
**Aktywność funkcjonalna
makrofagów ludzkich zakażonych
Mycobacterium tuberculosis
ze zinaktywowanymi genami
naprawy podwójnych pęknięć DNA**

Izabela Szulc-Kielbik

Autoreferat pracy doktorskiej

wykonanej pod kierunkiem

dr hab. Magdaleny Klink, prof. IBM PAN

w Pracowni Immunologii Doświadczalnej

Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Łódź, 2014

Gruźlica nieprzerwanie od stuleci pozostaje problemem zdrowotnym i społecznym na skalę światową, nie tylko w krajach rozwijających się, ale również w tych wysoko rozwiniętych, w tym w Polsce. Pomimo licznych badań w wielu ośrodkach na całym świecie, czynniki zjadliwości prątków gruźlicy, pozwalające im na przetrwanie wewnątrz makrofagów, nadal nie zostały satysfakcjonująco wyjaśnione. 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 (RFT) i azotu (RFA), a także cytokiny, nasilające przeciwbakteryjne właściwości makrofagów i aktywujące inne komórki układu odpornościowego. Z drugiej strony, prątki gruźlicy wykształciły liczne mechanizmy, poprzez które modulują aktywność funkcjonalną komórek gospodarza, a tym samym skutecznie unikają zabicia przez makrofagi i ponadto mogą namnażać się wewnątrz fagocytów. Poza nietypową budową ściany komórkowej, która chroni bakterie i warunkuje ich wirulencję, Mtb posiadają liczne białka wydzielnicze, niwelujące toksyczne działanie reaktywnych cząsteczek produkowanych przez makrofagi. Innym przykładem mechanizmów zaangażowanych w utrzymanie prątka gruźlicy przy życiu w niekorzystnym środowisku wewnątrzkomórkowym, 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.

Pierwszym celem niniejszej pracy, była ocena roli białka RecA systemu HR oraz białek Ku i LigD systemu NHEJ w ochronie *M. tuberculosis* przed bakteriobójczym działaniem makrofagów ludzkich, a także przed toksycznym działaniem zewnątrzpochodnych 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.

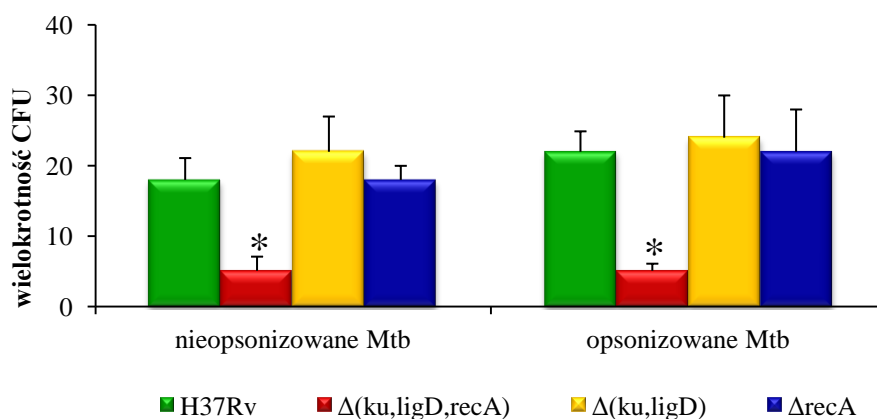
W badaniach wykorzystano makrofagi uzyskane z ludzkiej linii monocytarno-makrofagowej THP-1 i/lub z monocytów wyizolowanych z kożuszka leukocytno-płytkowego. Makrofagi zakażano zjadliwym szczepem dzikim Mtb (H37Rv) lub jego mutantami, nieposiadającymi genów kodujących: białko RecA ($\Delta recA$), białka Ku i LigD [$\Delta(ku, ligD)$] 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. Poprawność uzyskanych mutantów Mtb ze zinaktywowanymi genami kodującymi białka systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA potwierdzono metodą hybrydyzacji typu Southern oraz poprzez ocenę ich wrażliwości na promieniowanie ultrafioletowe (UV). Przyjmuje się, że bakterie pozbawione białka RecA będącego kluczowym elementem systemu HR, są wysoce wrażliwe na promieniowanie UV. W niniejszej pracy wykazano, zgodnie z oczekiwaniami, że szczepy pozbawione genu *recA* [$\Delta(ku,ligD,recA)$ oraz $\Delta recA$] charakteryzowały się większą wrażliwością na promieniowanie ultrafioletowe, w porównaniu do szczepu dzikiego H37Rv oraz mutantu $\Delta(ku,ligD)$.

