



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie  
Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

**Malwina Irena Kawka**

**Interakcja *Mycobacterium tuberculosis*  
z ludzkim surowiczym amyloidem A**

Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*  
with human serum amyloid A

Praca doktorska

wykonana w Zakładzie Immunoparazytologii

Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej

Promotor:

- dr hab. Bożena Dziadek, prof. UŁ

## *Podziękowania*

Serdeczne podziękowania składam mojej promotor, **Pani Prof. Bożenie Dziadek**, za bycie mentorem, dzięki któremu praca naukowa stała się pasją. Ponadto chciałabym również podziękować za opiekę, cenne uwagi i sugestie, dzięki którym niniejsza rozprawa przybrała ostateczny kształt oraz za zaangażowanie, wiele godzin spędzonych wspólnie przy szafie laminarnej i nieocenione wsparcie okazane podczas kilkuletniej pracy naukowej.

Chciałabym również podziękować **Panu Prof. Jarosławowi Dziadkowi** za udzielane wsparcie merytoryczne oraz **pracownikom Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN** za udział w realizacji wielu kluczowych w niniejszej rozprawie doświadczeń.

Dziękuję także członkom zespołu Zakładu Immunoparazytologii, **Pani Prof. Katarzynie Dzitko, Pani Prof. Justynie Gatkowej i Mgr. Adrianowi Bekierowi** za wszelką pomoc podczas realizacji prac doświadczalnych, dobrą atmosferę i wsparcie w trudnych chwilach.

Pragnę również podziękować moim **rodzicom i dziadkom**, za nieskończone pokłady wiary w mój życiowy wybór i wsparcie, bez którego z pewnością nie mogłabym realizować swoich marzeń i celów. W szczególności swoje podziękowania kieruję dziadkowi, **śp. Józefowi Kawka**, za niezbędną w życiu naukę pokory.

Osobne, ale równie ważne, podziękowania składam mojemu narzeczonemu, na którego pomoc zawsze mogłam liczyć, oraz przyjacielom za niezliczone ilości godzin dyskusji, tych naukowych, jak i nienaukowych.

*Malwina Irena Kawka*

**„Nauka jest jak niezmiernie morze.  
Im więcej jej pijesz, tym bardziej jesteś spragniony”  
- Stefan Żeromski**

**SPIS TREŚCI**

1.	WSTĘP .....	14
1.1.	Gruźlica – antyczna choroba XXI wieku .....	14
1.2.	Epidemiologia gruźlicy na świecie i w Polsce .....	16
1.3.	Wybrane elementy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej w patogenezie gruźlicy .....	19
1.3.1.	Makrofagi pęcherzyków płucnych .....	20
1.4.	Interakcje <i>M. tuberculosis</i> z rozpuszczalnymi (krążącymi) receptorami PRRs .....	24
1.4.1.	Białka układu dopełniacza .....	24
1.4.2.	Lektyna wiążąca mannozę .....	27
1.4.3.	Fikoliny .....	31
1.4.4.	Kolektyna 11 .....	33
1.4.5.	Białka surfaktantu płuc .....	34
1.5.	Interakcje prątka gruźlicy z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i heparyną .....	38
1.5.1.	Białka macierzy zewnątrzkomórkowej .....	38
1.5.2.	Heparyna .....	42
1.6.	Rola surowiczego amyloidu A (SAA) w patogenezie zakażeń .....	44
1.6.1.	Reakcja ostrej fazy oraz białka ostrej fazy .....	44
1.6.2.	Surowiczy amyloid A .....	46
1.6.3.	Immunologiczne właściwości SAA .....	51
1.6.3.1.	Receptory Toll-podobne .....	52
1.6.3.2.	Receptory peptydów formylowanych .....	55
1.6.3.3.	Receptory zmiatające .....	57
1.6.3.3.1.	Receptory zmiatające klasy B .....	58
1.6.3.3.2.	Receptory zmiatające klasy J .....	60

1.6.3.4.	Aktywacja inflamasomu NLRP3 przez SAA.....	62
1.6.4.	Interakcje A-SAA z drobnoustrojami .....	64
2.	CEL PRACY .....	71
3.	HIPOTEZY BADAWCZE .....	73
4.	MATERIAŁ I METODY .....	75
4.1.	MATERIAŁ.....	75
4.1.1.	Szczepy bakteryjne .....	75
4.1.2.	Podłoża do hodowli bakterii.....	75
4.1.3.	Rekombinowane białka.....	76
4.1.4.	Preparaty krwiopochodne .....	76
4.1.5.	Odczynniki i podłoża do hodowli komórkowych.....	76
4.1.6.	Odczynniki i bufony do izolacji monocytów krwi obwodowej .....	77
4.1.7.	Antybiotyki.....	78
4.1.8.	Surowice odpornościowe .....	78
4.1.9.	Odczynniki i bufony do pośredniego testu immunoenzymatycznego ELISA .....	78
4.1.10.	Zestawy, odczynniki i bufony do immunoenzymatycznego testu „cellular” ELISA (cELISA) .....	79
4.1.10.1.	Zestaw do biotynylacji białek .....	80
4.1.11.	Bufory i materiały do izolacji surowego preparatu antygenowego z komórek prątka gruźlicy .....	80
4.1.12.	Bufory i odczynniki do jednokierunkowego rozdziału elektroforetycznego (SDS-PAGE) .....	80
4.1.13.	Odczynniki i bufony do dwukierunkowego rozdziału elektroforetycznego (2D SDS-PAGE).....	82
4.1.14.	Bufory i materiały do techniki Western blot i Dot blot .....	83
4.1.15.	Odczynniki do izolacji RNA prątka gruźlicy .....	83
4.1.16.	Bufor do izolacji proteomu prątków gruźlicy .....	84

4.1.17.	Zestawy, odczynniki i bufony do chromatografii powinowactwa .....	85
4.1.17.1.	Zestaw do chromatografii powinowactwa.....	85
4.1.17.2.	Kolumny kobaltowe do chromatografii powinowactwa.....	85
4.1.17.3.	Zestaw do izolacji białek rekombinowanych .....	85
4.1.18.	Inne bufony i odczynniki .....	86
4.2.	METODY .....	88
4.2.1.	Hodowla szczepów bakteryjnych .....	88
4.2.1.1.	Hodowla prątków <i>Mycobacterium</i> .....	88
4.2.1.2.	Hodowla <i>Esherichia coli</i> .....	88
4.2.2.	Wiązanie hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków.....	88
4.2.3.	Swoistość wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków .....	90
4.2.3.1.	Znakowanie ludzkiego hrA-SAA1 biotyną .....	90
4.2.3.2.	Test kompetycji.....	90
4.2.4.	Izolacja i identyfikacja ligandów <i>M. tuberculosis</i> wiążących hrA-SAA1 .....	91
4.2.4.1.	Otrzymywanie surowego preparatu antygenowego .....	91
4.2.4.2.	Technika chromatografii powinowactwa.....	92
4.2.4.3.	Jednokierunkowy rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE .....	93
4.2.4.4.	Dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny 2D SDS-PAGE.....	93
4.2.4.5.	Technika Western blot .....	94
4.2.4.6.	Tandemowa spektrometria mas ESI/MS/MS.....	95
4.2.5.	Wiązanie hrA-SAA1 przez rekombinowane białka prątka gruźlicy .....	95
4.2.5.1.	Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy w systemie ekspresyjnym <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	95
4.2.5.2.	Nadprodukcja i oczyszczanie rozpuszczalnych, rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy w systemie ekspresyjnym <i>E.coli</i> BL21 (DE3) .....	97
4.2.5.3.	Oznaczenie stężenia białek metodą Bradford .....	98

4.2.5.4.	Identyfikacja rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątką gruźlicy techniką Western blot.....	98
4.2.5.5.	Otrzymanie surowic odpornościowych.....	99
4.2.5.6.	Określenie miana przeciwciał z wykorzystaniem pośredniego testu immunoenzymatycznego ELISA .....	100
4.2.5.7.	Wiązanie hrA-SAA1 przez rekombinowane białka prątką gruźlicy .....	100
4.2.5.8.	Swoistość wiązania hrA-SAA1 przez rekombinowane białka rAtpA i rABC prątką gruźlicy .....	101
4.2.6.	Konstrukcja szczepów mutantów <i>M. tuberculosis</i> z nadprodukcją białek wiążących hrA-SAA1.....	101
4.2.6.1.	Potwierdzenie nadprodukcji białek AtpA i ABC przez szczepy mutanty <i>MtbAtpA</i> ↑ i <i>MtbABC</i> ↑ techniką Western blot .....	102
4.2.7.	Otrzymywanie ludzkich makrofagów pochodzenia monocytarnego .....	102
4.2.7.1.	Izolacja PBMC z kożuszka leukocytarno-płytkowego .....	102
4.2.7.2.	Określenie gęstości i żywotności komórek .....	103
4.2.7.3.	Izolacja monocytów krwi obwodowej .....	104
4.2.7.4.	Różnicowanie makrofagów z monocytów krwi obwodowej .....	104
4.2.8.	Wpływ interakcji prątką gruźlicy z hrA-SAA1 na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów .....	104
4.2.8.1.	Opłaszczanie <i>M. tuberculosis</i> ludzkim rA-SAA1 .....	104
4.2.8.2.	Fagocytoza .....	105
4.2.8.3.	Określenie liczby jednostek koloniotwórczych (CFU).....	105
4.2.9.	Analiza proteomiczna szczepów mutantów <i>MtbAtpA</i> ↑ i <i>MtbABC</i> ↑.....	106
4.2.10.	Analiza transkryptomu prątką gruźlicy w odpowiedzi na wiązanie hrA-SAA1 .....	107
4.2.11.	Analiza statystyczna .....	109
5.	WYNIKI.....	111
5.1.	HIPOTEZA 1.....	111
5.1.1.	Analiza interakcji <i>M. tuberculosis</i> z ludzkim surowiczym amyloidem A ..	111

5.1.2.	Swoistość wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków.....	112
5.2.	HIPOTEZA 2.....	114
5.2.1.	Izolacja i identyfikacja ligandów <i>M. tuberculosis</i> wiążących ludzki rA-SAA1 .....	114
5.2.2.	Identyfikacja ligandu/ligandów <i>M. tuberculosis</i> wiążących hrA-SAA1 .....	118
5.2.3.	Wiązanie hrA-SAA1 przez białka Rv1308 oraz Rv2477c <i>M. tuberculosis</i>	120
5.2.3.2.	Określenie powinowactwa wiązania hrA-SAA1 przez rekombinowane białka rAtpA i rABC .....	121
5.3.	HIPOTEZA 3.....	123
5.3.1.	Wpływ interakcji prątka gruźlicy z hrA-SAA1 na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów .....	123
5.3.2.	Analiza wpływu wiązania hrA-SAA1 przez prątka gruźlicy na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów.....	124
5.3.3.	Analiza modulującego wpływu wiązania hrA-SAA1 na proces adhezji prątka gruźlicy do ludzkich makrofagów .....	126
5.3.4.	Ocena zaangażowania białek AtpA i ABC <i>M. tuberculosis</i> , wiążących hrA-SAA1, we wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów .....	128
5.3.4.1.	Przygotowanie i określenie optymalnego miana króliczych, poliklonalnych przeciwciał swoistych dla białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy .....	129
5.3.4.2.	Potwierdzenie nadprodukcji białka AtpA oraz ABC przez rekombinowane szczepy <i>M. tuberculosis</i> .....	130
5.3.4.3.	Wpływ nadprodukcji białek AtpA i ABC na procesy wnikania, wewnątrzkomórkowego namnażania i przeżywania prątka gruźlicy w ludzkich makrofagach .....	131
5.3.4.4.	Wpływ interakcji z hrA-SAA1 na procesy wnikania, wewnątrzkomórkowego namnażania i przeżywania szczepów mutantów <i>MtbAtpA</i> <sup>↑</sup> i <i>MtbABC</i> <sup>↑</sup> prątka gruźlicy .....	132
5.3.5.	Analiza proteomiczna szczepów mutantów <i>MtbAtpA</i> <sup>↑</sup> i <i>MtbABC</i> <sup>↑</sup> .....	135
5.4.	HIPOTEZA 4.....	139

5.4.1.	Wpływ wiązania hrA-SAA1 na odpowiedź funkcjonalną prątka gruźlicy na poziomie transkryptomu .....	139
6.	WNIOSKI .....	142
7.	DYSKUSJA .....	145
8.	STRESZCZENIE .....	168
9.	SUMMARY .....	171
10.	DOROBEK NAUKOWY .....	174
10.1.	Wykaz publikacji .....	174
10.2.	Publikacje popularno-naukowe .....	175
10.3.	Doniesienia konferencyjne .....	175
10.3.1.	Konferencje zagraniczne .....	175
10.3.2.	Konferencje krajowe .....	176
10.4.	Staż naukowe .....	178
10.5.	Projekty naukowe .....	178
10.	BIBLIOGRAFIA .....	180





NARODOWE CENTRUM NAUKI

Projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki, OPUS 12, nr 2016/23/B/NZ7/01204, pt. „*Identyfikacja ligandów Mycobacterium tuberculosis wiążących ludzki surowiczy amyloid A (SAA) oraz określenie biologicznej roli interakcji prątków gruźlicy z SAA*”.



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego



WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY ŚRODOWISKA  
Uniwersytet Łódzki

Dotacja celowa na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w roku 2018/2019 pt. „*Analiza porównawcza proteomu rekombinowanych szczepów Mycobacterium tuberculosis z nadprodukcją białka Rv2477c i Rv1308 do proteomu kontrolnego szczepu typu dzikiego H37Rv*”.

## WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

- Ag85** - kompleks antygenowy 85 – *antigen complex 85*
- ApoA** - apolipoproteina A – *apolipoprotein A*
- APPs** - białka ostrej fazy – *acute phase proteins*
- ATP** - adenozy-5'-trifosforan – *adenosine triphosphate*
- BSA** - albumina surowicy bydłowej – *bovine serum albumin*
- CCL** - C-C chemokina – *chemokine C-C motif ligand*
- CD** - antygen różnicowania komórkowego – *complex of differentiation*
- CFU** - jednostka tworząca kolonie – *colony forming unit*
- CL** - kolektyna – *colectin*
- CLA** - antygen CLA leukocytów – *cutaneous leucocyte-associated antigen*
- cMBT** - karboksymykobaktyna – *carboxymycobactin*
- CR** - receptor dla białek dopełniacza – *complement receptor*
- CXCL** - C-X-C chemokina – *chemokine C-X-C motif ligand*
- DAMPs** - struktury molekularne związane z uszkodzeniem (alarminy) – *damage-associated molecular patterns*
- ERK** - kinaza MAP aktywowana mitogenami – *extracellular signal-regulated kinases*
- ESAT-6** - wczesny wydzielniczy cel antygenowy 6 – *early secretory antigenic target 6 kDa*
- FBS** - surowica płodów cielęcych – *fetal bovine serum*
- FPR** - receptor peptydów formylowanych – *formyl peptide receptor*
- G-CSF** - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów – *granulocyte colony-stimulating factor*
- HbhA** - hemaglutynina wiążąca heparynę – *heparin-binding hemagglutinin*
- HDL** - lipoproteina wysokiej gęstości – *high density lipoprotein*

<b>IDL</b>	-	<b>lipoproteina pośredniej gęstości</b> – <i>intermediate density lipoprotein</i>
<b>IFN</b>	-	<b>interferon</b> – <i>interferon</i>
<b>Ig</b>	-	<b>immunoglobulina</b> – <i>immunoglobulin</i>
<b>IL</b>	-	<b>interleukina</b> – <i>interleukin</i>
<b>IMDM</b>	-	<b>podłoże hodowlane</b> – <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
<b>iNOS</b>	-	<b>syntaza tlenku azotu</b> – <i>nitric oxide synthase</i>
<b>LAM</b>	-	<b>lipoarabinomannan</b> – <i>lipoarabinomannan</i>
<b>LDL</b>	-	<b>lipoproteina niskiej gęstości</b> – <i>low density lipoprotein</i>
<b>LIMP2</b>	-	<b>lizosomalne integralne białko błonowe-2</b> – <i>lysosomal integral membrane protein-2</i>
<b>LM</b>	-	<b>lipomannan</b> – <i>lipomannan</i>
<b>ManLAM</b>	-	<b>mannozyłowany lipoarabinomannan</b> – <i>mannosylated lipoarabinomannan</i>
<b>MASP</b>	-	<b>proteaza serynowa MASP</b> – <i>mannan-binding lectin serine protease</i>
<b>MBT</b>	-	<b>mykobaktyna</b> – <i>mycobactin</i>
<b>M-CSF</b>	-	<b>czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów</b> – <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MHC</b>	-	<b>główny układ zgodności tkankowej</b> – <i>major histocompatibility complex</i>
<b>MIC</b>	-	<b>minimalne stężenie hamujące</b> – <i>minimal inhibitory concentration</i>
<b>MIF</b>	-	<b>czynnik hamowania migracji makrofagów</b> – <i>macrophage migration inhibitory factor</i>
<b>MMP</b>	-	<b>metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej</b> – <i>matrix metalloproteinase</i>
<b>MR</b>	-	<b>receptor mannozowy</b> – <i>mannose receptor</i>
<b>NF-κB</b>	-	<b>czynnik jądrowy κB</b> – <i>nuclear factor κB</i>
<b>NLRP</b>	-	<b>receptor NOD-podobny</b> – <i>NOD like receptor protein</i>
<b>PAMPs</b>	-	<b>konserwatywne wzorce molekularne patogenów</b> – <i>pathogen-associated molecular patterns</i>

<b>PBS</b>	-	<b>buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej</b> – <i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PRRs</b>	-	<b>receptory rozpoznające wzorce molekularne</b> – <i>pattern recognition receptors</i>
<b>RAGE</b>	-	<b>receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji</b> – <i>receptor for advanced glycation end products</i>
<b>SAA</b>	-	<b>surowiczy amyloid A</b> – <i>serum amyloid A</i>
<b>SP</b>	-	<b>białko surfaktantu</b> – <i>surfactant protein</i>
<b>SR</b>	-	<b>receptor zmiatający</b> – <i>scavenger receptor</i>
<b>TB</b>	-	<b>gruźlica</b> – <i>tuberculosis</i>
<b>TGF</b>	-	<b>transformujący czynnik wzrostu</b> – <i>transforming growth factor</i>
<b>TLR</b>	-	<b>receptor Toll-podobny</b> – <i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	-	<b>czynnik martwicy nowotworu</b> – <i>tumor necrosis factor</i>
<b>VEGF</b>	-	<b>czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego</b> – <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VLDL</b>	-	<b>lipoproteina bardzo małej gęstości</b> – <i>very low density lipoprotein</i>
<b>WHO</b>	-	<b>Światowa Organizacja Zdrowia</b> – <i>World Health Organization</i>

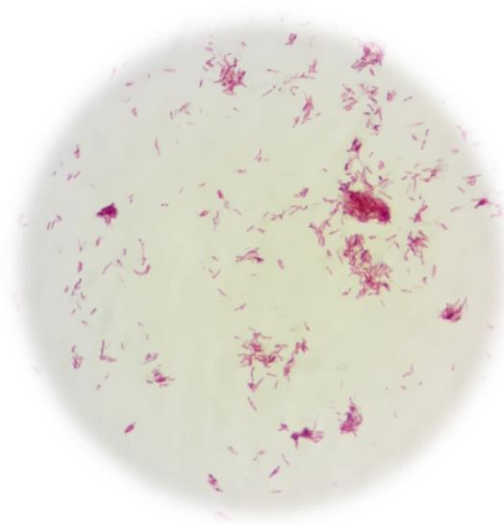
# **ROZDZIAŁ 1**

***WSTĘP***

## 1. WSTĘP

### 1.1. Gruźlica – antyczna choroba XXI wieku

Gruźlica, będąca rozpowszechnioną na całym świecie chorobą zakaźną, stanowi niezmiernie istotny globalny problem epidemiologiczny i jednocześnie wyzwanie dla współczesnej nauki i medycyny. Zjawisko to wynika z wciąż niewystarczającej wiedzy na temat molekularnych mechanizmów wirulencji czynnika etiologicznego tej choroby, którym jest prątek gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*. Prątek gruźlicy to Gram-dodatnia, przenoszona drogą kropelkową bakteria zaliczana do wewnątrzkomórkowych patogenów (**Ryc. 1**). Drobnoustrój ten, wraz z *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* oraz *Mycobacterium pinnipedii*, należy do grupy chorobotwórczych prątków *Mycobacterium tuberculosis complex* i jest odpowiedzialny za rozwój klasycznej postaci gruźlicy charakteryzującej się występowaniem patomorfologicznych zmian zwanych ziarninami gruźliczymi (granuloma), [1].

