,ligD)$ uwalniały znacząco mniejszą ilość IL-10, w porównaniu do komórek zakażonych szczepem H37Rv lub $\Delta recA$. Z kolei, zwiększoną ekspresję mRNA IL-10 zaobserwowano jedynie w makrofagach zakażonych prątkami gruźlicy pozbawionymi tylko genu *recA*. Przedstawione wyniki sugerują, że Mtb pozbawione genów naprawy podwójnych pęknięć DNA, w różny sposób modulują uwalnianie cytokin przez makrofagi.

Ostatnim etapem badań, była ocena udziału kinaz MAP w przeciwprątkowej odpowiedzi makrofagów, a także, wpływ badanych szczepów Mtb na poziom i fosforylację białek ERK1/2 w fagocytach. Wykazano, że Mtb pozbawione białka RecA pobudzając aktywność ERK1/2 stymulują bakteriobójczą aktywność makrofagów. Analiza fosforylacji białek ERK1/2 pokazała, że w przeciwieństwie do szczepu dzikiego i mutantów $\Delta(ku,ligD)$ oraz $\Delta recA$, potrójny mutant nie hamował fosforylacji ERK1/2 w makrofagach stymulowanych PMA, po 24 godzinach od zakażenia.

Podsumowując uzyskane wyniki, można wnioskować, że oba systemy naprawy podwójnych pęknięć DNA – rekombinacja homologiczna i łączenie niehomologicznych końców DNA są prątkom gruźlicy niezbędne do wewnątrzkomórkowego przeżycia w makrofagach. Ponadto, zarówno anionorodnik nadtlenkowy jak i tlenek azotu *per se*, są niewystarczające do skutecznego zabicia prątków gruźlicy pozbawionych obu systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA, przez makrofagi. Prawdopodobnie, jon nadtlenoazotynowy jest konieczny makrofagom do eliminacji Mtb nieposiadających białek systemów HR i NHEJ. Co więcej, białko RecA jest niezbędne prątkom gruźlicy do skutecznego osłabiania bakteriobójczej funkcji makrofagów ludzkich, poprzez zahamowanie aktywności ERK1/2. Można zatem przypuszczać, że białko RecA jest jednym z czynników wirulencji Mtb, ułatwiającym tym bakteriom przetrwanie w makrofagach.