Pierwszy etap badań obejmował ocenę znaczenia systemów HR i NHEJ w przeżywalności Mtb, *in vitro*, w obecności donorów: tlenku azotu (NO), anionorodnika ponadtlenkowego ($\cdot O_2^-$) lub jonu nadtlenuazotynowego (ONOO $^-$), które uszkadzają DNA i pośrednio mogą także powodować podwójne pęknięcia nici. Wykazano, że donor ONOO $^-$, niezależnie od użytego stężenia, nie powodował zahamowania wzrostu badanych szczepów Mtb. Pomimo, że jest on uważany za jedną z najbardziej toksycznych reaktywnych form azotu, to okres jego półtrwania jest na tyle krótki, że związek ten nie wpłynął na przeżywalność prątków gruźlicy charakteryzujących się długim czasem podziału. Z kolei DETA/NO będąca donorem NO oraz menadion (donor $\cdot O_2^-$) 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 $\cdot O_2^-$, *in vitro*. Można zatem stwierdzić, że ani tlenek azotu, ani anionorodnik ponadtlenkowy *per se* nie indukują podwójnych pęknięć DNA u prątków gruźlicy.

Kolejno oceniono zdolność makrofagów do pochłaniania Mtb szczepu dzikiego oraz jego mutantów znakowanych barwnikiem FITC (izotiocyanian fluoresceiny) przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Zaobserwowano, że znamienne mniejszy odsetek makrofagów zaangażowany był w pochłanianie wszystkich badanych mutantów, zarówno nieopsonizowanych jak i opsonizowanych, w porównaniu do szczepu dzikiego, podczas 2-godzinnej infekcji. Ponadto, makrofagi fagocytowały znacząco mniej bakterii pozbawionych systemu HR i/lub NHEJ, niż szczepu dzikiego H37Rv. Natomiast użyte w doświadczeniu szczepy komplementacyjne, oraz kontrolny szczep *E.coli*, były pochłaniane w tym samym stopniu, co szczep dziki.

Następnie, ocenie poddano znaczenie systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu prątków gruźlicy w makrofagach uzyskanych z komórek THP-1. Przy użyciu metody CFUs (colony forming units), wykazano, że wszystkie badane szczepy Mtb (nieopsonizowane oraz opsonizowane) 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 [Ryc. 1]. 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).



Ryc. 1. Wewnątrzkomórkowe namnażanie się szczepów Mtb w makrofagach pochodzących z komórek linii THP-1, w 6 dniu po zakażeniu.

Makrofagi zakażano nieopsonizowanymi lub opsonizowanymi: szczepem dzikim lub jego mutantami $\Delta(ku,ligD,recA)$, $\Delta(ku,ligD)$ i $\Delta recA$ w stosunku 1:1, przez 2 godziny, a następnie po odplukaniu niepochlóniętych bakterii, hodowano przez 6 dni. W dniu infekcji oraz w 6 dniu po zakażeniu, makrofagi zlizowano, a lizaty wysiano na podłoże stałe do hodowli Mtb. Po 21 dniach zliczono liczbę wyrosłych na płytkach kolonii. Wyniki przedstawiono jako średnią wielokrotność CFUs/ml \pm SEM (n = 5; * $p \leq 0.01$, $\Delta(ku,ligD,recA)$ wobec szczepu dzikiego oraz pozostałych mutantów; test U-Manna-Whitney'a).

Jednocześnie, żywotność mierzona metodą mikroskopową z użyciem jodku propidyny oraz apoptoza (mierzona przy użyciu komercyjnego testu fluorescencyjnego) makrofagów zakażonych szczepem dzikim lub jego potrójnym mutantem, w 6 dniu hodowli po zakażeniu, była na podobnym poziomie. Można zatem wnioskować, że różna przeżywalność szczepu dzikiego Mtb oraz jego mutantu $\Delta(ku,ligD,recA)$, spowodowana jest pozbawieniem prątków genów naprawy podwójnych pęknięć DNA, a nie odmienną żywotnością fagocytów lub też

złożonymi manipulacjami genetycznymi, którym poddano bakterie. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że oba systemy naprawy DSBs: HR i NHEJ, są niezbędne do namnażania się prątków gruźlicy w makrofagach ludzkich, gdzie narażone są one na toksyczne działanie wolnych rodników.