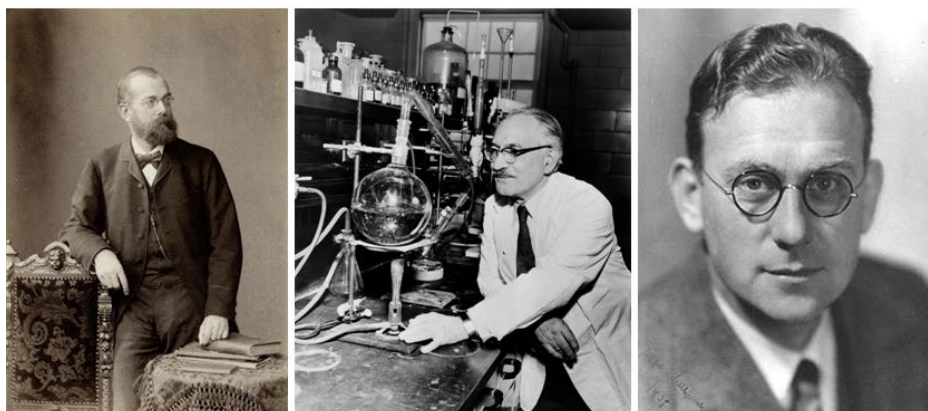


**Ryc. 1.** Prątki *M. tuberculosis* wybarwione metoda Ziehl-Nielsen, zdjęcie własne (pow. 100x)

Pierwsze zapisane dowody występowania gruźlicy pochodzą ze starożytnych tekstów odkrytych na terenach Indii oraz Chin, liczących, odpowiednio, 3 300 i 2 300 lat [2]. Niepodważalnym dowodem na istnienie tej choroby już w czasach starożytnych są badania potwierdzające zarówno kostne deformacje typowe dla gruźlicy, jak i obecność

DNA *M. tuberculosis* w kościach i tkankach miękkich egipskich mumii datowanych nawet na 2050 rok przed naszą erą [2, 3].

Mimo wielu doniesień dotyczących gruźlicy zapisanych w Starym Testamencie, dziełach Hipokratesa i Cyserona, dziewiętnastowiecznych mitach czy opisie śmierci Chopina, pierwszy naukowo udokumentowany opis prątka gruźlicy nastąpił dopiero w 1882 roku. Autorem tego opisu był, uważany za ojca mikrobiologii, niemiecki bakteriolog Robert Koch (**Ryc. 2**), który 24 marca 1882 roku w Berlinie, na seminarium Towarzystwa Fizjologicznego, przedstawił wyniki swoich wieloletnich badań dotyczących czynnika etiologicznego gruźlicy. Dzięki opracowaniu metody hodowli prątka gruźlicy w podłożu zawierającym zwierzęcą surowicę, Koch izolował te bakterie z materiału pochodzenia zwierzęcego lub ludzkiego, identyfikował je za pomocą barwienia błękitem metylenowym oraz z powodzeniem infekował prątkiem gruźlicy kawię domowe, co stanowiło przełom w badaniach nad gruźlicą [4, 5].



**Ryc. 2. Robert Koch, Selman Waksman, Jörgen Lehmann**

Bez wątpienia odkrycie Kocha stało się początkiem długiej drogi poszukiwania skutecznej terapii przeciwko gruźlicy. Niemniej jednak zakażenia prątkiem gruźlicy jeszcze przez wiele dziesięcioleci stanowiły śmiertelne zagrożenie dla populacji człowieka. Dopiero odkrycie i opracowanie nowych antybiotyków i związków o aktywności przeciwprątkowej, streptomycyny (1943r.; Selman Waksman), kwasu paraaminosalicylowego (1944r.; Jörgen Lehmann), a następnie, w krótkim czasie izoniazydu, parazynamidu, etambutolu czy ryfampicyny, i zastowanie ich na płaszczyźnie klinicznej, pozwoliło przekształcić gruźlicę w chorobę uleczalną (**Ryc. 2**), [6, 7].

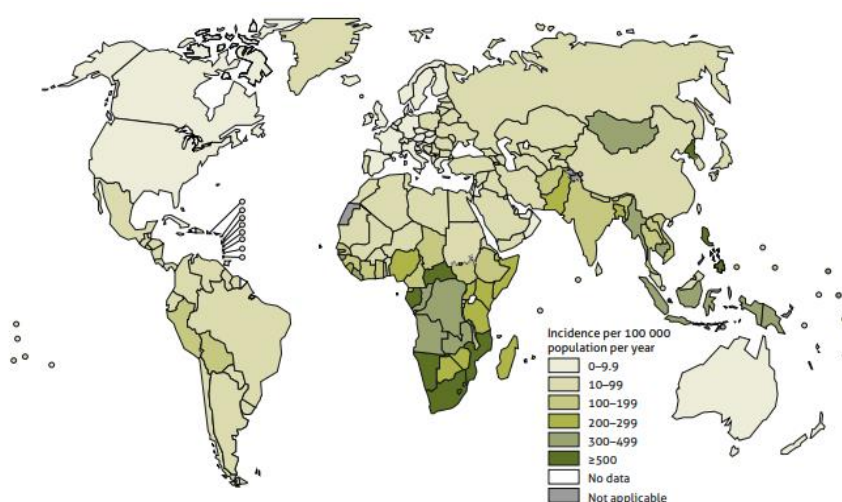
Do polepszenia sytuacji epidemiologicznej przyczyniło się również opracowanie przez Alberta Calmette'a i Camille'a Guérina na początku XX w., szczepionki BCG (*Bacille Calmette-Guérin*), która, pomimo wielu kontrowersji związanych z jej skutecznością, do dzisiejszego dnia pozostaje jedynym stosowanym u ludzi preparatem immunoprofilaktycznym przeciwko zakażeniu prątkiem gruźlicy [8]. Niestety wprowadzenie skutecznej terapii oraz profilaktyki przeciwgruźliczej nie przyczyniło się jednak do eradykacji tej choroby na świecie.

## 1.2. Epidemiologia gruźlicy na świecie i w Polsce

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) gruźlica stanowi nadal jedną z najczęstszych przyczyn zgonów z powodu chorób zakaźnych. W roku 2018 odnotowanych zostało około 10 milionów nowych przypadków tej choroby na świecie oraz około 1,5 miliona zgonów osób zakażonych prątkiem gruźlicy, w tym około 251 tysięcy przypadków śmiertelnych wśród chorych seropozytywnych w kierunku infekcji wirusem HIV (*human immunodeficiency virus*). Większość zachorowań na gruźlicę dotyczyła krajów południowo-wschodniej Azji (44%), Afryki (24%) i regionu Zachodniego Pacyfiku (18%), natomiast najmniejszy odsetek zakażonych prątkiem gruźlicy występował w krajach wschodnich regionu śródziemnomorskiego (8,1%), państwach Ameryki (2,9%) i Europy (2,6%). Najwyższy współczynnik zapadalności na gruźlicę, odnoszący się do liczby przypadków choroby na 100 000 tysięcy osobników populacji, wynoszący powyżej 500 przypadków zakażeń prątkiem gruźlicy występował w krajach południowej Afryki, takich jak Lesotho (611/100 000), Mozambik (551/100 000) Republika Południowej Afryki (520/100 000) i Republika Środkowoafrykańska (540/100 000), oraz Korei Południowej (513/100 000) i Republice Filipin (554/100 000), (**Ryc. 3**). Szacuje się, iż 1,7 miliarda osób może być zakażona prątkiem gruźlicy latentnie (bezobjawowo), zaś prawdopodobieństwo rozwoju aktywnej postaci choroby, u tych osób, w trakcie całego życia, wynosi od 5 do 10%. Ogólnoswiatowa zapadalność na gruźlicę wykazywała nie tylko zróżnicowanie geograficzne, ale także zależne od płci. Największy odsetek zachorowań dotyczył dorosłych mężczyzn (57% wszystkich przypadków gruźlicy w roku 2018), natomiast w grupie dorosłych kobiet oraz dzieci odsetek osób zakażonych prątkiem gruźlicy wynosił, odpowiednio, 32% oraz 11% [9].



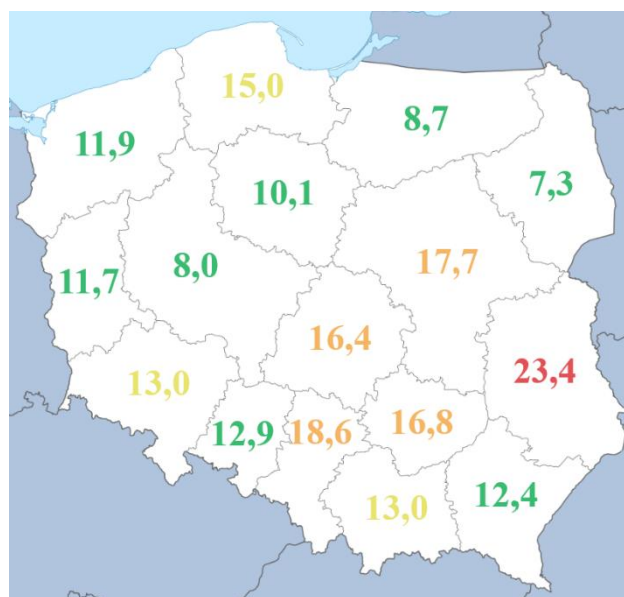
Raport, z dnia 19 marca 2019 roku, Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*), regionalnej agendy WHO, wskazuje 55 337 potwierdzonych w 2017 roku przypadków gruźlicy w 31 krajach zrzeszonych w ramach Unii Europejskiej (UE) i Europejskiego Obszaru Gospodarczego (EOG). Z tej ogólnej liczby Europejczyków chorujących na gruźlicę i zamieszkujących obszar UE/EOG, 39 903 (72,1%) stanowiły nowo zdiagnozowane przypadki choroby, w tym 37 700 (68,1%) potwierdzonych metodami mikrobiologicznymi i biologii molekularnej. Ponadto 33% wszystkich przypadków gruźlicy stwierdzonych w UE/EOG dotyczyło cudzoziemców. Współczynnik zapadalności na gruźlicę, w 2017 roku, kształtował się na stosunkowo niskim poziomie i wynosił średnio 10,7 zachorowań na 100 000 osobników populacji. Podobnie do globalnej tendencji wykazywał on zróżnicowanie w zależności od kraju i grupy wiekowej. Zdecydowanie niższą zapadalność na gruźlicę, wynoszącą 2,9 przypadków na 100 000 osób, zaobserwowano w grupie dzieci poniżej 15 roku życia. Opublikowany raport charakteryzuje również sytuację epidemiologiczną odnoszącą się do wszystkich krajów europejskich, w których funkcjonują regionalne przedstawicielstwa WHO. Zarówno liczba przypadków gruźlicy, jak i przeciętna zapadalność na gruźlicę w całej Europie były wyższe niż na terenie UE/EOG i wynosiły średnio, odpowiednio, 275 000 oraz 30 (od 26 do 34) przypadków na 100 000 Europejczyków [10].



**Ryc. 3. Zapadalność na świecie w 2019 roku [9]**

Podobnie do obserwowanego na świecie stopniowego spadku liczby zachorowań na gruźlicę, również w Polsce z każdym rokiem sytuacja ulega poprawie. W populacji polskiej, w 2018 roku, zaobserwowano 5,3% (14,3/100 000) spadek zapadalności na

gruźlicę w porównaniu do 2017 roku (15,1/100 000). Ogólna liczba zarejestrowanych zachorowań na gruźlicę wynosiła 5 487, w tym 4 852 nowo zdiagnozowane przypadki, bez wcześniej podjętej terapii przeciwpłatkowej. Wśród Polaków chorych na gruźlicę najczęściej przypadków (95,2%) dotyczyło postaci płucnej tej choroby. Zapadalność na gruźlicę wśród polskich mężczyzn była ponad dwukrotnie wyższa (3 900 przypadków, współczynnik zapadalności 21,0/100 000) niż wśród Polek (1 587 przypadków, współczynnik zapadalności 8,0/100 000). Najczęściej na gruźlicę zapadały osoby dorosłe, w przedziale wiekowym od 45 do 64 lat (45,5% zakażonych prątkiem gruźlicy), zaś stanowczą większość wśród chorych (71,1%) stanowili dorośli mężczyźni. Ponadto zarejestrowanych zostało 52 zachorowań na gruźlicę wśród dzieci do 14 roku życia, 60 wśród młodzieży od 15 do 19 roku życia, co stanowiło, odpowiednio, 0,99% i 1,1% ogółu przypadków gruźlicy w populacji polskiej. Zapadalność na gruźlicę na terenie Polski charakteryzowało również zróżnicowanie w obrębie województw (**Ryc. 4**).



**Ryc. 4.** Zapadalność na gruźlicę w Polsce w 2018 według województw [11]

W 2018 roku największą zapadalność na tę chorobę odnotowano w województwie lubelskim – 23,4/100 000, zaś najniższą w województwie podlaskim – 7,3/100 000. Dodatkowo, po raz kolejny, zaobserwowano wyższą zapadalność na gruźlicę wśród ludności miejskiej (14,9/100 000) w porównaniu do mieszkańców terenów wiejskich (13,4/100 000). Zgodnie z danymi Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, w roku 2017 odnotowano 490 przypadków śmiertelnych wśród chorujących na gruźlicę Polaków, co odpowiada współczynnikowi umieralności 1,3 na 100 000 osób [11].

Niemalym wyzwaniem, na płaszczyźnie opracowania efektywnych strategii zmierzających do ograniczenia zachorowań na gruźlicę, jest występowanie lekoopornej postaci tej choroby. Zarówno na świecie, jak i w Polsce odnotowuje się przypadki zakażeń szczepami *M. tuberculosis* opornymi na dostępne obecnie leki przeciwprątkowe. Farmakoterapia nowych przypadków gruźlicy jest procesem długoterminowym i, zgodnie z obowiązującymi zaleceniami WHO, opiera się na stosowaniu w intensywnej fazie leczenia (2 miesiące) czterech leków – etambutolu, izoniazydu, pirazynamidu i ryfampicyny. Następnie, kontynuacyjna faza leczenia (4 miesiące) obejmuje przyjmowanie izoniazydu w kombinacji z ryfampicyną. Skuteczność tego schematu leczenia zawodzi jednak w przypadkach lekoopornej gruźlicy [12]. Globalnie, w 2018 roku, czynnikiem etiologicznym 3,4% nowych przypadków zakażeń oraz 18% leczonych przypadków tej choroby były wielolekooporne szczepy MDR-TB/RR *M. tuberculosis* charakteryzujące się opornością na ryfampicynę i izoniazyd – dwa najbardziej efektywne leki przeciwprątkowe. Wśród wszystkich zanotowanych przypadków gruźlicy typu MDR-TB 6,2% stanowiły zakażenia szczepami o rozszerzonej lekooporności (XDR-TB), gdzie oprócz oporności właściwej dla prątków gruźlicy MDR-TB, bakterie wykazują brak wrażliwości na stosowane w leczeniu fluorochinolony, a także jeden z leków drugiego rzutu (np. amikacyna, kanamycyna, kapreomycyna, moksyflokscyna), [9]. Szczególnie alarmujące jest pojawianie się gruźlicy typu TDR-TB wywoływanej przez szczepy *M. tuberculosis* odporne na wszystkie aktualnie dostępne leki przeciwprątkowe. W 2007 roku przedstawiona została pierwsza publikacja opisująca przypadki zakażeń szczepami TDR-TB u dwóch Włosek, które, w wyniku nieskuteczności rekomendowanej terapii opartej o dostępne tuberkulostatyki, zmarły w 2013 roku [13]. W Polsce, w 2018 roku rozpoznanych zostało 48 przypadków gruźlicy o etiologii MDR-TB, stanowiących 1,2% wszystkich potwierdzonych bakteriologicznie zakażeń *M. tuberculosis* [11].

### **1.3. Wybrane elementy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej w patogenezie gruźlicy**

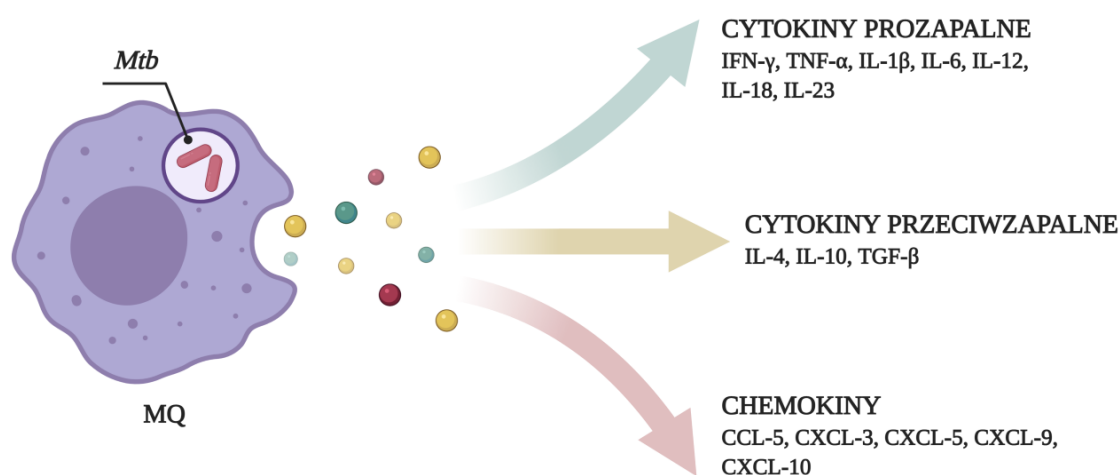
Główną drogą transmisji prątka gruźlicy pomiędzy osobnikami jest droga kropelkowa, a źródłem zakażenia są chorzy z aktywną postacią gruźlicy, wydalający podczas mówienia lub odruchu kichania aerozol zawierający chorobotwórcze bakterie. W przypadku drobnoustrojów rozprzestrzeniających się drogą kropelkową istotną rolę

w ich eliminacji, po przedostaniu się do górnych dróg oddechowych, odgrywa naturalna bariera mechaniczna warunkowana obecnością błon śluzowych, tworzonych przez rzęskowe komórki nabłonkowe oraz łącznotkankową blaszkę właściwą, w której występują immunokompetentne komórki, w tym makrofagi i limfocyty. Produkowany przez gruczoły podśluzówkowe i komórki kubkowe śluz nie tylko hamuje przyleganie drobnoustrojów do powierzchni nabłonka, ale także wspomaga ich usuwanie determinowane oddolnym ruchem rzęsek. Ponadto śluz, oprócz hamującej adhezję mikroorganizmów mucyny, zawiera szereg czynników o aktywności przeciw drobnoustrojowej, takich jak lizozym, defensyny, katelicydyny czy wydzielnicze przeciwciała klasy IgA, pełniących unikatowe funkcje w kontekście miejscowej wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Niestety powyższe mechanizmy obronne nie są efektywne w usuwaniu cząstek o wielkości  $<5 \mu\text{m}$ , właściwych dla przenoszenia drobnoustrojów drogą oddechową typu areozolu, zatem zasadniczo nie przyczyniają się one do eliminacji prątka gruźlicy [14-16]. Dlatego też, po osiągnięciu górnych dróg oddechowych, patogen ten przedostaje się do płuc, gdzie pierwszym etapem konfrontacji z mechanizmami odpornościowymi makroorganizmu jest jego rozpoznanie przez rezydujące komórki odpowiedzi wrodzonej – makrofagi pęcherzyków płucnych i komórki dendrytyczne [17].

### 1.3.1. Makrofagi pęcherzyków płucnych

Makrofagi pęcherzyków płucnych są unikatowymi komórkami ewolucyjnie i funkcjonalnie zaadaptowanymi do mikrośrodowiska charakterystycznego dla tego narządu. Są one odpowiedzialne nie tylko za eliminację drobnoustrojów wnikających do płuc, ale także za ograniczanie stanów zapalnych oraz uszkodzenia tkanki płucnej, co ma istotne znaczenie dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania układu oddechowego. Dlatego też, prowadzący do aktywacji tych komórek, złożony proces rozpoznawania prątka gruźlicy jest ściśle regulowany i stanowi wypadkową uruchamianych mechanizmów promujących i hamujących odpowiedź zapalną [18]. Jak wykazały badania, makrofagi pęcherzyków płucnych posiadają cechy charakterystyczne zarówno dla makrofagów aktywowanych klasycznie (fenotyp M1), jak i aktywowanych alternatywnie (fenotyp M2), [19]. Mimo wysokiego poziomu ekspresji receptorów mannozowych, receptorów zmiataczy typu A, receptora Toll-podobnego 9 (TLR9) oraz wysokiej aktywności fagocytarnej, wskazuje się na supresorowe właściwości tych komórek związane z niską ekspresją receptora TLR2, cząsteczek kostymulatorowych

CD80 i CD86 oraz słabą aktywnością bakteriobójczą i ograniczoną syntezą reaktywnych związków tlenowych w porównaniu do neutrofilów oraz monocytów krwi obwodowej [20-24]. Dodatkowo, podkreśla się również obniżoną zdolność makrofagów pęcherzyków płucnych do prezentacji antygenów [25, 26], a także ich hamujący wpływ na tą aktywność komórek dendrytycznych oraz aktywację limfocytów [27, 28]. Sugeruje się, iż *M. tuberculosis* preferencyjnie indukuje napływ tzw. „wrażliwych” makrofagów stanowiących niszę dla jego wewnątrzkomórkowego wzrostu, a także może modyfikować profil cytokin/chemokin syntetyzowanych przez te komórki poprzez wpływ na ich aktywację [29, 30]. Zróżnicowany fenotyp makrofagów płucnych może być przyczyną opóźnionego rozwoju ochronnej, zarówno wrodzonej, jak i swoistej odpowiedzi odpornościowej w przebiegu gruźlicy, co ma krytyczne znaczenie dla kontroli i eliminacji czynnika zakaźnego [18].



**Ryc. 5.** Cytokiny oraz chemokiny wydzielane przez makrofagi pęcherzyków płucnych wskutek stymulacji przez pochłonięte prątki *M. tuberculosis*; MQ – makrofag, *Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*, IL – interleukina, IFN – interferon, TNF – czynnik martwicy nowotworu, TGF – transformujący czynnik wzrostu [17, 31, 32]

Kluczowym elementem wrodzonych mechanizmów odpornościowych w przebiegu pierwotnego zakażenia *M. tuberculosis*, warunkowanym aktywnością funkcjonalną makrofagów pęcherzyków płucnych, jest proces fagocytozy, który nie tylko umożliwia eliminację patogenu, ale także rozwój i kontrolę reakcji zapalnej oraz indukcję swoistej odpowiedzi odpornościowej poprzez wydzielane przez fagocyty cytokiny prozapalne (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23) i przeciwzapalne (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) oraz chemokiny (CCL-5, CXCL-3, CXCL-5, CXCL-9, CXCL-10), (Ryc. 5), [17, 31, 32]. Etapem inicjującym fagocytozę prątka gruźlicy jest wspomniane rozpoznanie patogenu przez makrofagi na drodze bezpośrednich lub pośrednich interakcji tych komórek z powierzchniowymi komponentami komórek bakterii. Mechanizm bezpośredniego

rozpoznawania obejmuje wiązanie konserwatywnych struktur antygenowych patogenów (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) przez błonowe receptory dla wzorców molekularnych (PRRs, *pattern recognition receptors*) i jest on niezbędny w procesie pochłaniania nieopsonizowanych komórek bakterii. Oprócz błonowych receptorów PRRs, w mechanizm rozpoznawania prątka gruźlicy zaangażowane są również rozpuszczalne cząsteczki humoralnej odpowiedzi wrodzonej określane jako rozpuszczalne (krążące) receptory PRRs. Interakcje tych cząsteczek z komórkami patogenu warunkują jego opsonizację, umożliwiając tym samym jego pośrednie rozpoznanie przy udziale błonowych receptorów swoistych dla poszczególnych opsonin [26, 29, 33]. Wykazano, iż wiązanie mykobakterii przez receptory makrofagów zachodzi w obrębie bogatych w cholesterol domen błony zewnętrznej komórek gospodarza i jest to mechanizm determinowany raczej jednoczesnym oddziaływaniem z wieloma receptorami, którego efekt końcowy zależy od ich poziomu i dostępności [33, 34].

W obrębie mikrośrodowiska pęcherzyków płucnych dochodzi do oddziaływań prątka gruźlicy z różnymi błonowymi oraz krążącymi receptorami PRRs, takimi jak, odpowiednio, receptory TLR, receptory dla składowych dopełniacza (CR), receptory mannozowe (MR), receptory dla cząsteczki CD14, receptory zmiatające, dektyna-1, receptory DC-SIGN, receptory Fcγ oraz składowe dopełniacza, lektyna wiążąca mannozę (MBL), fikoliny, białka surfaktantu płuc A i D, kolektyna 11 (CL-11), a także białka macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektyna, laminina i heparyna [35]. Należy podkreślić, iż interakcje *M. tuberculosis* z cząsteczkami pełniącymi funkcję PRRs są istotne nie tylko na płaszczyźnie rozpoznawania patogenu i aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, determinujących stymulację efektywnej odpowiedzi odpornościowej, ale także są kluczowe dla samego prątka poprzez umożliwianie jego przylegania, i tym samym wnikania, do komórek docelowych. Dodatkowo prątki gruźlicy może unikać rozpoznania przez komórki odpowiedzi wrodzonej wykorzystując mechanizm maskowania własnych ligandów, wiązanych przez receptory PRRs, w którym główną rolę przypisuje się dimikocerozanom ftiocerolu (PDIMs), stanowiącym komponent ściany komórkowej mykobakterii [36]. Pochłonięcie prątków gruźlicy przez makrofagi pęcherzyków płucnych, z jednej strony, prowadzi do utworzenia fagosomu, będącego fundamentalnym mediatorem bakteriofagocytosis i aktywacji tych komórek, jednakże z drugiej strony, zapewnia wewnątrzkomórkową lokalizację patogenu. Makrofagi mogą eliminować pochłonięte prątki wykorzystując

zróżnicowane mechanizmy, obejmujące fuzję fagosomu z lizosomem (dojrzewanie fagosomu) i zakwaszenie jego środowiska, a także syntezę reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) i azotu (RNS, *reactive nitric species*). Ponadto wskazuje się, iż decydującym mechanizmem zaangażowanym w kontrolowanie i likwidację infekcji wywołanych przez *M. tuberculosis* jest proces autofagii, w którym utworzenie autofagosomu i jego fuzja z lizosomami prowadzi do dojrzewania fagosomu i nasilonego wewnątrzkomórkowego zabijania mykobakterii przez makrofagi. Jednakże, zlokalizowane wewnątrzkomórkowo prątki gruźlicy, charakteryzujące się wysokimi zdolnościami adaptacyjnymi, warunkowanymi złożonymi mechanizmami patogenności tych drobnoustrojów, wielokrotnie unikają lub nawet wykorzystują w przebiegu infekcji uruchamiane mechanizmy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Jednym z kluczowych mechanizmów patogenności prątków gruźlicy jest hamowanie dojrzewania fagosomu poprzez zaburzenie kontrolowanego przez GTPazy Rab wewnątrzkomórkowego endosomalnego i fagosomalnego transportu, co skutkuje zahamowaniem akumulacji błonowego białka Rab7, będącego markerem późnych fagosomów [37]. Bakterie te hamują także wydzielanie z fagosomu białka TACO (*tryptophan-aspartate-containing coat protein*) niezbędnego do utworzenia fagolizosomu, co promuje ich wewnątrzkomórkowy wzrost i przeżywanie w makrofagach [38, 39]. Ponadto patogen ten unika niekorzystnego wpływu środowiska fagolizosomów makrofagów gospodarza poprzez ucieczkę z fagosomu na drodze lizy fagosomalnej błony, warunkowanej aktywnością biologiczną mykobakteryjnego, wydzielniczego białka ESAT-6 [40]. Mechanizmy patogenności prątka gruźlicy zaangażowane są także w manipulowanie procesem autofagii prowadząc do hamowania fuzji autofagosomów z lizosomami [41]. Wskazuje się również, iż zlokalizowane wewnątrzkomórkowo prątki wykorzystują makrofagi pęcherzyków płucnych do rozprzestrzeniania się w makroorganizmie na drodze, określanego mianem Konia Trojańskiego, procesu diapedezy makrofagów przez barierę płucną [42, 43].

Wzajemne relacje patogen-gospodarz w przebiegu gruźlicy obejmują nie tylko interakcje prątka z makrofagami pęcherzyków płucnych, ale także z innymi komórkami zaangażowanymi w mechanizmy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej makroorganizmu, takimi jak komórki nabłonka pęcherzyków płucnych, komórki dendrytyczne, niekonwencjonalne limfocyty T CD8<sup>+</sup> błony śluzowej (MAIT, *mucosal associated invariant T cells*), a także, rekrutowane do miejsca infekcji monocyty

obwodowe, neutrofile czy komórki NK [44, 45]. Jak wspomniano powyżej, w oddziaływania te zaangażowane są zróżnicowane eukariotyczne błonowe i krążące receptory PRRs, co prowadzi do uruchomienia odmiennych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych determinujących dalszy przebieg zakażenia. Wskazuje się, iż poprzez wpływ na regulację transdukcji sygnału modulującego funkcję makrofagów, rodzaj wykorzystywanego przez *M. tuberculosis* receptora PRRs może mieć istotne znaczenie dla wnikania oraz wewnątrzkomórkowego przeżywania i wzrostu tego patogenu w komórkach docelowych [35]. Mimo stosunkowo szeroko poznanych molekularnych mechanizmów interakcji prątka gruźlicy z błonowymi receptorami PRRs [17, 26], a także ich wpływu na przebieg odpowiedzi wrodzonej w trakcie zakażenia tym patogenem, oddziaływania tych bakterii z krążącymi receptorami PRRs oraz ich znaczenie w patogenezie gruźlicy nie są w pełni wyjaśnione, stanowiąc w wielu przypadkach przedmiot debaty naukowej. Szczególnie interesujące są postulaty sugerujące, iż wnikanie prątka gruźlicy do makrofagów na drodze immunofagocytozy, warunkowanej ich wcześniejszą opsonizacją przez humoralne czynniki odpowiedzi nieswoistej pełniące funkcje krążących receptorów PRRs, może stanowić prominentny mechanizm, preferencyjnie wykorzystywany do zasiedlania komórek gospodarza.

#### **1.4. Interakcje *M. tuberculosis* z rozpuszczalnymi (krążącymi) receptorami PRRs**

##### **1.4.1. Białka układu dopełniacza**

Układ dopełniacza jest elementem wrodzonych mechanizmów odpornościowych, którego jedną z wielu funkcji jest opsonizacja mikroorganizmów, warunkująca ich eliminację na drodze lizy lub immunofagocytozy. Aktywacja układu dopełniacza przebiega trzema drogami, klasyczną, lektynową i alternatywną, i jest procesem kaskadowym obejmującym proteolizę białek dopełniacza w ściśle określonej kolejności. Droga klasyczna inicjowana jest zarówno poprzez bezpośrednie przyłączenie się składowej C1q do, stanowiących molekularne wzorce, antygenów mikroorganizmów, jak i wiązanie się tej składowej z kompleksem drobnoustrój-przeciwciała. Droga lektynowa, natomiast, uruchamiana jest w wyniku rozpoznania powierzchniowych komponentów cukrowych mikroorganizmów przez lektynę wiążącą mannozę (MBL) oraz fikoliny. W odróżnieniu od drogi klasycznej i lektynowej, droga alternatywna aktywacji układu dopełniacza zapoczątkowana jest spontaniczną hydrolizą białka C3. Efektem aktywacji dopełniacza jest powstanie aktywnych enzymatycznie jego składowych determinujących



wytworzenie kompleksu atakującego błonę (MAC) odpowiedzialnego za lizę komórki docelowej. Ponadto biologicznie aktywne anafilatoksyny C3a i C5a oraz składowe C3b i C4b uczestniczą, odpowiednio, w procesach chemotaksji komórek zaangażowanych w mechanizmy odpornościowe oraz opsonizacji czynnika zakaźnego ułatwiając jego rozpoznanie i pochłanianie przez komórki żerne [46].

Opsonizacja prątka gruźlicy przez składowe dopełniacza wskazywana jest jako jeden z wiodących mechanizmów ułatwiających jego wnikanie do makrofagów pęcherzyków płucnych, który przebiega z udziałem błonowych receptorów CR – CR1, CR3 i CR4, z dominującym angażowaniem receptora CR4 [47, 48]. Każdy z receptorów CR odpowiedzialny jest za wiązanie określonych ligandów – aktywnych składowych dopełniacza (**Tabela 1**), które jako opsoniny wiązane przez *M. tuberculosis* mogą być wykorzystywane przez ten patogen do manipulowania przebiegiem zakażenia poprzez ukierunkowaną interakcję z odpowiednim receptorem i wpływanie na proces fagocytozy [49]. Na znaczenie dopełniacza w patogenezie gruźlicy może pośrednio wskazywać podwyższony poziom białka C3 w surowicy krwi osób z aktywną postacią tej choroby, oraz białka C4 u pacjentów z latentną gruźlicą [50, 51].

**Tabela 1. Receptory dla składowych dopełniacza pośredniczące w procesie fagocytozy *M. tuberculosis* [49]**

RECEPTOR CR	LIGAND
CR1	C1q, C4b, C3b
CR3	C3bi
CR4	C3bi

Najlepiej poznaną jest interakcja prątka gruźlicy z białkiem C3 dopełniacza. Patogen ten wykorzystuje klasyczną i alternatywną drogę aktywacji dopełniacza w celu opsonizacji przez formy C3b i C3bi. Wiązanie składowych C3b i C3bi przez *M. tuberculosis* ma charakter kowalencyjny i przebiega z wytworzeniem wiązań estrowych [47-49]. Badania z zastosowaniem płynów oskrzelowo-pęcherzykowych zdrowych osobników udowodniły, iż w przypadku gruźlicy zasadnicze znaczenie dla interakcji *M. tuberculosis*-C3 ma klasyczna, zależna od składowej C1q, droga aktywacji układu dopełniacza, co związane jest z niskim, w porównaniu do surowicy krwi, fizjologicznym stężeniem białek komplementu w płucach [49]. Intensywność wiązania białka C3 przez prątka gruźlicy ulega nasileniu w obecności swoistych przeciwciał

przeciwprątkowych, których synteza jest wynikiem wcześniejszej immunizacji szczepionką BCG. Jednakże, synergistycznemu działaniu dopełniacza i przeciwciał przeciwprątkowych, przejawiającemu się wzrostem efektywności fagocytozy bakterii, towarzyszy zaskakujące zwiększenie ich wewnątrzkomórkowej przeżywalności, wskazując, iż wiązanie dopełniacza i swoistych przeciwciał stanowi istotny element patogenności prątka gruźlicy [52].

Mykobakteryjnym ligandem odpowiedzialnym za wiązanie białka C3 dopełniacza jest wiążąca heparynę hemaglutynina (HbhA), będąca powierzchniową adhezyną o masie relatywnej 30 kDa. Sugeruje się, iż HbhA może być białkiem wielofunkcyjnym promującym wnikanie prątka gruźlicy do komórek gospodarza. Szczególnie zwraca się uwagę na związek aktywności funkcjonalnej tego białka ze wzmożonym przyleganiem patogenu do komórek docelowych i komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest wynikiem wiązania przez HbhA nie tylko heparyny, ale także fibronektyny, mannozy, galaktozy, polisacharydów bogatych w siarczany (siarczan dekstranu, siarczan chondroityny), ale także, zaliczanej do proteoglikanów, dekoryny stanowiącej powszechny komponent tkanki śródmiąższowej płuc [53, 54].

Innym mechanizmem patogenności chorobotwórczych prątków z rodzaju *Mycobacterium*, w tym *M. tuberculosis*, jest wiązanie składowej C2a dopełniacza i wykorzystywanie jej do tworzenia konwertazy C3, zapewniającej dostępność do opsonin C3b i C3bi, będących produktami proteolizy białka C3. Preferencyjne wiązanie, opsonizowanych na drodze powyższego mechanizmu, komórek prątków z receptorem CR1 wskazuje, iż dominującą postacią białka C3, powstającą jako rezultat wychwytywania składowej C2a przez ten patogen, jest forma C3b. Wiązanie składowej C2a przyczynia się do nasilonego infekowania makrofagów przez *M. tuberculosis* nawet w warunkach braku egzogenego białka C3, sugerując, że same komórki docelowe stanowią alternatywne źródło tego komponentu [55, 56].

Wiązanie składowych dopełniacza przez prąta gruźlicy oraz warunkowane przez tą interakcję wnikanie i pochłanianie opsonizowanych bakterii przez makrofagi pęcherzyków płucnych, z zaangażowaniem receptorów CR, prowadzi do zaburzenia odpowiedzi bakteriobójczej tych komórek żernych, co warunkuje przetrwanie patogenu w niekorzystnych warunkach wewnątrzkomórkowego mikrośrodowiska fagocytów. Efekt ten wynika z hamowania przez opsonizowane składowymi dopełniacza prątki szlaków transdukcji sygnałów zależnych od wewnątrzkomórkowych jonów wapnia

(Ca<sup>2+</sup>). Wysokie stężenie tych jonów, którego wzrost indukowany jest procesem fagocytozy drobnoustrojów, jest bowiem niezbędne do uruchomienia mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania przez makrofagi, obejmującego dojrzewanie fagosomu, indukcję wybuchu tlenowego, syntezę reaktywnych form azotu, wydzielanie przeciwdrobnoustrojowych komponentów zawartych w ziarnistościach cytoplazmatycznych, a także syntezę prozapalnych mediatorów, np. TNF- $\alpha$  [57-59]. Malik i wsp. potwierdzili, iż zależna od dopełniacza fagocytoza żywych komórek *M. tuberculosis* przez ludzkie makrofagi pochodzenia monocytarnego nie prowadzi do, istotnego dla aktywności bakteriobójczej tych komórek, wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca<sup>2+</sup>, natomiast mechanizm ten nie występuje w przypadku prątków opłaszczonych swoistymi przeciwciałami, a także inaktywowanych termicznie lub promieniowaniem gamma. Ponadto, indukowany jonoforem wapnia, wzrost stężenia wewnątrzkomórkowych jonów tego pierwiastka w makrofagach zakażonych opsonizowanymi dopełniaczem prątkami gruźlicy powodował odwrócenie efektu obserwowanego dla samych bakterii, czego przejawem było dojrzewanie fagosomów i związana z tym procesem akumulacja lizosomalnych markerów – LAMP1, katepsyny D i cząsteczki CD36, a także 50% obniżenie przeżywalności wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych prątków gruźlicy [57].