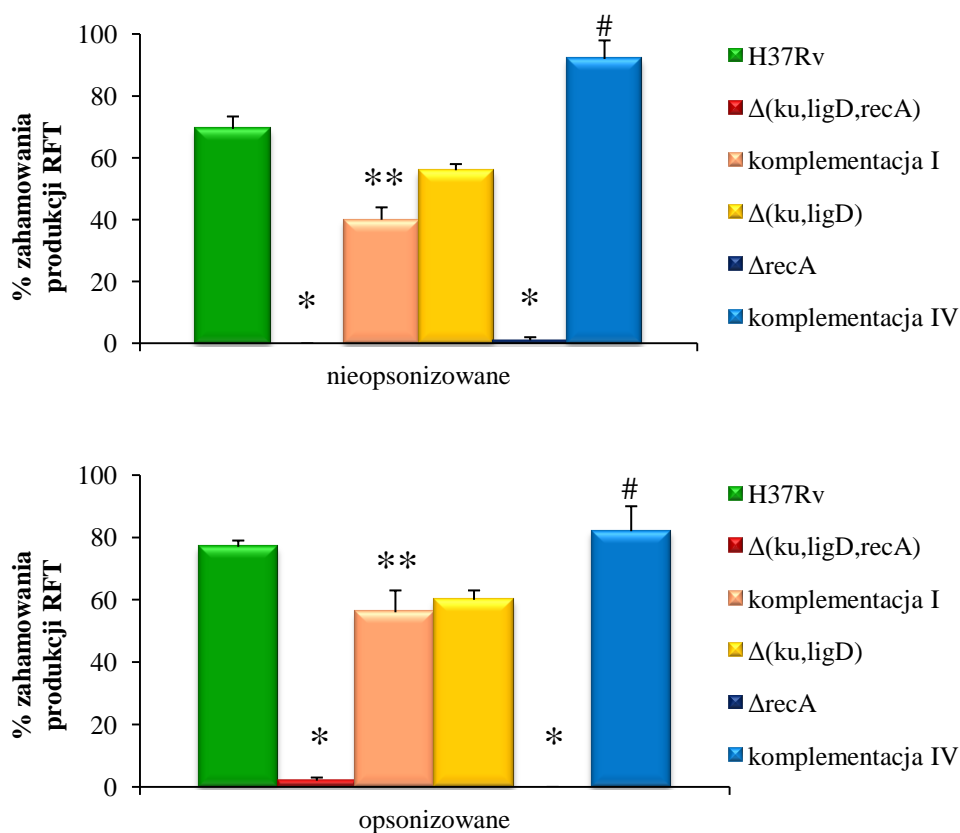
Aby ostatecznie potwierdzić, że wzrost szczepu *Mtb* pozbawionego obu systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA jest istotnie osłabiony w makrofagach ludzkich, do badań wykorzystano makrofagi otrzymane z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego. Podobnie jak w przypadku makrofagów uzyskanych z komórek linii THP-1, osłabiony wewnątrzkomórkowy wzrost szczepu $\Delta(ku,ligD,recA)$, w 6 dniu po zakażeniu, zaobserwowano także w makrofagach uzyskanych z monocytów wyizolowanych z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego. Ponieważ prątki gruźlicy zachowywały się podobnie w makrofagach uzyskiwanych z komórek THP-1 jak i z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego dalszą część badań przeprowadzono tylko na makrofagach pochodzących z komórek linii THP-1.

Następnie oceniono, czy tlenek azotu lub też anionorodnik ponadtlenkowy wpływają na osłabienie wzrostu potrójnego mutantu *Mtb* w makrofagach. Wykazano, że zablokowanie produkcji NO lub $\cdot O_2^-$ w fagocytach 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. Prawdopodobnie, dopiero produkt reakcji obu tych cząsteczek, jon nadtlenoazotynowy, jest niezbędny makrofagom do eliminacji *Mtb* nieposiadających białek systemów HR i NHEJ.

W ramach realizacji kolejnego etapu pracy analizie poddano aktywność funkcjonalną makrofagów uzyskanych z linii THP-1 w odpowiedzi na zakażenie szczepami *Mtb* pozbawionymi białek uczestniczących w systemie naprawy HR i NHEJ. W pierwszym etapie, oceniono produkcję czynników bójących przez makrofagi. Metodą chemiluminescencji wzmocnionej luminolem i peroksydazą chrzanową badano wytwarzanie reaktywnych form tlenu, zaś metodą Griess'a produkcję tlenku azotu (NO) przez zakażone prątkami gruźlicy fagocyty.

Wstępnie oceniono, że szczep dziki *Mtb* podczas 2-godzinnej infekcji nie stymulował makrofagów do produkcji RFT, a także nie wpływał na zależne od PMA (ester forbolu) uwalnianie rodników tlenowych przez fagocyty. Natomiast, po dłuższym czasie infekcji (24 godziny), makrofagi zakażone szczepem dzikim, w odpowiedzi na stymulację PMA, produkowały zamiennie mniej reaktywnych form tlenu niż makrofagi niezakażone. Zarówno

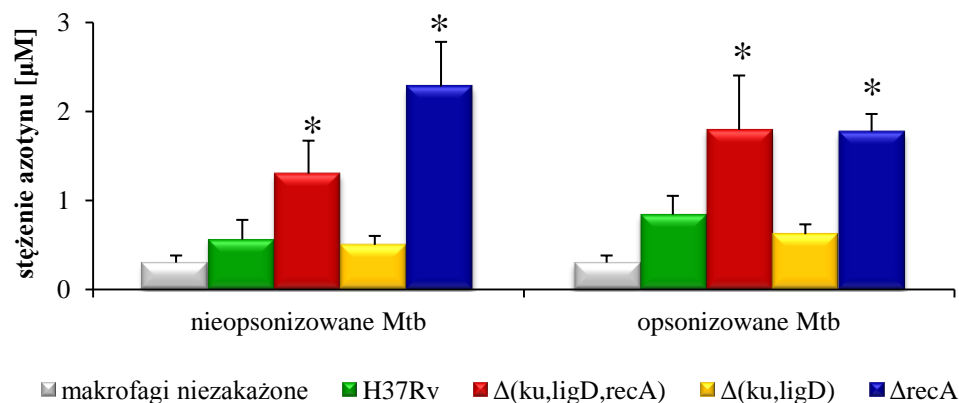
nieopsonizowane jak i opsonizowane szczepy *Mtb* pozbawione białka RecA [$\Delta(ku,ligD,recA)$ i $\Delta recA$] nie hamowały produkcji RFT przez makrofagi stymulowane PMA w przeciwieństwie do szczepu dzikiego *Mtb* i mutantu $\Delta(ku,ligD)$, które znacząco obniżały zależną od PMA produkcję reaktywnych form tlenu przez fagocyty [Ryc. 2]. Dodatkowo, wykazano, że nieopsonizowany oraz opsonizowany szczep komplementacyjny IV [$\Delta recA$ -P_{recA}recA_{Ms}] hamował produkcję RFT przez makrofagi w zbliżony sposób jak szczep dziki. Z kolei nieopsonizowany lub opsonizowany szczep komplementacyjny I [$\Delta(ku,ligD,recA)$ -P_{recA}recA_{Ms}] osłabiał uwalnianie metabolitów tlenowych podobnie, jak działa się to w przypadku mutantu $\Delta(ku,ligD)$ [Ryc. 2].



Ryc. 2. Produkcja RFT przez makrofagi zakażone szczepami *Mtb*.

Makrofagi zakażano (A) nieopsonizowanymi lub (B) opsonizowanymi: szczepem dzikim, jego mutantami: $\Delta(ku,ligD,recA)$, $\Delta(ku,ligD)$, $\Delta recA$ lub szczepami komplementacyjnymi: komplementacja I [$\Delta(ku,ligD,recA)$ -P_{recA}recA_{Ms}], komplementacja III [$\Delta recA$ -P_{recA}recA_{Ms}], w stosunku 1:10, przez 2 godziny, a następnie po odpłukaniu niepochlonytych bakterii, hodowano przez 24 godziny. Kolejno, do komórek dodano PMA i oceniono produkcję RFT metodą chemiluminescencji. Wyniki przedstawiono jako średni procent zahamowania produkcji RFT \pm SEM (n = 5; * $p \leq 0.007$, $\Delta(ku,ligD,recA)$ lub $\Delta recA$ wobec szczepu dzikiego; ** $p \leq 0.008$, komplementacja I wobec $\Delta(ku,ligD,recA)$; # $p \leq 0.001$, komplementacja IV wobec $\Delta recA$; test U-Manna-Whitneya).

W przypadku oceny produkcji NO przez makrofagi, zauważono, że jedynie mutanty $\Delta(ku,ligD,recA)$ i $\Delta recA$, ale nie szczep dziki i mutant $\Delta(ku,ligD)$, pobudzały fagocyty do uwalniania znamiennej ilości tego rodnika [Ryc. 3].



Ryc. 3. Produkcja NO przez makrofagi zakażone szczepami Mtb.