#### 1.4.2. Lektyna wiążąca mannozę

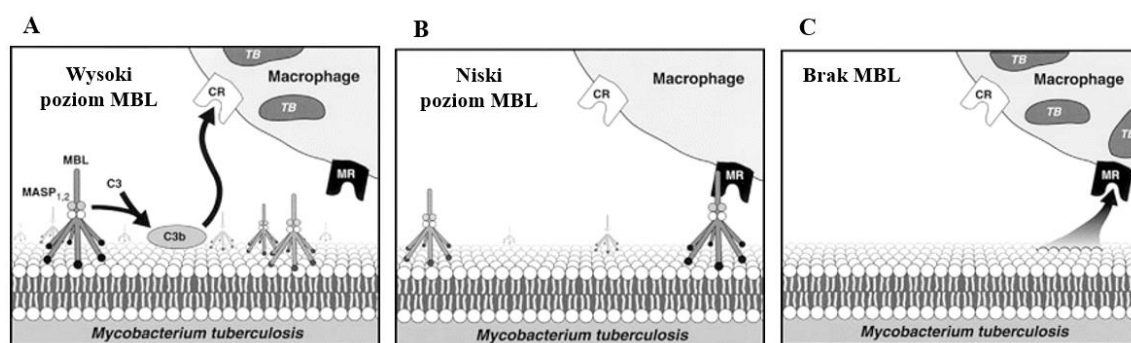
Lektyna wiążąca mannozę (MBL) jest, syntetyzowaną przez hepatocyty, glikoproteiną surowicy krwi, występującą także na powierzchni błon śluzowych. Białko to należy do podrodziny kolektyn, w strukturze których występują m.in. domena kolagenowa, warunkująca interakcje MBL z proteazami serynowymi MASP-1, MASP-2, MASP-3 i MASP-4 oraz C-końcowa domena lektynowa, określana również jako domena rozpoznająca węglowodany (CRD, *carbohydrate-recognition domain*), odpowiedzialna za, zależne od jonów Ca<sup>2+</sup>, wiązanie powierzchniowych komponentów cukrowych, np. N-acetylo-D-glukozaminy, N-acetylo-mannoaminy, mannozy, fukozy i glukozy, wielu różnych drobnoustrojów – bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków [60-64]. Ponadto MBL klasyfikowana jest jako białko ostrej fazy, a także komponent wchodzący w skład grupy około 30 czynników zaliczanych do białek układu dopełniacza [61, 65].

Lektyna wiążąca mannozę stanowi istotny element wrodzonych mechanizmów odpornościowych, odgrywając szczególnie ważną rolę w nieswoistej, pierwotnej odporności w zakażeniach patogennymi drobnoustrojami, posiadającymi powierzchniowe komponenty oligosacharydowe. Doniosłe znaczenie MBL na płaszczyźnie wrodzonej odporności wynika z wielofunkcyjności tego białka i jego zaangażowania w: a) aktywację układu dopełniacza na drodze lektynowej, warunkowaną tworzeniem kompleksów z proteazami serynowymi i ich dalszą aktywacją, po związaniu z powierzchnią drobnoustroju, b) opsonofagocytozę zależną zarówno od właściwości opsonizacyjnych MBL i interakcji z receptorami dla MBL fagocytów, jak i od powstającej, w wyniku lektynowej aktywacji dopełniacza, składowej C3b i receptorów CR, c) modulowanie procesu zapalnego poprzez stymulowanie syntezy prozapalnych cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) i d) promowanie procesu apoptozy na drodze inicjowania pochłaniania apoptotycznych komórek przez makrofagi [60, 61, 66].

Fizjologiczne stężenie MBL w osoczu jest bardzo zróżnicowane, od <10 ng/ml do 10  $\mu$ g/ml, i zależne od czynników osobniczych, populacyjnych i wiekowych. Fundamentalnym czynnikiem determinującym poziom osobniczego MBL, jest polimorfizm, kodującego to białko genu *mbl2*, wynikający ze zmienności pojedynczych nukleotydów w regionie promotorowym i egzonie 1. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów genu *mbl2* przyczynia się do jego różnorodności haplotypowej, determinującej poziom syntetyzowanego, funkcjonalnie aktywnego białka i związany z tym przebieg infekcji [60, 61].

Aktywność biologiczna MBL oraz jego osobniczo zmienne stężenie stały się impulsem do poszukiwania związku między poziomem syntezy tego białka a podatnością na infekcje o różnej etiologii. Uwarunkowane genetycznie deficyty surowiczego MBL stanowią jedne z najpowszechniejszych niedoborów odpornościowych populacji ludzkiej i identyfikowane były jako przyczyna nasilonej zapadalności na ostre infekcje obejmujące zakażenia meningokokowe i pneumokokowe, aspergilozę, a także sepsę [60, 67]. Od wielu lat podejmowane są również próby wyjaśnienia korelacji pomiędzy surowiczym stężeniem tej lektyny a zakażeniem prątkiem gruźlicy. Niestety, do tej pory nie otrzymano żadnej jednoznacznej odpowiedzi na tej płaszczyźnie prowadzonych badań, co związane jest ze sprzecznymi doniesieniami z różnych laboratoriów na świecie. Z jednej strony wskazuje się, iż niedobór MBL warunkuje efekt ochronny u osób zakażonych *M. tuberculosis*, gdyż przyczynia się do

osłabienia wnikania patogenu do komórek docelowych. Potwierdzeniem tych sugestii ma być obserwowany znamienne wyższy poziom tej lektyny u pacjentów z gruźlicą oraz zależne od MBL nasilone wnikanie prątków do makrofagów, będące wynikiem aglutynacji i wzmożonej adhezji bakterii do komórek docelowych oraz aktywacji dopełniacza drogą lektynową [68-71]. Ponadto argumentem przemawiającym za ochronnym działaniem niedoboru MBL w zakażeniu prątkiem gruźlicy może być znamienne niższa częstotliwość występowania wśród chorych na gruźlicę genotypów MBL determinujących względne lub całkowite upośledzenie syntezy tego białka [72]. Z drugiej strony, postuluje się całkowicie sprzeczny, z powyżej przedstawionym, związek pomiędzy osobniczym poziomem MBL a patogenezą gruźlicy. Wyniki tych badań sugerują wpływ niedoborów tej lektyny oraz genotypów MBL je warunkujących na zwiększoną zachorowalność na gruźlicę [73-75].



**Ryc. 6. Hipotetyczny model infekcji makrofagów przez *M. tuberculosis* w zależności od osobniczego stężenia surowiczej MBL, opracowany przez Søborg i wsp. [72]; MBL – lektyna wiążąca mannozę, MASP – związana z MBL proteaza serynowa, MR – receptor mannozowy, CR – receptor dla białek układu dopełniacza, TB – komórka prątka gruźlicy**

Podjęmując próbę wyjaśnienia powiązań pomiędzy osobniczym stężeniem MBL a zakażeniem *M. tuberculosis* Søborg i wsp. zaproponowali hipotetyczny model zakładający trzy możliwe scenariusze przebiegu infekcji, w których kluczową rolę, oprócz MBL, odgrywają receptory mannozowe (MR) i receptory CR makrofagów (**Ryc. 6**), [72]. Według autorów, wysoki poziom surowiczej MBL (**Ryc. 6A**) jest czynnikiem sprzyjającym lektynowej aktywacji dopełniacza, co generuje powstanie dodatkowych składowych opsonizujących, nasilających wnikanie prątka do komórek docelowych. Z kolei w warunkach charakteryzujących się niskim poziomem MBL (**Ryc. 6B**) nie jest inicjowana aktywacja dopełniacza drogą lektynową, konsekwencją czego jest konkurencja pomiędzy MBL i receptorami MR o wiązanie tych samych mykobakteryjnych ligandów, prowadząca do hamowania wnikania patogenu do komórek gospodarza. Natomiast, całkowity niedobór lektyny (**Ryc. 6C**), z jednej strony, ogranicza

repertuar docelowych cząsteczek makroorganizmu wykorzystywanych przez prątkę gruźlicy w procesie zasiedlania komórek, natomiast, z drugiej strony, sprzyja bezpośredniemu, zależnemu od receptora MR, wnikaniu tych bakterii do makrofagów. Należy dodać, iż część prowadzonych prac doświadczalnych nie potwierdziło żadnej korelacji pomiędzy surowiczym poziomem oraz genotypem MBL a zakażeniem *M. tuberculosis* [76, 77]. Ponadto globalna analiza statystyczna wyników na tej płaszczyźnie badań nie wykazała związku pomiędzy genotypem MBL a podatnością na zakażenie tym wewnątrzkomórkowym patogenem, sugerując jednocześnie, iż wzrost surowiczego stężenia MBL u pacjentów z gruźlicą jest wynikiem rozwijającej się reakcji ostrej fazy i może być czynnikiem promującym wewnątrzkomórkową lokalizację bakterii [78].

Bakteryjnymi ligandami odpowiedzialnymi za interakcje prątkę gruźlicy z MBL są mannozylowany lipoarabinomannan (ManLAM) oraz antygeny kompleksu 85 (Ag85), [79]. Mannozylowany lipoarabinomannan jest amfipatycznym lipoglikanem ściany komórkowej *M. tuberculosis*, definiowanym jako kluczowy czynnik wirulencji tego drobnoustroju. Istotnymi elementami w strukturze ManLAM są węglowodanowy rdzeń, zawierający, oprócz D-mannanu, immunodominujący D-arabianin oraz końcowe, powtarzające się motywy mannozowe, które mają fundamentalne znaczenie w kontekście wiązania MBL. Ponadto unikatowy charakter ManLAM związany jest z obecnością dodatkowych komponentów, mianowicie bursztynianu, mleczanu i jabłczanu, które mogą decydować o jego właściwościach biologicznych. Zaangażowanie ManLAM w patogenność prątkę gruźlicy związane jest z warunkowaniem wnikania patogenu do fagocytów, modulowaniem wewnątrzkomórkowych szlaków transportowych, a także odpowiedzi odpornościowej zakażonej komórki docelowej, np. poprzez hamowanie dojrzewania fagosomu. Aktywność funkcjonalna ManLAM jest wynikiem jego interakcji z wieloma błonowymi receptorami PRR uczestniczącymi w procesie fagocytozy, w tym receptorem DC-SIGN, receptorami CR, receptorami TLR oraz receptorem MR. Oprócz występowania w formie związanej z komórką bakteryjną, ManLAM jest komponentem fragmentów uwalnianych ze ściany komórkowej prątków, pod wpływem działania hydrolaz syntetyzowanych przez komórki błony śluzowej płuc. Fragmenty te cechują się aktywnością biologiczną i umożliwiają patogenowi manipulowanie odpowiedzią odpornościową uruchamianą w trakcie zakażenia, np. poprzez modulowanie funkcji

makrofagów i neutrofilów, jeszcze przed bezpośrednim kontaktem z komórkami gospodarza [80]. Obecność ManLAM wykrywano w surowicy, płwocinie oraz moczu chorujących na gruźlicę [81-83].

Kompleks Ag85 prętka gruźlicy obejmuje trzy spokrewnione strukturalnie i funkcjonalnie białka, Ag85A, Ag85B i Ag85C, które początkowo identyfikowane były jako mykobakteryjne ligandy wiążące komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej, mianowicie fibronektynę i elastynę [84-86]. Biorą one również udział w zależnym od receptora CR3 pochłanianiu prątków przez monocyty [87]. Antygeny te są zarówno istotnymi komponentami ściany komórkowej *M. tuberculosis*, jak i stanowią dominującą pulę wśród białek wydzielniczych tych bakterii. Wykazują one aktywność transferaz mykolowych katalizujących syntezę  $\alpha$ - $\alpha'$ -monomykolanu trehalozy (TMM) i  $\alpha$ - $\alpha'$ -dimykolanu trehalozy (TDM, *czynnik wiązkowy*) oraz kowalencyjne wiązanie kwasów mykolowych z arabinogalaktanem, co wskazuje, iż warunkują one integralność ściany komórkowej prątków [88, 89]. Ponadto postuluje się, iż antygeny kompleksu Ag85 są kluczowym elementem patogenności *M. tuberculosis*, gdyż szczepy mutanty defektywne w zakresie ekspresji białka Ag85A pozbawione są zdolności do wewnątrzkomórkowego wzrostu w ludzkich i mysich makrofagach [90]. Istotny związek białek kompleksu Ag85 z patogenezą zakażenia prątkiem gruźlicy może sygnalizować również, udowodniona dla antygeny Ag85A i Ag85B, interakcja z zaangażowaną w mechanizmy wrodzonej odporności MBL [79].

### 1.4.3. Fikoliny

Zaliczane do krążących receptorów PRR fikoliny są białkami, które, wraz z MBL, należą do podrodziny kolektyn, a także klasyfikowane są jako komponenty układu dopełniacza. W strukturze fikolin występuje charakterystyczna dla kolektyn domena kolagenowa oraz domena podobna do fibrynogenu (FBG, *fibrynogen-like domain*), będąca odpowiednikiem domeny lektynowej MBL, która warunkuje interakcje fikolin z węglowodanami. Obecnie znane trzy ludzkie fikoliny, fikolina 1 (fikolina M), fikolina 2 (fikolina L) oraz fikolina 3 (fikolina H, antygen Hakata), wykazują wysoki stopień homologii funkcjonalnej i strukturalnej [91, 92]. Cechą charakterystyczną tych białek jest wiązanie powierzchniowych glikokonjugatów zawierających N-acetylowane składowe, np. N-acetylo-D-glukozaminę, N-acetylo-D-galaktozaminę, N-acetylo-D-mannozaminę, a także reszty kwasu sjałowego. Głównym źródłem fikoliny 2 jest wątroba, natomiast

fikolina 3 jest syntetyzowana zarówno w wątrobie, jak i w płucach. W przeciwieństwie do wymienionych białek, fikolina 1 jest wytwarzana przez komórki nabłonkowe płuc typu II, a także w szpiku kostnym oraz leukocytach krwi obwodowej i stanowi istotny komponent ziarnistości neutrofilów. Wszystkie fikoliny są białkami wydzielniczymi występującymi w surowicy krwi [68, 92].

Podobnie do MBL, fikoliny są białkami wielofunkcyjnymi, odgrywającymi zasadniczą rolę w przebiegu wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Ich aktywność funkcjonalna wynika z rozpoznawania i wiązania konserwatywnych wzorców molekularnych drobnoustrojów oraz komórek apoptotycznych i nowotworowych. Fikoliny zaangażowane są w aktywowanie dopełniacza na drodze lektynowej, proces opsonizacji warunkujący immunofagocytozę oraz modulowanie reakcji zapalnej poprzez stymulowanie syntezy prozapalnych cytokin oraz reaktywnych związków azotu przez makrofagi. Postuluje się istotne znaczenie fizjologicznego stężenia fikolin w przebiegu chorób o różnej etiologii, wskazując, iż zaburzenia poziomu ekspresji tych białek, których efektem jest ich niedobór lub nadprodukcja, mogą decydować o przebiegu infekcji wirusowych i bakteryjnych, a także chorób nowotworowych oraz innych patologicznych stanów zapalnych [91, 92]. Osobniczy poziom fikolin w surowicy wykazuje duże zróżnicowanie, co, jak wykazano w przypadku fikoliny 2, determinowane jest polimorfizmem pojedynczych nukleotydów w regionie promotorowym genu *fcn2* kodującego tę kolektynę. Genotyp fikoliny 2 implikuje nie tylko różnice w poziomie jej syntezy, ale także zmienioną aktywność funkcjonalną tego białka, determinowaną polimorfizmem regionu strukturalnego genu *fcn2*, kodującego domenę FBG [93]. Postuluje się związek pomiędzy osobniczym niedoborem fikoliny 2 a nasiloną zapadalnością na infekcje dróg oddechowych [94]. Znamienne niższe stężenie fikoliny 2 wykazano także w surowicy pacjentów chorych na gruźlicę, co może sugerować zwiększoną wrażliwość osobników o niskim poziomie syntezy tego białka na zakażenie prątkiem gruźlicy. Badania *in vivo* z zastosowaniem szczepu myszy laboratoryjnych z defektem syntezy fikoliny A, homologa ludzkiej fikoliny 2, potwierdziły powyższą korelację. Dodatkowo, podawanie egzogennej fikoliny 2 myszom szczepów C57BL/6J i BALB/c skutkowało znaczącym efektem ochronnym przeciwko zakażeniu *M. tuberculosis*, wynikającym z aktywności opsonizacyjnej kolektyny prowadzącej do intensyfikacji przylegania bakterii do makrofagów oraz procesu immunofagocytozy. Oprócz zaangażowania w fagocytozę prątka gruźlicy, fikolina 2 pełni również funkcję



aktywatora subpopulacji M1 makrofagów, warunkujących odpowiedź odpornościową typu Th1. Poprzez indukcję wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zależnych od kinazy JNK, białko to pobudza makrofagi do syntezy prozapalnych cytokin, IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6, kluczowych dla rozwoju mechanizmów odpornościowych typu komórkowego, kontrolujących przebieg zakażenia. W przeciwieństwie do stymulowania pochłaniania prątka gruźlicy przez makrofagi, fikolina 2 hamuje wnikanie tego patogenu do komórek nabłonkowych płuc typu II, co może wskazywać na jej fundamentalne znaczenie w przebiegu zakażenia wynikające, z jednej strony, z zaangażowania w eliminację bakterii na drodze fagocytozy, a z drugiej, w ograniczanie patogenowi dostępu do potencjalnej niszy umożliwiającej mu replikację i unikanie niekorzystnego wewnątrzkomórkowego mikrośrodowiska makrofagów [95].

Podobnie do innych bakterii [91], prątek gruźlicy posiada zdolność wiązania ludzkich fikolin [79, 95]. Początkowo jako bakteryjny ligand zaangażowany w interakcję z fikoliną 2 wskazywany był ManLAM [95]. Jednakże, późniejsze badania wykluczyły udział tego komponentu ściany komórkowej w interakcji z kolektykami zaliczanymi do fikolin. Udowodniono natomiast, iż mykobakteryjnym ligandem umożliwiającym prątkom gruźlicy wiązanie wszystkich trzech ludzkich fikolin są antygeny kompleksu Ag85 [79].

#### 1.4.4. Kolektyna 11

Kolektyna 11 (CL-11/CL-K1) jest białkiem obecnym w surowicy krwi, które jest syntetyzowane głównie przez komórki nadnercza, nerki i wątroby oraz, w mniejszym stopniu, przez komórki płuc [96, 97]. W warunkach fizjologicznych, w osoczu CL-K1 występuje w postaci związanej z pokrewną strukturalnie kolektyką L1 (CL-L1) tworząc heteromeryczny kompleks CL-LK stabilizowany przez wiązania dwusiarczkowe [98]. Kompleks ten wiąże, w sposób zależny od jonów  $Ca^{2+}$ , powierzchniowe oligosacharydowe ligandy różnych mikroorganizmów i komórek apoptotycznych, rozpoznając preferencyjnie L-fukozę i D-mannozę. Konsekwencją tych interakcji jest aktywacja dopełniacza na drodze lektynowej przy udziale proteaz serynowych MASP-1, MASP-2 oraz MASP-3 [98, 99]. Natywne białko CL-LK pełni funkcję krążącego receptora PRR i wiąże motywy mannozowe ManLAM prątka gruźlicy, jednakże opsonizacja ta nie wpływa na przebieg procesu fagocytozy bakterii oraz na ich wewnątrzkomórkowe przeżywanie w ludzkich makrofagach. Ponadto nie stwierdzono

powiązań pomiędzy niedoborem kolektyny CL-K1, skutkującym jednocześnie niedoborem kompleksu CL-LK, a nasiloną wrażliwością na zakażenie *M. tuberculosis*. Wykazano natomiast, iż u pacjentów z aktywną postacią gruźlicy stężenie CL-LK w surowicy jest obniżone i odwrotnie koreluje z poziomem przeciwpłatkowej odpowiedzi odpornościowej [100].