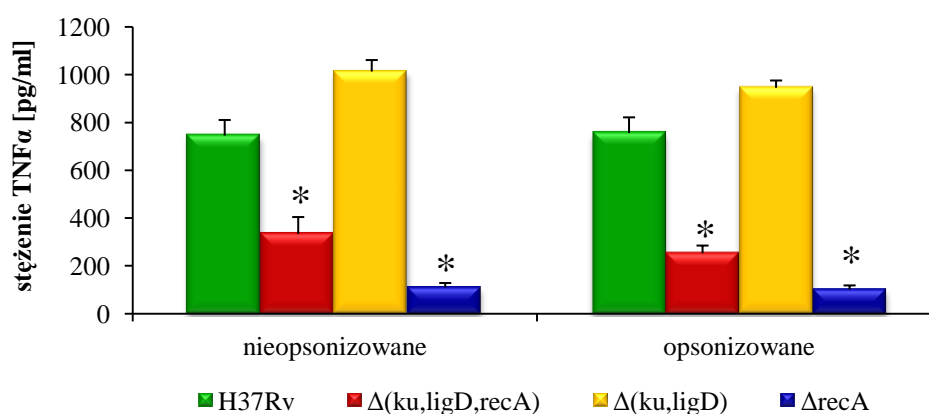
Makrofagi zakażano nieopsonizowanymi lub opsonizowanymi: szczepem dzikim lub jego mutantami $\Delta(ku,ligD,recA)$, $\Delta(ku,ligD)$ i $\Delta recA$, w stosunku 1:10, przez 2 godziny, a następnie po odplukaniu niepochlonytych bakterii, hodowano przez 48 godzin. Po tym czasie, w nadsączach pochodzających metodą Griess'a oceniono stężenie azotynu. Wyniki przedstawiono w postaci średniego stężenia azotynu (μM) \pm SEM ($n = 5$; $*p \leq 0.04$, makrofagi zakażone Mtb wobec makrofagów niezakażonych; test kolejności par Wilcoxon).

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 różną żywotnością fagocytów. Przedstawione wyniki sugerują, że pozbawienie Mtb białka RecA, ale nie białek systemu NHEJ, osłabia zdolność tych bakterii do hamowania aktywności bakteriobójczej makrofagów.

Zakażenie prątkami gruźlicy już na wczesnym etapie, prowadzi do uwalniania licznych cytokin przez komórki układu odpornościowego, zarówno w organizmie gospodarza, jak i w warunkach *in vitro*. Dlatego też, kolejnym etapem analizy aktywności funkcjonalnej makrofagów była ocena poziomu mRNA (metoda Real-time PCR) oraz uwalniania (komercyjne testy ELISA) pro-zapalnych cytokin - TNF- α i IL-12, a także regulatorowo-supresorowej IL-10, w odpowiedzi na zakażenie prątkami gruźlicy pozbawionymi genów kodujących białka naprawy podwójnych pęknięć DNA.

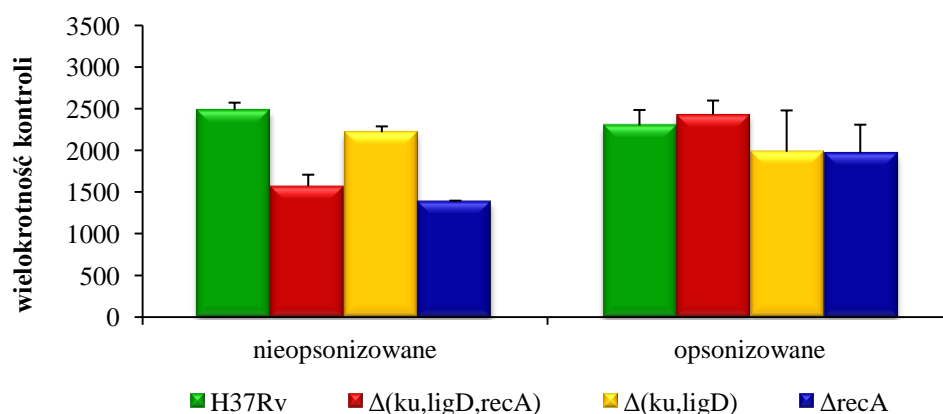
Zaobserwowano, że szczep dziki oraz mutant NHEJ w większym stopniu, niż Mtb pozbawione białka RecA, bądź też bakterie *E.coli*, stymulowały makrofagi do uwalniania

TNF- α [Ryc. 4]. Ponadto, poziom mRNA TNF- α był podobny, niezależnie od użytego szczepu [Ryc. 5]. Nie zaobserwowano natomiast uwalniania IL-12 przez zakażone makrofagi, a poziom mRNA podjednostki p35 IL-12 w fagocytach był podobny, bez względu na użyty do zakażenia 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, zwiększony poziom mRNA IL-10 zaobserwowano jedynie w makrofagach zakażonych prątkami gruźlicy pozbawionymi tylko genu *recA*.



Ryc. 4. Uwalnianie TNF- α przez makrofagi zakażone szczepami Mtb.

Makrofagi zakażano nieopsonizowanymi lub opsonizowanymi: szczepem dzikim lub jego mutantami $\Delta(ku,ligD,recA)$, $\Delta(ku,ligD)$ i $\Delta recA$, w stosunku 1:10, przez 2 godziny, a następnie po odplukaniu niepochlonych bakterii, hodowano przez 24 godziny. Przy użyciu komercyjnego testu ELISA oceniono ilość TNF- α obecnego w nadsączach pochodzących. Wyniki przedstawiono jako średnie stężenie uwolnionego TNF- α w pg/ml \pm SEM (n = 5; * $p \leq 0.004$, $\Delta(ku,ligD,recA)$ lub $\Delta recA$ wobec szczepu dzikiego; test U-Manna-Whitneya).



Ryc. 5. Poziom mRNA TNF- α w makrofagach zakażonych szczepami Mtb.

Makrofagi zakażano nieopsonizowanymi lub opsonizowanymi: szczepem dzikim lub jego mutantami $\Delta(ku,ligD,recA)$, $\Delta(ku,ligD)$ i $\Delta recA$, w stosunku 1:10, przez 2 godziny, a następnie po odplukaniu niepochlóniętych bakterii, hodowano przez 24 godziny. Metodą RT-PCR oceniono poziom mRNA w zakażonych makrofagach. Wyniki przedstawiono w postaci średniej wielokrotności kontroli (niezakażone makrofagi) \pm SEM (n = 5). Dla kontroli przyjęto wartość = 100.

Przedstawione wyniki sugerują, że Mtb pozbawione genów naprawy podwójnych pęknięć DNA, w różny sposób modulują uwalnianie cytokin przez makrofagi. Z jednej strony, sprawnie działający system NHEJ u prątków gruźlicy nasila wydzielanie supresorowej IL-10 przez makrofagi, z drugiej strony, obecność białka RecA (system HR) wyraźnie stymuluje uwalnianie TNF- α przez makrofagi po zakażeniu Mtb.

Efektywna odpowiedź makrofagów na zakażenie wewnątrzkomórkowymi patogenami, wymaga pobudzenia szlaków sygnałowych, w tym kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), dlatego też kolejnym etapem badań była ocena udziału tych kinaz w przeciwpątkowej odpowiedzi makrofagów. Szlak sygnałowy kinaz MAP, w tym białka ERK1/2 (kinazy regulowane zewnątrzkomórkowymi sygnałami), odpowiedzialny jest za wiele ważnych procesów komórkowych, między innymi za wytwarzanie RFT i NO. Omówione powyżej wyniki badań jednoznacznie wskazują, że pozbawienie prątków gruźlicy białka RecA znamienne zmienia ich wpływ na aktywność funkcjonalną makrofagów.