#### 1.4.5. Białka surfaktantu płuc

W zachodzącym w płucach procesie wymiany gazowej kluczową rolę odgrywają, budujące cienkie ściany pęcherzyków płucnych, komórki nabłonkowe, tworzące tzw. barierę krew-powietrze. Anatomiczna lokalizacja nabłonka oddechowego, a także jego rozległa powierzchnia, delikatny charakter i ciągły kontakt ze środowiskiem zewnętrznym powodują, iż bariera ta jest szczególnie wrażliwa i stale narażona na działanie niekorzystnych czynników, obejmujących patogenne mikroorganizmy, alergeny i toksyczne zanieczyszczenia obecne w powietrzu. Dlatego też, pęcherzyki płucne wyposażone są w ewolucyjnie uwarunkowane, wyspecjalizowane mechanizmy chroniące tkankę płuc przed uszkodzeniem będącym wynikiem infekcji lub reakcji zapalnej. Fundamentalną cechą aktywności funkcjonalnej procesów obronnych płuc jest bezwzględna konieczność zachowania równowagi pomiędzy mechanizmami o charakterze prozapalnym i przeciwzapalnym, co warunkuje utrzymanie prawidłowej, fizjologicznej funkcji tego narządu [101].

Jednym z komponentów zaangażowanych w utrzymanie prawidłowej aktywności funkcjonalnej pęcherzyków płucnych jest, syntetyzowany i wydzielany przez komórki nabłonka oddechowego, surfaktant płucny, stanowiący lipoproteinowy kompleks zaadsorbowany na powierzchni interfazy woda-powietrze, która pokrywa wewnętrzną stronę bariery tworzonej przez komórki nabłonkowe. W skład surfaktantu płuc wchodzi lipidy i białka warunkujące jego fizjologiczne funkcje. Komponent lipidowy stanowi od 80% do 90% tego kompleksu i obejmuje m.in., syntetyzowane przez komórki nabłonkowe płuc typu II, fosfatydylocholinę, fosfatydyloglicerol, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloserynę, fosfatydyloetanolaminę oraz cholesterol. Szczególnie istotnym składnikiem frakcji lipidowej surfaktantu płuc jest fosfatydylocholina, występująca w unikatowej postaci dipalmitylofosfatydylocholinie (DPPC), odgrywającej kluczową rolę w utrzymaniu niskiego napięcia powierzchniowego bariery krew-powietrze, co nie tylko ułatwia sam proces oddychania, ale także pozwala zachować powietrzość miąższu

płucnego, gdyż zapobiega zapadaniu się pęcherzyków płucnych podczas wydechu i nadmiernemu ich rozdęciu podczas wdechu. Oprócz lipidów, surfaktant płuc tworzą cztery apoproteiny, SP-A, SP-B, SP-C i SP-D, wytwarzane przez komórki nabłonkowe płuc typu II, a także w przypadku SP-A, SP-B i SP-D przez oskrzelikowe komórki maczugowate (komórki Clary). Białka SP-B i SP-C charakteryzują się silną hydrofobowością i są głównie odpowiedzialne za stabilizację napięcia powierzchniowego w pęcherzykach płucnych, poprzez ułatwianie adsorpcji lipidów surfaktantu płuc na powierzchni interfazy woda-powietrze. Ponadto wskazuje się [102-104], iż białko SP-B wykazuje również aktywność przeciwdrobnoustrojową. Pozostałe dwa, hydrofilowe białka SP-A i SP-D należą do podrodziny kolektyn i są zaangażowane we wrodzone procesy obronne w płucach [101, 105-108]. Ich funkcjonalne znaczenie wynika z modulowania przebiegu wielu mechanizmów odpornościowych, m.in. nasilenia fagocytozy mikroorganizmów poprzez ich bezpośrednią opsonizację lub intensyfikację pochłaniania drobnoustrojów opłaszczonych przez inne opsoniny [109, 110], pobudzania ukierunkowanego przemieszczania się (chemotaksji) komórek [111, 112], a także stymulowania lub hamowania syntezy reaktywnych związków tlenu [113-115] oraz pobudzania produkcji cytokin [101] przez fagocyty.

Kolektyny SP-A i SP-D surfaktantu płuc rozpoznają i wiążą powierzchniowe komponenty cukrowe wielu patogennych drobnoustrojów, bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków, stanowiących czynniki etiologiczne infekcji w obrębie płuc, determinując ich efektywną eliminację. Postuluje się jednak, iż w przypadku zakażeń wywoływanych przez wewnątrzkomórkowe patogeny, aktywność opsonizacyjna SP-A i SP-D może sprzyjać zasiedlaniu komórek gospodarza [101, 105]. Precyzyjne znaczenie obu tych białek surfaktantu płuc w patogenezie gruźlicy nie jest do końca poznane. Dostępne badania dowodzą, iż *M. tuberculosis* wiąże zarówno SP-A, jak i SP-D, jednakże interakcje te skutkują odmiennym efektem w przebiegu zakażenia. Wiązanie białka SP-A surfaktantu przez prątkę gruźlicy wskazywane jest jako mechanizm promujący zarówno wnikanie tego drobnoustroju do makrofagów pęcherzyków płucnych, jak i dalszy rozwój infekcji. Istotną rolę w tym mechanizmie przypisuje się właściwościom opsonizacyjnym SP-A, determinującym interakcję patogenu z docelową komórką, a także modulowaniu przez to białko funkcjonalnej aktywności makrofagów [116]. Konsekwencją oddziaływań *M. tuberculosis* z SP-A jest nasilone przyleganie patogenu do makrofagów i związana z tym intensyfikacja procesu fagocytozy, co ułatwia prątkom

osiągnięcie wewnątrzkomórkowej lokalizacji. Kluczową rolę w tym mechanizmie odgrywają domeny lektynowa i kolagenowa SP-A oraz receptory MR makrofagów, których ekspresja stymulowana jest przez białko surfaktantu płuc [116, 117]. Zależne od receptorów MR przyleganie, opłaszczonych SP-A, prątków gruźlicy do makrofagów pęcherzyków płucnych przyczynia się do hamowania dojrzewania fagosomu oraz syntezy reaktywnych form azotu, stanowiących fundamentalne procesy warunkujące bójczą aktywność tych komórek, umożliwiając patogenowi dostęp do mikrośrodowiska sprzyjającego jego wewnątrzkomórkowemu wzrostowi [115, 118, 119]. Wysokie stężenie SP-A w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym chorych na AIDS oraz pylicę krzemową rozpatrywane jest jako główny czynnik ryzyka zwiększonej zapadalności pacjentów tej grupy na gruźlicę [120-122]. W przeciwieństwie do interakcji z apoproteiną SP-A, wiązanie białka SP-D surfaktantu płuc do komponentów powierzchniowych prętka gruźlicy wydaje się pełnić ochronną rolę w przebiegu wrodzonej odpowiedzi odpornościowej w gruźlicy. Efektem oddziaływań *M. tuberculosis* z SP-D jest aglutynacja komórek patogenu oraz towarzyszące jej hamowanie adhezji bakterii do ludzkich makrofagów, co ułatwia usuwanie bakterii z dróg oddechowych przez system śluzoworzędkowy. Dodatkowo, zaburzanie przez SP-D adhezji prętka gruźlicy do makrofagów prowadzi do ograniczenia procesu fagocytozy i wiążącego się z tym osłabionego wnikania patogenu do docelowych komórek [123]. Ponadto wskazuje się, iż opsonizacja *M. tuberculosis* przez SP-D prowadzi do zmian w obrębie powierzchniowych komponentów ściany komórkowej tego drobnoustroju, których wynikiem jest nasilanie procesu dojrzewania fagosomu, determinującego hamowanie wewnątrzkomórkowego wzrostu bakterii w ludzkich makrofagach [124]. Istotną rolę w tym mechanizmie przypisuje się maskowaniu przez SP-D motywów mannozowych mykobakteryjnego ManLAM i związanemu z tym hamowaniu, zależnego od receptora MR, procesu fagocytozy [119, 124]. Jak wspomniano wcześniej, pełne wyjaśnienie znaczenia interakcji prętka gruźlicy z białkami SP-A i SP-D surfaktantu płuc w przebiegu wrodzonej odpowiedzi odpornościowej wymaga dalszych, systematycznych badań, tym bardziej, iż Hall-Stoodley i wsp., stosując doświadczalny model *in vitro* odwzorowujący warunki panujące w drogach oddechowych, nie stwierdził wpływu tych oddziaływań na przyleganie patogenu do nabłonkowych komórek płuc [125].

W wiązanie białek SP-A i SP-D surfaktantu płuc przez *M. tuberculosis* zaangażowane są kluczowe lipoglikany ściany komórkowej tych bakterii, mianowicie

ManLAM i lipomannan (LM), [123, 124, 126]. Decydującą rolę w interakcjach pomiędzy SP-A i SP-D a ManLAM odgrywają nie tylko końcowe reszty mannozy, ale także jego komponent lipidowy, ponieważ powinowactwo wiązania apoprotein surfaktantu przez ten ligand jest zależne od zawartości reszt acylowych [126]. Ponadto w oddziaływaniach prątka gruźlicy z SP-A uczestniczy także, bogata w alaninę i prolinę, glikoproteina Apa (Rv1860), [Mycobrowser, <https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv1860>], która występuje zarówno w formie wydzielniczej, jak i upostaciowanej, związanej ze ścianą komórkową [127]. Synteza białka Apa jest charakterystyczną cechą patogennych mykobakterii z grupy *Mycobacterium tuberculosis complex*. Wskazuje się, iż wydzielnicza forma tego białka predysponuje je do pełnienia funkcji „pułapki” blokującej receptory PRR, umożliwiając prątkowi gruźlicy manipulowanie odpowiedzią odpornościową makroorganizmu jeszcze przed kontaktem z docelowymi komórkami [128]. Badania funkcjonalnej aktywności glikoproteiny Apa potwierdzają jej zdolność do modulowania odpowiedzi komórek zaangażowanych w mechanizmy odpornościowe w przebiegu zakażenia *M. tuberculosis*. Z jednej strony, białko to indukuje odpowiedź proliferacyjną ludzkich limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> oraz ukierunkowuje odpowiedź odpornościową na mechanizmy typu Th1 poprzez stymulowanie syntezy IFN- $\gamma$  przez te komórki [129]. Dodatkowo, Apa jest pierwszym opisanym białkiem prątków gruźlicy pobudzającym dominującą odpowiedź antygenowo swoistych, cytotoksycznych limfocytów T CD8<sup>+</sup>, warunkowaną przenikaniem tego białka z fagosomu do cytoplazmy zakażonej komórki i jego efektywną prezentacją w kontekście cząsteczek MHC klasy I [130]. Natomiast z drugiej strony, glikoproteina Apa jest czynnikiem osłabiającym efektorowe funkcje komórek dendrytycznych, które są kluczowe dla wytworzenia protekcyjnej odpowiedzi odpornościowej na zakażenie *M. tuberculosis*. Efekt ten jest rezultatem hamowania przez Apa nasilonej ekspresji powierzchniowych cząsteczek kostymulatorowych komórek dendrytycznych (CD40, CD54, CD80, CD86, MHC klasy II) oraz syntezy cytokin prozapalnych (IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ ) przez te komórki, determinujących kooperacje immunokompetentnych komórek i różnicowanie subpopulacji efektorowych limfocytów T. Ograniczenie tych oddziaływań międzykomórkowych w przebiegu zakażenia prątkiem gruźlicy wpływa niekorzystnie nie tylko na efektywność wrodzonych mechanizmów odpornościowych, ale także na rozwój swoistej, komórkowej odpowiedzi odpornościowej typów Th1 i Th2, pełniącej ochronną rolę przeciwko infekcji tym wewnątrzkomórkowym patogenem [131].

## **1.5. Interakcje prątką gruzlicy z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i heparyną**

### **1.5.1. Białka macierzy zewnątrzkomórkowej**

Macierz zewnątrzkomórkowa jest zwartą, trójwymiarową strukturą obejmującą złożoną sieć wielu różnych makrocząsteczek, których kompozycja wykazuje zależność tkankową i narządową. W skład macierzy zewnątrzkomórkowej wchodzi ok. 300 różnych białek obejmujących glikoproteiny kolagenowe, proteoglikany i glikoproteiny niekolagenowe. Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej wypełniają przestrzeń międzykomórkową i są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy tkanek, nie tylko poprzez zachowanie ich fizjologicznej integralności i elastyczności, ale także poprzez warunkowanie i regulację fundamentalnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja i różnicowanie, adhezja, migracja czy apoptoza. U podłoża wielofunkcyjności macierzy zewnątrzkomórkowej leży jej dynamicznie zmieniająca się struktura, podlegająca ciągłej przebudowie, determinowanej zarówno starzeniem się organizmu, jak i procesami patologicznymi i naprawczymi przebiegającymi w obrębie danej tkanki. W modelowanie struktury zaangażowane są, związane z macierzą, komponenty o aktywności enzymatycznej (np. metaloproteinazy, katepsyna G, elastaza) oraz inne bioaktywne, rozpuszczalne cząsteczki, takie jak cytokiny, glikokortykoidy czy produkty stresu oksydacyjnego. Ponadto na przebudowę mają wpływ również egzogenne czynniki natury mechanicznej, mianowicie nacisk i rozciąganie. Regulowana aktywność macierzy zewnątrzkomórkowej warunkowana jest nieustannym oddziaływaniem jej składników z komórkami nabłonkowymi. Wzajemne relacje pomiędzy macierzą a komórkami mają charakter dwustronnej współzależności. Z jednej strony, komponenty macierzy pełnią funkcję ligandów wiążących integrynowe receptory komórkowe, uczestnicząc tym samym w aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych regulujących metabolizm komórkowy. Natomiast z drugiej strony, poprzez syntezę i wydzielanie, a także magazynowanie aktywnych biologicznie związków, komórki nabłonkowe modulują przebudowę struktury macierzy. Współdziałanie komórek z macierzą zewnątrzkomórkową jest kluczowym mechanizmem zapewniającym szybką komórkową odpowiedź na zmiany zachodzące w otaczającym mikrośrodowisku. Istotną właściwością macierzy zewnątrzkomórkowej, na płaszczyźnie jej regulatorowej aktywności, jest także zdolność modulowania biodostępności cytokin i czynników wzrostu poprzez ich wychwytywanie, wiązanie i magazynowanie. Dodatkowo, struktura

ta stanowi rezerwuar bioaktywnych cząsteczek powstałych na drodze kontrolowanej proteolizy jej komponentów [132, 133].

Oprócz funkcji biologicznego rusztowania i regulatora metabolizmu komórkowego, macierz zewnątrzkomórkowa płuc odgrywa również kluczową rolę w rozwoju i przebiegu procesów odpornościowych w obrębie tego narządu. Modulowanie mechanizmów odpornościowych płuc przez składowe macierzy zewnątrzkomórkowej warunkowane jest ich interakcjami z receptorami PRR komórek zaangażowanych we wrodzoną odpowiedź odpornościową. W tym kontekście macierz zewnątrzkomórkowa płuc rozpatrywana jest jako rezerwuar alarmin czyli wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*). W warunkach fizjologicznie prawidłowych alarminy występują w, związanej z komponentami macierzy, izolowanej postaci, co ogranicza ich interakcje z docelowymi receptorami PRR. Jednakże zaburzenia homeostazy płuc, będące wynikiem ich uszkodzenia, zakażenia lub rozwoju procesu zapalnego w obrębie tego narządu prowadzą do pobudzenia napływu leukocytów do macierzy zewnątrzkomórkowej, umożliwiając w ten sposób oddziaływanie tych dwóch zasadniczych elementów nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. W interakcje z komórkowymi receptorami PRR, takimi jak TLR2, TLR4, TLR6, zaangażowane są proteoglikany (wersikan, biglikan, dekoryna), glikozaminoglikany (hialuronian) oraz niekolagenowe glikoproteiny (tensacyna C, fibronektyna) macierzy płuc. Oprócz bezpośredniego oddziaływania z receptorami PRR, komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej płuc pośrednio wiążą komórkowe receptory integrynowe. W mechanizmie tym pośredniczą, syntetyzowane i wydzielane przez aktywowane leukocyty, komórkowe białka (np. periostyna, osteopontyna) pełniące funkcje biologicznych łączników pomiędzy komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej i błonowymi receptorami. Ponadto proteoglikany i glikozaminoglikany macierzy płuc, poprzez wiązanie chemokin (IL-8, MIF), przyczyniają się do wytworzenia gradientu ich stężenia i związanej z tym ukierunkowanej migracji leukocytów, warunkowanej obecnością komórkowych receptorów swoistych dla chemotaktycznych cytokin. Dodatkowo, wiązanie cytokin przez składniki macierzy zewnątrzkomórkowej płuc chroni je przed proteolityczną degradacją, wydłużając okres ich biologicznej aktywności [134].

Podkreśla się istotne znaczenie macierzy zewnątrzkomórkowej płuc w regulowaniu interakcji gospodarz-patogen w przebiegu gruźlicy. Przypuszczalnie, oddziaływanie

komponentów macierzy z komórkami płuc w trakcie zakażenia prątkiem gruźlicy wpływają na uruchamianie mechanizmów odpornościowych poprzez modulowanie a) fuzji fagosomów z lizosomami, b) syntezy prozapalnych cytokin, c) procesu autofagii oraz d) aktywacji immunokompetentnych komórek. Badania ostatnich lat wykluczyły przyjęty paradygmat zakładający, iż następstwem, charakterystycznych dla infekcji *M. tuberculosis*, patologicznych zmian martwiczych tkanki płuc są zaburzenia struktury macierzy zewnątrzkomórkowej. Shammari i wsp. udowodnili bowiem całkowicie odwrotną zależność, wskazując krytyczne znaczenie wczesnych uszkodzeń włókien kolagenowych macierzy płuc w rozwoju zmian martwiczych i osłabianiu efektywności przeciwprątkowej odpowiedzi odpornościowej. Konsekwencją tych zmian jest wytworzenie immunologicznie uprzywilejowanego mikrośrodowiska stanowiącego niszę dla wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania prątka gruźlicy. Niszczenie struktury kolagenowej macierzy płuc w przebiegu gruźlicy związane jest z nasiloną syntezą metaloproteinaz MMP-1, MMP-7 i MMP-10 oraz MMP-8, odpowiednio, przez aktywowane monocyty i makrofagi oraz napływające do płuc neutrofile [135, 136]. Wykazano, iż monocyty zakażone *M. tuberculosis* charakteryzują się podwyższoną ekspresją integrynowego receptora  $\alpha V\beta 3$  promującego ich adhezję do komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej płuc. W oddziaływania te zaangażowane są, tworzące macierz, kolagen typu I i fibronektyna, a ich rezultatem jest pobudzenie wytwarzania przez fagocyty destabilizujących macierz metaloproteinaz [136].