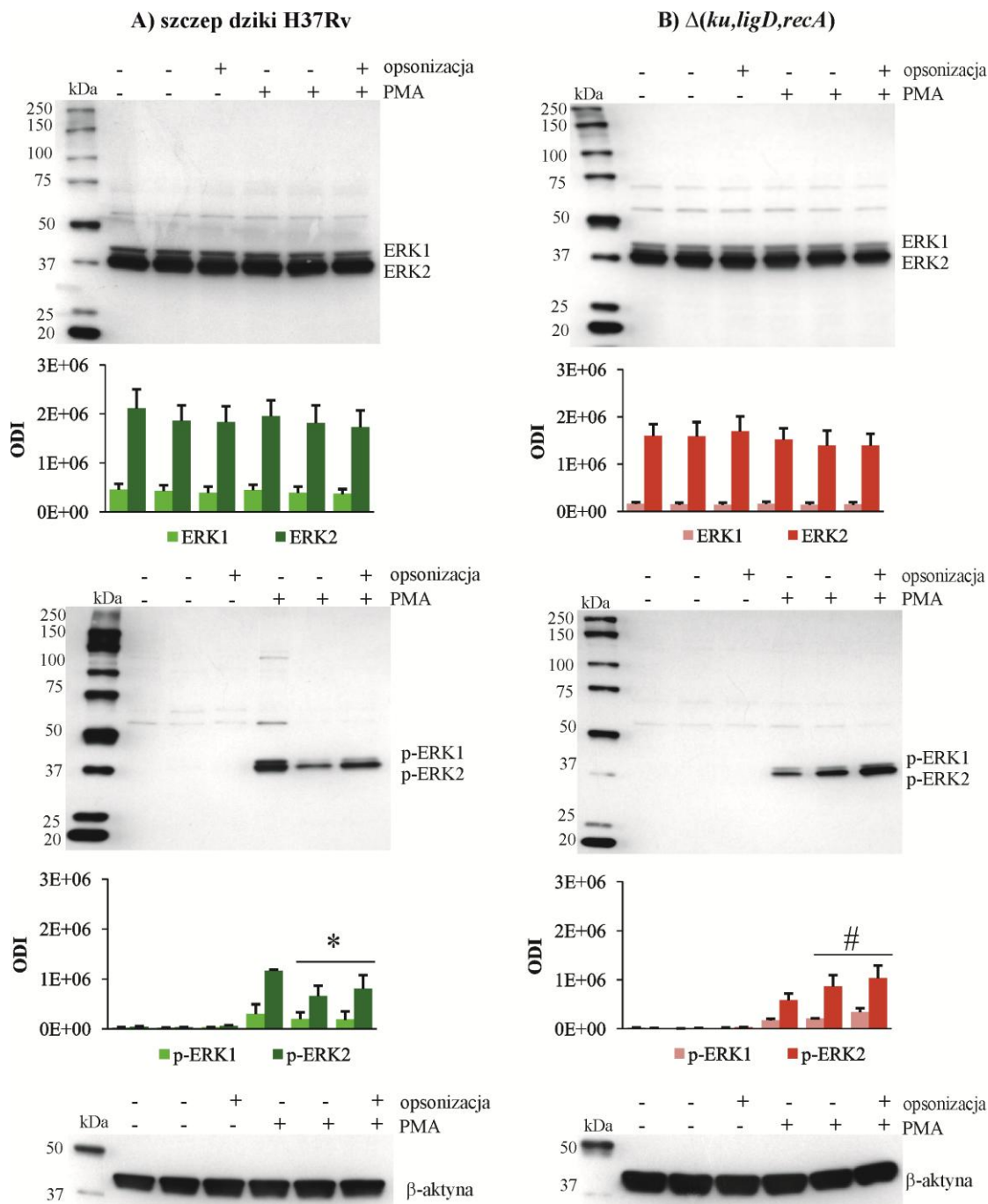
Aby przekonać się, czy białka ERK1/2 biorą udział w pobudzaniu bakteriobójczej aktywności makrofagów, użyto związku PD98059, selektywnego inhibitora kinaz MEK1/2, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania fosforylacji ERK1/2 i ich aktywności. Zaobserwowano, że w obecności inhibitora MEK1/2, wszystkie badane szczepy Mtb hamowały uwalnianie reaktywnych form tlenu przez makrofagi, stymulowane PMA, na podobnym poziomie. Zarówno nieopsonizowane jak i opsonizowane mutanty pozbawione

genu kodującego białko RecA znacząco hamowały produkcję RFT w makrofagach, w przeciwieństwie do układu kontrolnego, bez dodatku inhibitora. Jednocześnie badania pokazały, że PD98059 częściowo znosił hamujący efekt nieopsonizowanego i opsonizowanego szczepu dzikiego Mtb i jego mutantu $\Delta(ku,ligD)$ na produkcję RFT przez fagocyty. W przypadku produkcji tlenu azotu zaobserwowano, że zablokowanie aktywności ERK1/2 znacząco obniżyło uwalnianie tej cząsteczki przez makrofagi zakażone mutantem $\Delta(ku,ligD,recA)$, w porównaniu do makrofagów z aktywnymi białkami. Natomiast, makrofagi zakażone nieopsonizowanym czy też opsonizowanym mutantem $\Delta recA$ produkowały podobne ilości NO w obecności czy braku PD98059. Ponadto, oceniono udział kinaz ERK1/2 w kontroli wewnątrzkomórkowego namnażania się bakterii. Ponieważ we wcześniejszych badaniach zaobserwowano osłabienie wewnątrzkomórkowego wzrostu Mtb jedynie w przypadku potrójnego mutantu $\Delta(ku,ligD,recA)$ pozbawionego białek obu systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA – HR i NHEJ, do badań wybrano tylko ten szczep oraz szczep dziki. Wykazano, iż zablokowanie aktywności kinaz ERK1/2, znamienne nasiliło zdolność mutantu $\Delta(ku,ligD,recA)$ do namnażania się wewnątrz makrofagów. Efekt ten nie był obserwowany w przypadku fagocytów zakażonych szczepem H37Rv.

Przedstawione wyniki badań pokazują, że prątki gruźlicy pozbawione białka RecA w odmienny, niż szczep dziki, sposób wpływają na aktywność bakteriobójczą makrofagów z zablokowanym szlakiem ERK1/2. Może to sugerować, że szlak ten jest aktywowany w makrofagach zakażonych bakteriami ze zinaktywowanym genem kodującym białko RecA, ale nie szczepem dzikim.