Obok warunkowania interakcji macierzy płuc z komórkami, fibronektyna, a także laminina są bezpośrednio wiązane przez mykobakteryjne adhezyny, co może stanowić jeden z prominentnych mechanizmów ułatwiających prątkom wnikanie do docelowych komórek i kolonizację tkanek [137-139]. Fibronektyna umożliwia przyleganie tych bakterii do makrofagów pęcherzyków płuc, a w mechanizmie tym istotną rolę odgrywają domena wiążąca komórkowe ligandy (CRD, *cell binding domain*) i, warunkująca interakcje z prątkami, domena wiążąca heparynę (HBD, *heparin binding domain*) tej glikoproteiny [139]. Natomiast białkami *M. tuberculosis* uczestniczącymi w interakcjach z fibronektyną są glikoproteina Apa oraz antygeny A i B kompleksu antygenowego Ag85 [84, 137, 140]. Ponadto zarówno fibronektyna, jak i laminina wiązane są przez, pełniącą dodatkową funkcję adhezyny, syntazę jabłczanową (Rv1837c, GlcB) prątka gruźlicy, co skutkuje intensyfikacją przylegania patogenu do pneumocytów [138]. Syntaza jabłczanowa jest enzymem cyklu gliksylanowego, niezbędnego



w metabolizmie kwasów tłuszczowych, i jest aktywna w komórkach prątków wewnątrzkomórkowo namnażających się w makrofagach. Enzym ten katalizuje syntezę jabłczanu z wykorzystaniem glioksyłanu i acetylokoenzymu A. Część cząsteczki syntazy jabłczanowej pozbawiona jest domeny warunkującej transport białek cytoplazmatycznych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jednakże mimo to potwierdzono obecność tego enzymu w ścianie komórkowej prątka gruźlicy oraz w podłożu pochodowlanym. Mechanizm uwalniania syntazy jabłczanowej z cytoplazmy do środowiska pozakomórkowego nie jest znany, niemniej uważa się, że białko to jest aktywnie transportowane, a w jego wiązanie ze ścianą komórkową prątków zaangażowane są „kotwiczące” cząsteczki receptorowe. Unikatowa lokalizacja potencjalnie wyłącznie cytoplazmatycznego enzymu wskazuje, iż syntaza jabłczanowa *M. tuberculosis*, oprócz swej typowej aktywności enzymatycznej, pełni alternatywną rolę w przebiegu zakażenia funkcjonując jako bakteryjna adhezyna [138, 141, 142]. Syntaza jabłczanowa jest istotnym czynnikiem patogenności prątka gruźlicy determinującym właściwości adaptacyjne tego drobnoustroju w trakcie infekcji makrofagów. Niedobór syntezy tego enzymu jest bezpośrednim powodem zwiększonej wrażliwości patogenu na stres oksydacyjny i nitrozacyjny oraz osłabionej zdolności do tworzenia biofilmu. Ponadto enzym ten hamuje wytwarzanie syntazy tlenku azotu (iNOS) i dojrzewanie fagosomu w makrofagach pęcherzyków płuc, umożliwiając przetrwanie prątka gruźlicy w komórkach gospodarza [142].

Inną mykobakteryjną adhezyną wiążącą lamininę jest białko ESAT-6 wydzielane przez system ESX-1 *M. tuberculosis*. Oprócz warunkowania adhezji bakterii do docelowych komórek, ESAT-6 wykazuje aktywność cytolityczną i jest przedstawicielem grupy porotwórczych toksyn, uznawanych za kluczowe czynniki patogenności drobnoustrojów. Konsekwencją aktywności biologicznej ESAT-6 jest liza błon wewnątrzkomórkowych organelli i zewnętrznej błony komórkowej, determinująca przemieszczanie się prątka gruźlicy z fagosomu do cytoplazmy i kolonizację sąsiadujących komórek, a także indukcję procesu apoptozy komórki oraz hamowanie syntezy IFN- $\gamma$  i odpowiedzi limfocytów T. Nasiloną transkrypcję genu *esat6* obserwowano w komórkach *M. tuberculosis*, namnażających się wewnątrzkomórkowo w pneumocytach, a także w płucach myszy zakażonych szczepem mutantem *M. bovis* BCG noszącym ten gen. Sugeruje się, iż nasilenie transkrypcji genu *esat6* stanowi mechanizm umożliwiający prątkom nabywanie inwazyjnego fenotypu. Interakcja białka

ESAT-6 z lamininą błon komórkowych pneumocytów typu I i II przyczynia się do jego gromadzenia w miejscu infekcji i wytworzenia jego lokalnego wysokiego stężenia, co skutkuje efektywną lizą komórek makroorganizmu i prowadzi do tworzenia zmian martwiczych. Zależne od ESAT-6 uszkodzenie nabłonka płuc oraz, dodatkowo, synteza i wydzielanie cytokin przez pneumocyty pobudzają migrację zapalnych komórek do płuc, co z jednej strony zapewnia obecność komórek uczestniczących w tworzeniu ziarniniaków, a z drugiej umożliwia dalszy rozsiew patogenu z wykorzystaniem napływających fagocytów [143, 144]. Wykazano, iż nasiloną syntezą białka ESAT-6 jest charakterystyczna dla wczesnej fazy infekcji *M. tuberculosis*, jeszcze przed rozwojem efektywnych przeciwpłatkowych mechanizmów odpornościowych, i może warunkować obserwowany w tym okresie rozsiew patogenu do innych tkanek [143, 145, 146]. Oprócz interakcji z lamininą, białko ESAT 6 bezpośrednio wiąże się z receptorem TLR2 i z  $\beta$ -2-mikroglobuliną, odpowiednio, hamując zależne od TLR2 szlaki sygnałowe makrofagów i zaburzając proces prezentacji antygenów przez te komórki [147, 148].

### 1.5.2. Heparyna

Heparyna jest bogatym w siarczany glikozaminoglikanem, który wydzielany jest przez komórki tuczne i bazofile w miejscach uszkodzenia tkanek. Chociaż fizjologiczna funkcja heparyny nie została dotychczas w pełni wyjaśniona, to zdolność do wiązania wielu ludzkich białek sugeruje jej zaangażowanie w zróżnicowane biologiczne procesy [149, 150]. Heparyna odgrywa istotną rolę w magazynowaniu licznych proteaz, w ziarnistościach komórek tucznych, a także w pobudzaniu procesów mitozy i migracji komórek śródbłonkowych [151-153]. Ponadto wskazuje się na immunoregulatorowe funkcje tego glikozaminoglikanu wynikające z hamowania aktywności układu dopełniacza i migracji leukocytów, a także modulowania syntezy cytokin [154-157]. Heparyna uczestniczy również w modulowaniu struktury macierzy zewnątrzkomórkowej. Poprzez wiązanie fibronektyny, heparyna przyczynia się do zmian konformacyjnych tego białka macierzy, warunkując nasilone wiązanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Postuluje się, iż heparyna pełni funkcję biologicznego łącznika wiążącego zarówno fibronektynę, jak i VEGF, i jest odpowiedzialna za interakcje fibronektyny z VEGF [158]. Aktywność funkcjonalna heparyny związana jest także z regulowaniem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów żelaza poprzez hamowanie syntezy hepcydyny oraz nasilanie syntezy

ferroportyny w hepatocytach i makrofagach. Mechanizm ten odgrywa istotne znaczenie w przebiegu zakażenia prątkiem gruźlicy, gdyż ogranicza, zlokalizowanemu w makrofagach, patogenowi dostępność do jonów żelaza, które są niezbędne dla jego wewnątrzkomórkowego wzrostu. Dodatkowo heparyna poprzez wiązanie powierzchniowej hemaglutyniny HbhA prątka gruźlicy ogranicza jego wnikanie do nabłonkowych komórek i rozsiew do innych tkanek [159, 160].

Mykobakteryjna HbhA jest wielofunkcyjnym białkiem, które początkowo zostało opisane jako komponent ściany komórkowej prątka gruźlicy, warunkujący jego adhezję do nabłonkowych komórek płuc poprzez wiązanie, bogatych w siarczany, węglowodanowych kompleksów występujących w błonie docelowych komórek. Organiczona, do prątków infekujących nabłonkowe komórki płuc, ekspresja HbhA, a także selektywne wiązanie przez HbhA błonowych polisacharydów komórek nabłonkowych, a nie makrofagów, wskazuje na istotną rolę hemaglutyniny w patogenności prątka gruźlicy, wynikającą z udziału tego białka w infekcji pneumocytów stanowiących niszę dla wewnątrzkomórkowego wzrostu patogenu i jego dalszego rozprzestrzeniania się w organizmie. Ponadto HbhA jest nie tylko zaangażowana w interakcje patogen-komórka eukariotyczna, ale także bierze udział w oddziaływaniach pomiędzy komórkami prątka gruźlicy, których rezultatem jest autoagregacja bakterii, rozpatrywana jako mechanizm nasilających ich zjadliwość [160-162]. Oprócz powierzchniowej lokalizacji, HbhA występuje także w cytoplazmie *M. tuberculosis*, uczestnicząc w tworzeniu i stanowiąc komponent pęcherzyków lipidowych, których akumulacja zachodzi w namnażających się wewnątrzkomórkowo, w makrofagach, komórkach prątka gruźlicy [163]. Ponadto zwraca się uwagę na immunogenne i immunoprotekcyjne właściwości HbhA, a także na jej przydatność diagnostyczną w różnicowaniu latentnej postaci gruźlicy. Hemaglutynina HbhA indukuje silną syntezę IFN- $\gamma$  przez limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> osobników z latentnym zakażeniem *M. tuberculosis*, a także pobudza aktywność cytotoksyczną limfocytów T CD8<sup>+</sup>, uwarunkowana uwalnianiem perforyny i granzymów [161]. Przyleganie bakterii do komórek nabłonka pęcherzyków płucnych przy udziale HbhA może być jednym z mechanizmów wykorzystywanych przez prątka gruźlicy do inwazji komórek niefagocytarnych oraz rozprzestrzeniania się bakterii naczyniami krwionośnymi do innych organów. Jednakże, udowodniono, iż wiązanie heparyny przez prątka gruźlicy,

przy udziale mykobakteryjnego białka HbhA, hamuje adhezję tych bakterii do pneumocytów [160].

## **1.6. Rola surowiczego amyloidu A (SAA) w patogenezie zakażeń**

### **1.6.1. Reakcja ostrej fazy oraz białka ostrej fazy**

Reakcja ostrej fazy jest ogólnoustrojowym mechanizmem, stanowiącym istotny element wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, który uruchamiany jest na skutek lokalnego lub uogólnionego zaburzenia homeostazy makroorganizmu. Oprócz nasilenia procesów odpornościowych, wiąże się ona również z szeregiem ukierunkowanych zmian biochemicznych, hematologicznych, endokrynnych, a nawet neurologicznych. Czynniki indukujące rozwój reakcji ostrej fazy charakteryzują się dużym zróżnicowaniem i obejmują zarówno infekcje drobnoustrojowe, jak i uszkodzenie oraz zmiany patologiczne tkanek, a także procesy zapalne o różnej etiologii. Klinicznymi markerami odpowiedzi typu ostrej fazy są gorączka, niedożywienie i uszkodzenie tkanek, zmiany przepuszczalności naczyń oraz szczególnie charakterystyczne zmiany profilu biosyntezy ponad 200 różnych białek, określanych terminem białek ostrej fazy (APPs, *acute phase proteins*). Głównym źródłem APPs są hepatocyty, jednakże białka te wytwarzane są również przez immunokompetentne komórki, mianowicie monocyty, limfocyty i makrofagi pęcherzyków płucnych, a także przez komórki ściany naczyń krwionośnych. Synteza APPs jest, natomiast, rezultatem komórkowej odpowiedzi na pobudzenie przez prozapalne cytokiny i chemokiny, produkowane i uwalniane przez aktywowane, w wyniku rozwoju nieswoistych mechanizmów odpornościowych, leukocyty oraz komórki nabłonkowe, fibroblasty i keratynocyty. Aktywność funkcjonalna cytokin i chemokin ma fundamentalne znaczenie dla przebiegu szerokiego spektrum mechanizmów o charakterze synergistycznym i antagonistycznym, które modulują przebieg procesów odpornościowych determinujących rozwój nieswoistej odpowiedzi typu ostrej fazy, niezbędnej do eliminacji etiologicznego czynnika zakażenia, ograniczenia procesu zapalnego i przywrócenia równowagi fizjologicznej tkanek. Kluczową rolę w stymulowaniu syntezy APPs przez komórki wątroby odgrywają TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6, których wiązanie ze swoistymi receptorami błonowymi hepatocytów, a także komórek Kupffera inicjuje wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, warunkujące aktywację czynników transkrypcyjnych i dalszą transkrypcję genów kodujących APPs. Spośród wymienionych prozapalnych cytokin, IL-6 wskazywana jest jako główny

czynnik stymulujący wydzielanie większości APPs przez hepatocyty. Dodatkowo, biologiczna aktywność IL-6 jest pośrednio nasilana poprzez stymulację jej syntezy przez, pobudzone IL-1 i TNF- $\alpha$ , fibroblasty, keratynocyty i komórki śródbłonkowe [164-168].

Pod względem aktywności funkcjonalnej i właściwości fizykochemicznych APPs stanowią heterogenną grupę, a kryterium decydującym o przynależności danego białka do APPs jest co najmniej 25% zmiana jego surowiczego stężenia w przebiegu reakcji ostrej fazy. Jedną z form klasyfikacji białek APPs jest ich podział na białka pozytywne (dodatnie) i negatywne (ujemne), oparty na, odpowiednio, wzroście lub spadku ich stężenia w surowicy krwi. Ponadto podział pozytywnych białek APPs uzupełnia wyróżnienie trzech ich grup, w zależności od wielkości wzrostu ich stężenia. Grupa pierwsza (major) obejmuje białka APPs, których stężenia zmieniają się szybko w trakcie reakcji ostrej fazy, osiągając 100-1000-krotnie wyższe poziomy w porównaniu do ich fizjologicznych stężeń. Grupa druga (moderate) to białka APPs, których stężenia wzrastają 2-10-krotnie, natomiast grupa trzecia (minor) skupia białka APPs charakteryzujące się nieznacznym, 2-3-krotnym nasileniem ich syntezy, nie przekraczającym 50% ich fizjologicznego stężenia [164, 166, 167].

Spośród wielu pozytywnych APPs, głównymi białkami tej grupy są białko C-reaktywne (CRP) oraz surowiczy amyloid A (SAA), których stężenie wzrasta nawet 1000-krotnie w trakcie 4 godzin od momentu zadziałania czynnika indukującego rozwój reakcji ostrej fazy. Efektem wzrostu stężenia pozytywnych APPs (**Tabela 2**), obejmujących białka zarówno o charakterze prozapalnym, jak i przeciwzapalnym, jest nasilenie ich funkcjonalnej aktywności przejawiającej się jako mobilizacja lub hamowanie odpowiedzi odpornościowej, zwiększenie przepływu krwi w naczyniach krwionośnych i nasilanie migracji leukocytów do miejsca infekcji lub stanu zapalnego oraz wspomaganie procesu fagocytozy drobnoustrojów poprzez ich opsonizację. Jednocześnie, pozytywne APPs odpowiedzialne są również za ograniczanie stanu zapalnego poprzez hamowanie biologicznej aktywności prozapalnych cytokin, enzymów proteolitycznych oraz oksydaz, których synteza, nagromadzenie oraz przedostawanie się do krwioobiegu podczas rozwoju reakcji zapalnej mogą przyczyniać się do uszkodzenia zdrowych tkanek [164-166].

Z kolei wiodącym białkiem spośród negatywnych APPs jest albumina, której spadek surowiczego stężenia w przebiegu reakcji ostrej fazy rozpatrywany jest jako mechanizm mający na celu zapewnienie dostępu do optymalnej puli aminokwasów

niezbędnych do syntezy pozytywnych APPs [164]. Ponadto spadek poziomu innych negatywnych APPs, takich jak transtyretyna (prealbumina), wiążąca kortykosteroidy transkortyna oraz białko wiążące retinol prowadzi do wzrostu stężenia wolnych hormonów, odpowiednio, hormonów tarczycy i kortyzolu, oraz witaminy A [166, 169].

Tabela 2. Rodzaje oraz funkcje pozytywnych białek reakcji ostrej fazy [164-166]

<b>POZYTYWNE BIAŁKA OSTREJ FAZY</b>	<b>FUNKCJA</b>
<b>Białko C-reaktywne (CRP)</b>	Opsonizacja, aktywacja dopełniacza, indukcja produkcji cytokin przez immunokompetentne komórki
<b>Surowiczy amyloid A (SAA)</b>	Opsonizacja, indukcja produkcji cytokin przez immunokompetentne komórki, aktywność chemotaktyczna, regulacja metabolizmu lipidów
<b>Białko C3 dopełniacza</b>	Opsonizacja, chemotaksja
<b>Haptoglobina (Hb)</b>	Wiązanie hemoglobiny, działanie antyoksydacyjne
<b>Hemopeksyna</b>	Wychwytywanie wolnego hemu
<b>Fibrynogen</b>	Aktywacja trombocytów, procesu krzepnięcia krwi i naprawy tkanek
<b>Plazminogen</b>	Pobudzanie procesów naprawy i przebudowy tkanek
<b>Lektyna wiążąca mannozę (MBL)</b>	Opsonizacja, aktywacja dopełniacza na drodze lektynowej
<b>Ceruloplazmina</b>	Wiązanie wolnych rodników oraz jonów Fe <sup>2+</sup>
<b>α-2-makroglobulina</b>	Hamowanie aktywności proteaz
<b>α-1-kwaśna glikoproteina (AGP)</b>	Hamowanie agregacji płytek krwi, indukcja produkcji cytokin przez immunokompetentne komórki
<b>α-1-antytrypsyna α-1-antychymotrypsyna</b>	Hamowanie aktywności proteaz serynowych, serpiny oraz enzymów lizosomalnych

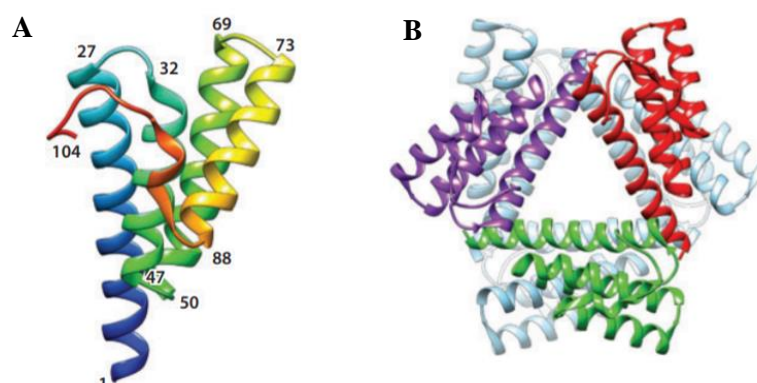
### 1.6.2. Surowiczy amyloid A

Termin surowiczy amyloid A (SAA) odnosi się do grupy konserwatywnych białek, w skład której wchodzi także główne, pozytywne białko ostrej fazy. Izoforny ludzkiego SAA kodowane są przez cztery geny, *SAA1*, *SAA2*, *SAA3* i *SAA4*, zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 11p15.1. Geny *SAA1* i *SAA2* występują, odpowiednio, w 3 i 2 wariantach allelicznych, zawierających cztery egzony i trzy introny, a ich produktami są białka ostrej fazy SAA1 i SAA2. W regionach promotorowych tych genów

obecne są sekwencje rozpoznające czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B i NF-IL6, a także sekwencja aktywująca SAS, warunkujące indukcyjną ekspresję ich produktów. Gen *SAA3* obejmuje trzy egzony i dwa introny, i pierwotnie definiowany był jako pseudogen posiadający defektywny promotor oraz jednonukleotydową insercję w kodonie 31 determinującą zmianę ramki odczytu [170]. Późniejsze badania udowodniły jednak tkankowo specyficzną transkrypcję tego genu, ograniczoną do nabłonkowych komórek gruczołu sutkowego [171], a także potwierdzono obecność jego produktu, mianowicie, zbudowanego z 42 aminokwasów, białka *SAA3* [172]. Podobnie do *SAA1* i *SAA2*, gen *SAA4* zawiera cztery egzony i trzy introny, jednakże jego region promotorowy obejmuje jedynie skróconą sekwencję rozpoznającą czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, natomiast nie występują w nim, charakterystyczne dla białek ostrej fazy, sekwencja CTGGGA oraz sekwencja rozpoznająca czynnik transkrypcyjny NF-IL6. Produktem genu *SAA4* jest konstytutywne, surowicze białko *SAA4* zbudowane z 112 aminokwasów, określane terminem „konstytutywny” SAA (C-SAA), [170, 173-175].

Klasyfikowane jako główne, pozytywne białko ostrej fazy (A-SAA), izoformy *SAA1* i *SAA2* ludzkiego surowiczego amyloidu A wykazują 92% homologii na poziomie sekwencji aminokwasowej, a ich monomeryczne cząsteczki (**Ryc. 7**) zbudowane są ze 104 aminokwasów zorganizowanych w cztery, tworzące kształt stożka, unikatowo skręcone  $\alpha$ -helisy (h1-h4), obejmujące miejsca 1-27 (h1), 32-47 (h2), 50-69 (h3) i 73-88 (h4). Region C-końcowy cząsteczki A-SAA (aa 89-104) jest owinięty wokół struktury tworzonej przez  $\alpha$ -helisy i odgrywa istotną rolę w jej stabilizacji, natomiast amfipatyczna część N-końcowa białka (aa 1-15) zaangażowana jest w interakcje z lipidami, a także sugeruje się jej związek z procesem amyloidogenezy. Ponadto w cząsteczce A-SAA zidentyfikowano potencjalny region wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (aa 48-51), regiony podobne do komórkowych domen wiążących fibronektynę (aa 39-41) i lamininę (aa 29-33) oraz dwa regiony wiążące glikozaminoglikany, z których jeden jest wskazywany również jako potencjalne miejsce wiązania lipoproteiny wysokiej gęstości (HDL, *high density lipoprotein*). W warunkach fizjologicznych wolny, surowiczy A-SAA występuje w postaci stabilnych heksamerów, tworzonych przez dwie identyczne struktury trimeryczne [170, 173, 176], natomiast wiązanie A-SAA do HDL warunkowane jest dysocjacją heksamerycznej cząsteczki do monomerów oraz tworzeniem przez  $\alpha$ -helisy h1 i h3 wklęsłej, apolarniej powierzchni. Dodatkowo postuluje się, iż za wiązanie HDL

odpowiedzialne są części N-końcowe  $\alpha$ -helis h1 i h3, natomiast ich fragmenty C-końcowe uczestniczą w interakcjach A-SAA z receptorami oraz innymi ligandami [175].



**Ryc. 7. Budowa strukturalna monomerycznej (A) oraz heksametycznej (B) cząsteczki A-SAA [177, 178]**

Po raz pierwszy A-SAA został zidentyfikowany jako główny komponent złogów amyloidowych, stanowiących charakterystyczne, patologiczne zmiany towarzyszące przebiegowi amyloidozy AA, określanej dawniej amyloidozą wtórną, która jest głównym klinicznym powikłaniem przewlekłych chorób zapalnych. Oprócz A-SAA, integralnymi składnikami wykrywanymi w złogach tworzonych przez włókna amyloidowe są także glikozaminoglikany, lipidy oraz surowiczy amyloid P. Dotychczas nie zostały poznane dokładne molekularne mechanizmy warunkujące powstawanie strukturalnie nieprawidłowych, nierozpuszczalnych form A-SAA, związanych z przyjmowaniem przez to białko konformacji  $\beta$ -harmonijki. Fundamentalnym czynnikiem warunkującym tworzenie amyloidowych nici typu  $\beta$  jest długotrwanie utrzymujące się wysokie stężenie A-SAA, występujące w przebiegu wielu chorób zarówno o podłożu infekcyjnym (np. gruźlica, trąd, zakażenia wirusowe), jak i autoimmunologicznym, nowotworowym czy zapalnym. Zjawiskiem poprzedzającym amyloidogenezę jest wystąpienie wysokiego stężenia wolnego, surowiczego A-SAA będącego rezultatem dysocjacji tego białka z kompleksów z HDL. Sugeruje się, iż dysocjacja A-SAA od HDL zależna jest od obecności siarczanu heparanu, co wskazuje, iż w mechanizm ten są zaangażowane glikozaminoglikany, konkurujące z A-SAA o wiązanie do HDL. Istotne znaczenie w rozwoju amyloidozy AA może odgrywać także różnorodność oligomerycznych form A-SAA, z których jedynie heksamery nie wykazują amyloidogennych właściwości. Ponieważ zdecydowana większość przypadków amyloidozy AA dotyczy zmian konformacyjnych izoformy SAA1, kolejnym kluczowym czynnikiem rozpatrywanym w kontekście amyloidogenezy jest polimorfizm genu *SAA1*, determinujący występowanie



w cząsteczkach SAA1 różnych aminokwasów w określonych pozycjach łańcucha polipeptydowego. Powstawanie form A-SAA o właściwościach amyloidogennych może być również wynikiem aktywności enzymatycznej związanej z makrofagami. Udowodniono, iż A-SAA pobierany przez otrzewnowe makrofagi, w sposób zależny od swoistych receptorów, podlega wewnątrzkomórkowej modyfikacji warunkowanej przez enzymy lizosomalne, co prowadzi do powstawania immunoreaktywnych fragmentów, często wykrywanych w amyloidowych złogach [177-179].

Fizjologiczne, surowicze stężenie A-SAA wśród osobników populacji człowieka jest niskie i wynosi około 1-2  $\mu\text{g/ml}$ . Gwałtowny i intensywny, nawet 1000-krotny, wzrost poziomu tego białka towarzyszy reakcji ostrej fazy indukowanej infekcją, urazem lub uszkodzeniem tkanek i narządów, procesem nowotworowym, a także chorobami o podłożu zapalnym [170, 180]. Ponadto potencjalnymi czynnikami warunkującymi osobnicze stężenie A-SAA mogą być: wiek, płeć, ciąża oraz wskaźnik masy ciała (BMI, *body mass index*), [181]. Stwierdzono m.in. wzrost surowiczego stężenia A-SAA powyżej 30 roku życia [181], a także u osób otyłych, w przypadku których redukcji masy ciała towarzyszyło znamienne obniżenie poziomu tego białka w surowicy [182].

W surowicy krwi A-SAA jest apolipoproteiną, krążącą głównie w postaci związanej z HDL, jednakże białko to tworzy także kompleksy z innymi surowiczymi lipoproteinami, mianowicie lipoproteiną niskiej gęstości (LDL, *low density lipoprotein*), lipoproteiną pośredniej gęstości (IDL, *intermediate density lipoprotein*) oraz lipoproteiną bardzo małej gęstości (VLDL, *very low density lipoprotein*), [183, 184]. Wiązanie A-SAA do HDL dotyczy przede wszystkim frakcji HDL<sub>3</sub> o najwyższej gęstości i jest procesem charakteryzującym się wysoką dynamiką, zależnym od stężenia białka ostrej fazy. Mechanizmem tworzenia kompleksów A-SAA-HDL<sub>3</sub> warunkowany jest wysokim powinowactwem A-SAA do wiązania tej lipoproteiny i obejmuje oddysocjowanie od HDL<sub>3</sub> cząsteczek apolipoproteiny A-I (apoA-I) i zastąpienie ich cząsteczkami A-SAA, czemu towarzyszy przebudowa powierzchni lipoproteiny prowadząca do zwiększenia średnicy i gęstości cząsteczek nowo powstałych kompleksów. Występująca w przebiegu reakcji ostrej fazy synteza wysokich stężeń wolnego surowiczego amyloidu A przyczynia się do znamiennej wymiany komponentu apolipoproteinowego HDL<sub>3</sub>, którego aż 80% może stanowić A-SAA. Ponadto kompleksy A-SAA-HDL<sub>3</sub> wykazują polidispersyjny charakter warunkowany kompozycją apolipoproteinowego komponentu, co z kolei zależne jest od molowych ilości oddysocjowanej apoA-I i związanego A-SAA. Wykazano,

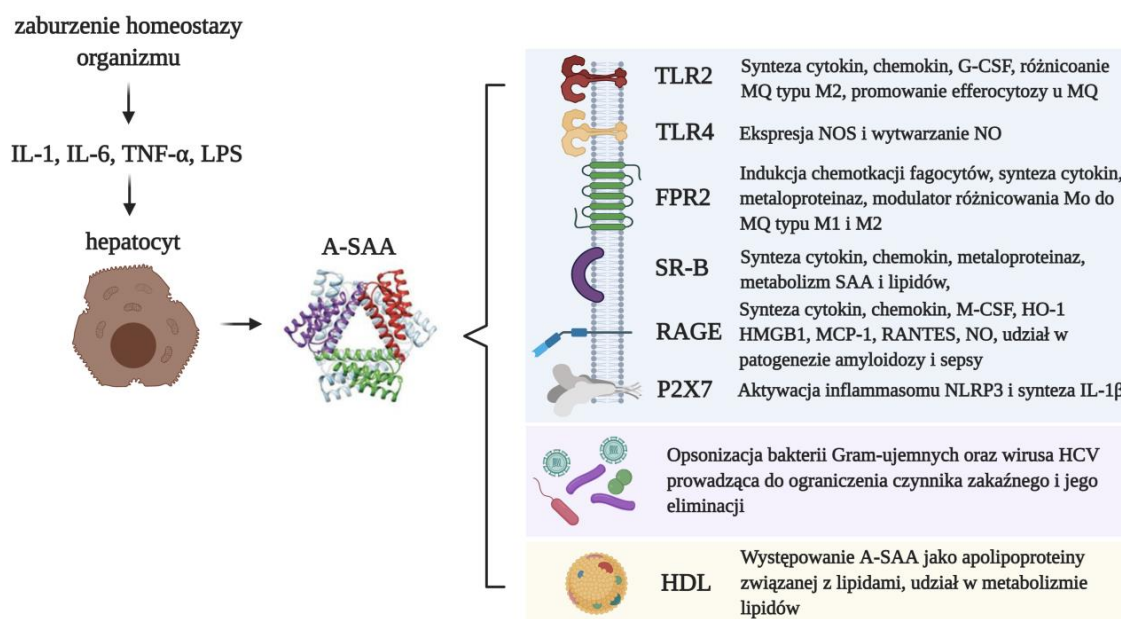
iz skład apolipoproteiny związanej z HDL<sub>3</sub> jest złożony i zróżnicowany, i może obejmować zarówno A-SAA, apoA-I i apolipoproteinę A-II (apoA-II), jak i A-SAA wraz z apoA-I [184]. Mimo, iż wiązanie A-SAA do HDL<sub>3</sub> nie wpływa na ilościowy skład białkowo – lipidowy tej lipoproteiny, to przyczynia się do zmiany jej funkcjonalnej aktywności. W warunkach fizjologicznych HDL wykazuje właściwości przeciwzapalne odgrywające istotną rolę w ochronie LDL przed oksydacyjnymi modyfikacjami, skutkującymi cytotoksycznością w stosunku do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Mechanizm ten jest konsekwencją enzymatycznej aktywności, związanych z cząsteczką apoA-I, paraoksonazy (PON) i PAF-acetylohydrolazy (PAF-AH), katalizujących hydrolizę biologicznie aktywnych lipidów w modyfikowanej cząsteczce LDL. Zastępowanie apoA-I przez A-SAA przyczynia się do spadku bądź utraty biologicznych właściwości warunkowanych obecnością PON i PAF-AH, co skutkuje nabywaniem przez HDL cech cząsteczki prozapalnej i zahamowaniem jego antyoksydacyjnej aktywności [185].

Podobnie do innych APPs, głównym źródłem indukcyjnej syntezy A-SAA w przebiegu reakcji ostrej fazy są komórki wątroby – hepatocyty, jednakże białko to jest również wytwarzane niezależnie od wątroby przez zapalne makrofagi, a także przez komórki patologicznie zmienionych tkanek, np. płytek miażdżycowych, mózgowia pacjentów z chorobą Alzheimer'a oraz tkanki maziowej chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Natomiast, w warunkach fizjologicznych większość SAA produkowana jest w tkance tłuszczowej przez adipocyty, a także przez nabłonkowe komórki płuc, kanalików nerkowych, zrazików piersiowych, gruczołu krokowego, błony śluzowej jelit i okrężnicy oraz przez limfocyty i komórki plazmatyczne [186]. Podczas procesu zapalnego mediatorami syntezy A-SAA przez hepatocyty są czynniki zarówno pochodzenia endogennego, jak i egzogenego. Głównymi endogennymi stymulatorami wytwarzania tego białka są prozapalne cytokiny, mianowicie IL-6, IL-1 i TNF- $\alpha$ , których działanie ma charakter synergistyczny, zależny od ich stężenia. Ponadto indukowana cytokinami synteza A-SAA jest dodatkowo nasilana przez glikokortykosteroidy, co może być warunkowane pobudzeniem, przez te hormony, ekspresji błonowego receptora IL-6R hepatocytów [170, 173, 186, 187]. Istotnym egzogennym czynnikiem stymulującym syntezę i wydzielanie A-SAA przez komórki wątroby jest bakteryjna endotoksyna. Interakcja LPS z receptorem TLR4 hepatocytów prowadzi do uruchomienia wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, warunkowanych aktywacją serynowo-

treoninowych kinaz białkowych MAPK (MAPK, *mitogen activated protein kinases*) i czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, co prowadzi do bezpośredniego nasilenia zarówno ekspresji mRNA dla A-SAA, jak i produkcji samego białka ostrej fazy [188].

### 1.6.3. Immunologiczne właściwości SAA

Konserwatywny charakter, a także niskie fizjologiczne stężenie oraz brak potwierdzonych przypadków osobniczych niedoborów A-SAA wskazują na istotną biologiczną rolę tego białka ostrej fazy. Surowiczy amyloid A jest czynnikiem o plejotropowej aktywności funkcjonalnej niezbędnej dla utrzymania homeostazy organizmu, co związane jest nie tylko z jego wysokim immunomodulacyjnym potencjałem, ale wynika także z zaangażowania A-SAA w procesy naprawcze tkanek. Immunomodulacyjna aktywność A-SAA warunkowana jest zarówno jego prozapalnymi, jak i przeciwzapalnymi właściwościami, wynikającymi ze zdolności pobudzania mechanizmów nasilających i hamujących procesy zapalne, obejmujących m.in. syntezę wielu cytokin i chemokin przez komórki uczestniczące w odpowiedzi odpornościowej [170, 173, 189]. Jedną z przyczyn tak złożonej funkcjonalnej aktywności A-SAA jest polimorfizm dwóch pojedynczych nukleotydów w obrębie egzonu 3 genu *SAA1*, determinujący występowanie 3 odmian allelicznych tego genu, których produktami są warianty SAA1.1, SAA1.3 i SAA1.5 surowiczego amyloidu A. Zróżnicowana sekwencja aminokwasowa tych białek przyczynia się do ich odmiennej struktury konformacyjnej, decydującej o selektywności względem rozpoznawanych receptorów, i tym samym o aktywacji zróżnicowanych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, warunkujących odmienny biologiczny efekt [190]. Zdolność do interakcji z różnymi receptorami, to kolejny czynnik odpowiedzialny za szeroką aktywność funkcjonalną A-SAA (**Ryc. 8**). Do chwili obecnej nie został opisany żaden receptor dedykowany wyłącznie do interakcji z tym białkiem ostrej fazy, natomiast potwierdzono zdolność A-SAA do wiązania z receptorami Toll-podobnymi (TLR2 i TLR4), [170, 173, 192-196], receptorami peptydów formylowanych (FPR2), [200-207], receptorami zmiatającymi klasy B (SR-B), [211-214], receptorami końcowych produktów zaawansowanej glikacji RAGE [220-222] oraz receptorem purynergicznym P2X7 [173, 228, 229].



**Ryc. 8. Synteza oraz interakcje surowiczego amyloidu A (A-SAA) ze swoistymi receptorami z uwzględnieniem funkcji tego białka ostrej fazy; IL – interleukina, TNF – czynnik martwicy nowotworu, LPS – lipopolisacharyd, G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, MQ – makrofagi, NOS – syntaza tlenku azotu, NO – tlenek azotu, Mo – monocyty, M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, HO-1 – hemoksygenaza 1, HMGB1 – niehistonowe białko 1, MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów, RANTES – chemokina syntetyzowana przez leukocyty, NLRP – białko NOD-podobne, TLR – receptor Toll-podobny, FPR – receptor peptydu formylowanego, SR – receptor zmiatający, RAGE – receptor produktów zaawansowanej glikacji, P2X7 – receptor purynergiczny. HDL – lipoproteina wysokiej gęstości**

### 1.6.3.1. Receptory Toll-podobne

Receptory TLRs stanowią grupę błonowych i cytoplazmatycznych PRRs mających fundamentalne znaczenie dla rozwoju przeciwzakaźnej odpowiedzi odpornościowej. Podlegają one ekspresji w leukocytach, m.in. komórkach dendrytycznych, makrofagach, komórkach tucznych, komórkach NK, limfocytach T i B, a także komórkach niezwiązanych z układem odpornościowym, takich jak komórki nabłonkowe, fibroblasty i keratynocyty. Do chwili obecnej, u człowieka, zidentyfikowano 11 genów kodujących TLRs, z których gen *TLR11* jest niefunkcjonalny. Spośród aktywnych funkcjonalnie ludzkich TLRs, TLR1, TLR2, TLR5 i TLR6 są receptorami zlokalizowanymi w błonie komórkowej, natomiast TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 występują wewnątrzkomórkowo w błonie endosomów. Unikatowym receptorem należącym do grupy TLRs jest TLR4, który charakteryzuje się zarówno lokalizacją błonową, jak i wewnątrzkomórkową. Zasadniczą funkcją błonowych TLRs jest rozpoznawanie powierzchniowych wzorców molekularnych mikroorganizmów, takich jak bakterie, wirusy, grzyby czy pasożyty, a wiązаныmi ligandami są lipoproteiny i lipidy. Natomiast, egzogennymi ligandami

wiązаныmi przez endosomalne TLRs są kwasy nukleinowe patogennych drobnoustrojów. Rozpoznawanie i interakcja TLRs ze specyficznymi ligandami prowadzi do aktywacji szlaków sygnałowych determinujących syntezę prozapalnych cytokin, w tym interferonów typu I. W mechanizmach tych kluczową rolę odgrywają: a) zewnątrzkomórkowa N-końcowa część receptora obejmująca domenę bogatą w leucynę, odpowiedzialną za interakcje z rozpoznawanymi cząsteczkami, a także b) zlokalizowana cytoplazmatycznie C-końcowa konserwatywna domena TIR (*Toll-interleukin 1 receptor domain*) warunkująca transdukcję sygnału z aktywowanego TLR poprzez oddziaływanie z cząsteczkami adaptorowymi MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) i TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein-inducing interferon- $\beta$* ) z towarzyszącą aktywacją kinaz białkowych oraz czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B, AP-1 (*activator protein-1*) lub IRF (*interferon-regulatory factor*), [191]. Zależna od TLRs aktywacja mechanizmów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej nie jest jednak wyłącznie wynikiem rozpoznawania PAMPs, gdyż receptory te wiążą także szereg, zaliczanych do DAMPs, cząsteczek pochodzenia endogennego, np. białka szoku termicznego (HSP, *heat shock protein*), komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej, tenascynę C i miozynę mięśnia sercowego. Źródłem tych czynników są apoptotyczne lub uszkodzone komórki i są one odpowiedzialne za dostarczanie sygnałów „ostrzegawczych” determinujących uruchomienie procesów naprawczych tkanek [192].

Podobnie do innych endogennych czynników, m.in. HSP60, HSP70, endoplazminy, hialuronianu, biglikanu, docelowymi receptorami TLRs wiążącymi A-SAA są TLR2 i TLR4, co, biorąc pod uwagę niskie fizjologicznie stężenie tego białka ostrej fazy oraz jego dynamiczny i intensywny wzrost indukowany infekcją, urazem tkanek czy procesem zapalnym, wskazuje, iż A-SAA jest funkcjonalną alarminą zaangażowaną w inicjowanie kontrolowanej odpowiedzi odpornościowej [192, 193]. Sugeruje się, iż biologiczne konsekwencje warunkowanej przez A-SAA aktywacji TLR2 i TLR4 są zależne od typu komórek, mikrośrodowiska tkankowego, etapu procesu zapalnego, a także lokalnego stężenia tego białka ostrej fazy i jego formy – wolnej lub związanej z HDL<sub>3</sub> [194]. Niewątpliwie najlepiej poznane są prozapalne właściwości A-SAA będące wynikiem interakcji tego białka zarówno z TLR2, jak i TLR4. Wiązanie A-SAA z TLR2 skutkuje aktywacją szlaków sygnałowych zależnych od cząsteczki adaptorowej MyD88 i czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, której efektem jest pobudzenie

syntezy prozapalnych cytokin – TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 przez neutrofile oraz TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, IL-18, IL-23p19 i IL-33 przez makrofagi [173, 189]. Aktywacja receptora TLR2 neutrofilów i monocytów przez A-SAA warunkuje także, odpowiednio, autokrynne i parakrynne nasilenie migracji tych komórek, co związane jest ze stymulowaniem wytwarzania CC i CXC chemokin [170]. Ponadto prozapalna aktywność funkcjonalna A-SAA będąca wynikiem interakcji z TLR2 ludzkich monocytów krwi obwodowej przejawia się pobudzeniem produkcji czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*) i wzrostem liczebności populacji neutrofilów. Wskazuje się, iż towarzysząca reakcji ostrej fazy intensywna synteza A-SAA oraz G-CSF warunkuje wystąpienie neutrofilii, która, z jednej strony, stanowi mechanizm wspomagający wrodzoną odpowiedź odpornościową w eliminacji czynników zakaźnych, natomiast, z drugiej, nagromadzenie dużej liczby aktywnych neutrofilów może skutkować uszkodzeniem sąsiadujących tkanek, co w efekcie sprzyja, a nawet nasila przebieg procesów patologicznych [195]. Jak wspomniano powyżej, aktywność funkcjonalna A-SAA jest także wynikiem jego wiązania z receptorem TLR4. Interakcja ta prowadzi do ekspresji syntazy tlenu azotu makrofagów i pobudzenia wytwarzania tlenu azotu przez te komórki [196].