Ostatnim etapem badań była ocena wpływu badanych szczepów Mtb na poziom i fosforylację białek ERK1/2 w fagocytach, przy użyciu metody Immunoblotingu-ECL. Początkowo, zaobserwowano, że żaden z badanych szczepów nie indukował spontanicznej fosforylacji ERK1/2 w makrofagach, w czasie krótkiego okresu inkubacji fagocytów z prątkami (15, 30, 60 lub 120 min), a poziom białka całkowitego w makrofagach zakażonych i niezakażonych był podobny. Ponieważ wcześniejsze badania pokazały, że prątki gruźlicy zmieniają odpowiedź makrofagów na aktywację PMA, postanowiono ocenić czy oddziałują również na indukowaną PMA fosforylację białek ERK1/2. Podczas 2-godzinnej infekcji makrofagów wszystkie badane szczepy prątków gruźlicy nie wpływały na stymulowaną PMA fosforylację ERK1/2 w tych komórkach. Dopiero w przypadku makrofagów hodowanych z prątkami gruźlicy przez 24 godziny i następnie aktywowanych przez PMA zaobserwowano, że jedynie potrójny mutant Mtb $\Delta(ku,ligD,recA)$ (nieopsonizowany i opsonizowany) pre-aktywował makrofagi i znamienne nasilał fosforylację ERK1/2 w fagocytach w odpowiedzi

na stymulację PMA, w przeciwieństwie do szczepu dzikiego i pozostałych mutantów, które zmieniły aktywność makrofagów, co w konsekwencji zapobiegało indukowanej PMA fosforylacji białek ERK1/2 [Ryc. 6]. Nie zaobserwowano natomiast istotnego wpływu szczepów Mtb na cytozolowy poziom ERK1/2 niezależnie od czasu infekcji makrofagów i ich aktywacji PMA. Uzyskane dane pokazują również, że ani podczas 2-godzinnego ani 24-godzinnego zakażenia, prątki gruźlicy nie indukowały fosforylacji ERK1/2 w makrofagach, do których nie dodawano PMA. Przedstawione wyniki wskazują, że tylko potrójny mutant pozbawiony obu systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA nie hamuje fosforylacji białek ERK1/2 w makrofagach stymulowanych PMA po ich zakażeniu Mtb.



Ryc. 6. Wpływ szczepów Mtb na poziom i fosforylację ERK1/2, podczas 24-godzinego zakażenia.

Makrofagi zakażano nieopsonizowanymi lub opsonizowanymi: (A) szczepem dzikim lub (B) mutantem $\Delta(ku,ligD,recA)$, w stosunku 1:10, przez 2 godziny, a następnie po odplukaniu niepochlóniętych bakterii, hodowano przez 24 godziny. Po tym czasie, fagocyty stymulowano bądź nie stymulowano PMA przez 2 godziny. Kontrolę pozytywną stanowiły makrofagi niezakażone, aktywowane PMA. Poziom białek ERK1/2 i stopień ich fosforylacji oceniono za pomocą metody immunoblotingu-ECL. Wybrane zdjęcia prezentują rozkład prążków odpowiadający poziomom białka całkowitego ERK1 i ERK2 oraz ich form ufosforylowanych. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość ODI (*optical density intensity* - gęstość optyczna) uzyskanych prążków \pm SEM ($n = 3$; $*p \leq 0.05$, makrofagi z PMA wobec makrofagów zakażonych H37Rv z PMA; $\#p \leq 0.05$, makrofagi z PMA wobec makrofagów zakażonych $\Delta(ku,ligD,recA)$ z PMA; test Wilcoxon).

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, białko RecA jest dla prątków gruźlicy konieczne do skutecznego osłabiania bakteriobójczej funkcji makrofagów ludzkich, poprzez zahamowanie aktywności ERK1/2.

Można zatem przypuszczać, że białko RecA biorące udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA, ma znaczenie jako potencjalny czynnik wirulencji prątków gruźlicy, ułatwiający tym bakteriom przetrwanie w makrofagach, ponieważ prątki gruźlicy pozbawione genu kodującego białko RecA są mniej zjadliwe niż szczep dziki. Dalsze poznanie szerszego wpływu omówionego białka prątków gruźlicy na układ odpornościowy człowieka, może w dużym stopniu wzbogacić i poszerzyć istniejącą wiedzę na temat tego patogenu, który w XXI wieku wciąż pozostaje olbrzymim problemem na świecie.