Oprócz promowania mechanizmów prozapalnych, wiązanie A-SAA z receptorem TLR2 odgrywa także istotną rolę w ograniczaniu reakcji zapalnej oraz procesach odbudowy i naprawy tkanek. Przeciwwzapalny efekt interakcji A-SAA z TLR2 ludzkich monocytów krwi obwodowej jest następstwem ukierunkowanego różnicowania tych komórek do subpopulacji M2 alternatywnie aktywowanych makrofagów, charakteryzujących się ekspresją specyficznych cząsteczek powierzchniowych CD163 i CD206, syntezą przeciwzapalnych cytokin, mianowicie IL-10, TGF- $\beta$  i antagonisty receptora IL-1 (IL-1RN, *interleukin-1 receptor antagonist*), a także pobudzoną zdolnością do efferocytozy apoptotycznych neutrofilów. Zależna od A-SAA i TLR2 indukcja różnicowania monocytów do subpopulacji M2 makrofagów warunkowana jest aktywacją szlaków sygnałowych, determinowanych przez cząsteczkę adaptorową MyD88 i czynnik transkrypcyjny IRF4, które mogą inicjować mechanizmy regulatorowe odpowiedzialne za supresję, zależnej od TLRs, syntezy prozapalnych cytokin [194].

### 1.6.3.2. Receptory peptydów formylowanych

Receptory FPR należą do grupy błonowych PRRs odgrywających istotną rolę w regulacji uruchamianych mechanizmów odpornościowych, co jest wynikiem interakcji tych powierzchniowych cząsteczek nie tylko z konserwatywnymi wzorcami molekularnymi patogennych drobnoustrojów, ale także z endogennymi alarminami, uwalnianymi w wyniku uszkodzenia tkanek. Do chwili obecnej opisano trzy ludzkie receptory peptydów formylowanych, mianowicie FPR1, FPR2 i FPR3, które kodowane są, odpowiednio, przez geny *FPR1*, *FPR2* i *FPR3*, zlokalizowane na chromosomie 19. Pod względem strukturalnym FPR klasyfikowane są jako receptory sprzężone z białkami G, których cząsteczki tworzone są przez pojedynczy łańcuch polipeptydowy obejmujący: a) zewnątrzkomórkową część N-kończową, b) fragment zawierający siedem domen transbłonowych oraz c) cytoplazmatyczną część C-kończową z dołączonymi, wrażliwymi na toksynę *Bordetella pertusis*, białkami Gi, warunkującymi transdukcję sygnału z receptora do wewnątrzkomórkowych cząsteczek efektorowych [197, 198]. U człowieka ekspresja receptorów FPR jest cechą charakterystyczną zarówno komórek układu odpornościowego, mianowicie monocytów, makrofagów, neutrofilów, limfocytów T i B oraz komórek dendrytycznych, jak i komórek innych tkanek, w tym hepatocytów, fibroblastów, komórek nabłonkowych, komórek śródbłonkowych, astrocytów, a także komórek płuc, śledziony, serca, nadnerczy, jąder, macicy i tarczycy. Oprócz powszechnej komórkowej dystrybucji, innym istotnym czynnikiem decydującym o kluczowym znaczeniu receptorów FPR w utrzymywaniu homeostazy makroorganizmu jest szerokie spektrum wiązanych ligandów, obejmujących nie tylko egzogenne i endogenne peptydy formylowane, ale także egzogenne (np. osłonkowe glikoproteiny gp41 i gp120 wirusa HIV) i endogenne (np. aneksyna A1, A-SAA) peptydy nieformylowane, endogenne lipidy (np. lipoksyna A4, protektyna, resolwina) i lipopeptydy (np. pepducyny) oraz różne syntetyczne związki niepeptydowe (np. benzimidazole, pyrazolony). Wiązanie tak zróżnicowanych, pod względem struktury i natury chemicznej, ligandów przez receptory FPR równie zróżnicowanych typów komórek ma fundamentalne znaczenie na płaszczyźnie różnorodności wzbudzonej odpowiedzi komórkowej, która może mieć zarówno charakter prozapalny, jak i przeciwzapalny [197-199].

Surowiczy amyloid A jest endogennym, białkowym ligandem wiązany przez receptor FPR2. Interakcja A-SAA z FPR2 prowadzi do pobudzenia mechanizmów

prozapalnych i/lub przeciwzapalnych w zależności od typu komórek, etapu procesu zapalnego, stężenia tego białka ostrej fazy, a także jego formy – wolnej lub związanej z HDL<sub>3</sub>. Aktywność prozapalna, będąca wynikiem wiązania A-SAA przez FPR2, przejawia się wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca<sup>2+</sup> i indukowaniem ukierunkowanej migracji fagocytów i limfocytów T oraz przylegania tych ostatnich do nabłonkowych komórek [200]. W przypadku monocytów, efekt chemotaktyczny warunkowany jest bezpośrednim stymulowaniem przez A-SAA, zależnej od receptora FPR2 i stężenia tego białka ostrej fazy, syntezy chemokiny CCL2, a także nasileniem ekspresji powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych CD11c i CD11b [201, 202]. Oprócz pobudzania wydzielania chemotaktycznych cytokin rodziny CC, interakcja A-SAA z FPR2 monocytów prowadzi do indukcji wytwarzania CXC chemokin, mianowicie IL-8, a także innej prozapalnej cytokiny – TNF- $\alpha$  [203, 204]. Zależna od FPR2 prozapalna aktywność funkcjonalna A-SAA skutkuje także indukcją syntezy metaloproteinaz MMP-1 i MMP-3 oraz MMP-9 przez, odpowiednio, zapalne synowiocyty i monocyty krwi obwodowej, co sugeruje udział tego białka ostrej fazy w procesach patologicznych będących rezultatem degradacji komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej [204-206]. Ponadto efektem wiązania A-SAA z FPR2 ludzkich monocytów może być jednoczesne uruchamianie przeciwstawnych funkcjonalnie mechanizmów biologicznych, determinowanych syntezą TNF- $\alpha$  i IL-10 [207]. Modulowanie równoległej produkcji cytokin o aktywności prozapalnej i przeciwzapalnej związane jest z aktywacją odmiennych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych przebiegających z udziałem, odpowiednio, aktywowanych mitogenami kinaz białkowych ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) i p38, a kluczowym czynnikiem ukierunkowującym komórkową odpowiedź jest stężenie A-SAA. Towarzyszące początkowym etapom reakcji ostrej fazy relatywnie niskie stężenie A-SAA sprzyja bowiem rozwojowi prozapalnych mechanizmów odpornościowych, charakteryzujących się m.in. nasiloną produkcją TNF- $\alpha$ , co ma kluczowe znaczenie w ograniczaniu rozprzestrzeniania się infekcji. Natomiast, rezultatem akumulacji A-SAA w trakcie odpowiedzi zapalnej jest hamowanie procesów prozapalnych poprzez indukcję, zależnej od FPR2, syntezy IL-10, zaangażowanej w utrzymanie homeostazy układu odpornościowego. Dodatkowo, w obrębie mikrośrodowiska tkanki płuc, syntetyzowany lokalnie A-SAA pełni funkcję głównego modulatora różnicowania monocytów do subpopulacji makrofagów wykazujących cechy charakterystyczne zarówno dla typu M2, jak i M1 tych komórek. Mechanizmem



zaangażowanym w tym procesie jest zależna od A-SAA aktywacja receptora FPR2, prowadząca do powstania subpopulacji makrofagów syntetyzujących przeciwzapalne cytokiny oraz błonowe cząsteczki, IL-10 i CD163, typowe dla alternatywnie aktywowanych makrofagów M2, a także prozapalne cytokiny, G-CSF, IL-6 i IL-1 $\beta$ , właściwie dla klasycznie aktywowanych komórek typu M1. Biorąc pod uwagę, iż fenotyp makrofagów pęcherzyków płucnych odpowiada raczej subpopulacji M2, nasilona produkcja A-SAA towarzysząca przewlekłym chorobom zapalnym płuc (np. przewlekła choroba obturacyjna płuc) rozpatrywana jest jako czynnik sprzyjający destrukcyjnym zmianom i uszkodzeniu tkanek, na skutek stymulowania mechanizmów zapalnych warunkowanych aktywnością limfocytów pomocniczych Th17 [202].

### 1.6.3.3. Receptory zmiatające

Receptory zmiatające (SRs, *scavenger receptors*) stanowią rodzinę wielu błonowych białek wykazujących bardzo duże zróżnicowanie pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Oprócz, pierwotnie zidentyfikowanego, udziału tych cząsteczek w usuwaniu modyfikowanych lipoprotein, receptory SRs zaangażowane są w szeroki repertuar mechanizmów warunkowanych rozpoznawaniem zmienionych endogennych cząsteczek (lipidów, lipoprotein, białek), a także konserwatywnych wzorców molekularnych patogennych drobnoustrojów, co stanowi uzasadnioną przesłankę do ich klasyfikowania jako typu receptorów PRRs. Zasadnicza funkcjonalna aktywność SRs, związana z uczestnictwem w transporcie lipidów, wewnątrzkomórkowym transporcie cząsteczek, adhezji komórkowej, procesach prezentacji antygenów, fagocytozy i usuwania apoptotycznych komórek, a także ich wykorzystywanie przez patogenne drobnoustroje jako ligandów warunkujących patogenezę, powoduje, iż receptory te odgrywają nie tylko kluczową rolę na płaszczyźnie nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, ale są również istotne w kontekście utrzymania homeostazy makroorganizmu. Szerokie spektrum biologicznej aktywności SRs jest wynikiem tworzenia przez nie złożonych kompleksów – sygnałosomów, z innymi błonowymi receptorami, mianowicie TLR2, TLR4, TLR6, CD9, CD81,  $\beta$ 1-integryną,  $\beta$ 2-integryną, warunkujących uruchamianie zróżnicowanych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych i nasilenie odpowiedzi komórkowej na wiązane ligandy. Wskazuje się, iż tworzenie przez określony receptor zmiatający kompleksów z szerokim spektrum cząsteczek ko-receptorowych zachodzi nie tylko w odmiennych typach komórek, ale

dotyczy także komórek tego samego typu [208]. W 2017 roku zaproponowana została, przez międzynarodowe gremia naukowe, nowa klasyfikacja receptorów SRs, obejmująca 12 ich klas (od A do L), a także grupę potencjalnych receptorów zmiatających, nieprzyporządkowanych do żadnej z wyróżnionych klas [209].

#### 1.6.3.3.1. Receptory zmiatające klasy B

Charakterystyczną cechą strukturalną SRs klasy B (SR-Bs) jest obecność dwóch domen transbłonowych, odpornej na działanie proteaz, wysoko glikozylowanej domeny zewnątrzkomórkowej oraz cytoplazmatyczna lokalizacja części N- i C-końcowej łańcucha polipeptydowego, z których ta ostatnia warunkuje transdukcję sygnału z aktywowanego receptora do wewnątrzkomórkowych cząsteczek efektorowych [208, 209].

Prototypowym receptorem SR-Bs jest cząsteczka CD36 (obecnie SR-B2) podlegająca ekspresji m.in. w błonach monocytów, makrofagów, płytek krwi, komórek nabłonkowych oraz wyspecjalizowanych komórek śródbłonkowych piersi i oka. Cząsteczka ta tworzy kompleksy z innymi receptorami PRRs (TLR4, TLR6) i odgrywa ważną rolę w mechanizmach odpowiedzi odpornościowej indukowanej w przebiegu zakażeń o etiologii bakteryjnej, a także inwazji wywoływanych przez patogenne grzyby i pasożytniczego pierwotniaka *Plasmodium falciparum*. Ponadto zaangażowana jest ona w wiele aspektów biologicznej aktywności makrofagów, obejmujących, np. procesy migracji i tworzenia komórek piankowatych oraz zależnego od cytokin formowania wielojądrzastych komórek olbrzymich, stanowiących komponent zmian ziarniakowych powstających w przebiegu gruźlicy. Ligandami wiązаныmi przez receptor CD36 są długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, HDL, oksydowane fosfolipidy, białka amyloidowe, a także konserwatywne PAMPs patogennych drobnoustrojów, np. *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* [208, 209].

Oprócz cząsteczki CD36, do klasy SR-Bs należą receptory SR-BI (obecnie SR-B1), SR-BII (obecnie SR-B1.1) oraz CLA-1 [210], będący ludzkim homologiem receptora SR-BI. Dominującą funkcją tych receptorów, podobnie do CD36, jest selektywne wychwytywanie lipidów, np. estru cholesterolu, HDL i krążących lipoprotein, oraz ich transport do komórek [209]. Ponadto SR-B1 jest wykorzystywany przez wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*) oraz *Chlamydia trachomatis* jako ligand, odpowiednio, umożliwiający wnikanie do komórek docelowych oraz

pobieranie komórkowych składników odżywczych, warunkujące przeżywanie w wewnątrzkomórkowym mikrośrodku. Związek z promowaniem infekcji o etiologii wirusowej i bakteryjnej został również potwierdzony w przypadku innych SR-Bs, odpowiednio, LIMP2 i CD36. Szczególnie intrygujący jest udowodniony, istotny udział cząsteczki CD36 we wnikanii prątku gruźlicy do docelowych komórek, zwłaszcza w kontekście potwierdzonego zaangażowania tego receptora zmiatającego w eliminację patogennych drobnoustrojów [208].

Zasadnicza funkcjonalna aktywność SR-Bs na płaszczyźnie indukowanych procesów prozapalnych, ale także naprawy tkanek, związana jest także ze swoistym wiązaniem przez te cząsteczki A-SAA. Interakcja CD36 makrofagów i nabłonkowych komórek z A-SAA charakteryzująca się wysokim powinowactwem, a jej efektem jest endocytoza białka ostrej fazy oraz aktywacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, zależnych od kinaz białkowych JNK (JNK, *c-Jun N-terminal kinases*) i ERK1/2. Konsekwencją tych mechanizmów jest indukcja procesów prozapalnych przejawiających się syntezą IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ , co biorąc pod uwagę intensywną ekspresję CD36 w błonach makrofagów może mieć krytyczne znaczenie w rozwoju zmian patologicznych, takich jak miażdżyca naczyń [211]. Zarówno związany, jak i nie związany z HDL<sub>3</sub> surowiczy amyloid A wiąże się z receptorem SR-BI regulując zarówno metabolizm tego białka ostrej fazy, jak i lipidów. Przy udziale tego receptora dochodzi do internalizacji A-SAA na drodze endocytozy, co, w powiązaniu ze zdolnością tego białka ostrej fazy do wiązania cholesterolu, wskazuje na jego udział w transporcie i dostarczaniu lipidów niezbędnych w procesach warunkujących utrzymanie homeostazy makroorganizmu. Dodatkowo, oddziaływanie A-SAA z SR-BI skutkuje hamowaniem selektywnego wychwytywania HDL przez hepatocyty, co dokumentuje potencjalne istotne znaczenie tej interakcji w ograniczaniu zwrotnego transportu cholesterolu do wątroby i jego akumulowaniu w miejscach naprawy tkanek [212]. Jednakże, wiązanie A-SAA z SR-BI może być odpowiedzialne także za uszkodzenia tkanek w przebiegu chorób zapalnych stawów, gdyż prowadzi ono do pobudzenia wytwarzania metaloproteinaz MMP-2, MMP-3 i MMP-9 przez zapalne synowocyty i chondrocyty [213]. Również, odpowiedzialny za wiązanie i transport HDL, ludzki receptor CLA-1, podlegający silnej ekspresji w błonach monocytów i makrofagów, posiada zdolność selektywnej interakcji z A-SAA, która charakteryzuje się wysokim powinowactwem odpowiadającym sile wiązania lipoproteiny. Związanie

surowiczego amyloidu A z CLA-1 monocytów i nabłonkowych komórek przyczynia się do endocytozy białka ostrej fazy wraz z transferyną oraz fosforylacji kinaz białkowych ERK1/2 i p38, determinujących wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, których rezultatem jest stymulacja procesów zapalnych i związana z nimi produkcja prozapalnej IL-8 [214].

#### 1.6.3.3.2. Receptory zmiatające klasy J

W roku 2017, z inicjatywy naukowców uczestniczących w międzynarodowych warsztatach zorganizowanych przez United States National Institute of Allergy and Infectious Diseases oraz Narodowe Instytuty Zdrowia, wyodrębniona została nowa klasa J receptorów zmiatających (SR-J), której jedynymi przedstawicielami są receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), [209]. Poprzez swoją zdolność rozpoznawania i wiązania nie tylko heterogennych glikowanych białek, ale także szerokiego spektrum endogennych, nieglikowanych cząsteczek, uwalnianych w wyniku infekcji, przewlekłej reakcji zapalnej czy też stresu komórkowego, receptory RAGE klasyfikowane są jako grupa PRRs zaangażowana w interakcje z alarminami [209, 215, 216]. U człowieka gen *RAGE* zlokalizowany jest w obrębie regionu genów kodujących antygeny zgodności tkankowej klasy III, na 6 chromosomie, a nasilenie jego ekspresji determinuje akumulacja ligandów RAGEs, co może być przyczyną długotrwałego pobudzenia komórkowej odpowiedzi i rozwoju patologicznych zmian tkanek [217, 218]. Charakterystyczną cechą RAGEs jest ich występowanie w postaci zróżnicowanych izoform. Błonowe receptory RAGE należą do nadrodziny immunoglobulin, a w ich strukturze wyróżnia się zewnątrzkomórkową część N-kończową, obejmującą 3 immunoglobulinopodobne domeny V, C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub>, fragment transbłonowy oraz cytoplazmatyczną część C-kończową, warunkującą aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Ekspresja tych receptorów dotyczy wielu typów komórek, m.in. monocytów, makrofagów, limfocytów, hepatocytów, pneumocytów, komórek śródbłónka, komórek mięśni gładkich, komórek nerwowych, komórek skóry, i przebiega w sposób konstytutywny lub indukowany w zależności od etapu rozwoju makroorganizmu i typu komórek [218, 219]. Oprócz izoformy związanej z błoną komórkową, receptory RAGE występują także w postaci krążących cząsteczek, pozbawionych części transbłonowej i cytoplazmatycznej, których synteza jest wynikiem alternatywnego składania mRNA lub proteolitycznej degradacji błonowego receptora

przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej [215, 218]. Istotną funkcjonalną aktywnością receptorów RAGE jest ich zaangażowanie w stymulację prozapalnych mechanizmów odpornościowych poprzez wiązanie nieglikowanych ligandów, takich jak leukocytna,  $\beta$ 2-intergryna, Mac-1, kalgranuliny, amfoteryna czy agregaty amyloidowe. Interakcja RAGE z integryną leukocytów prowadzi do pobudzenia napływu komórek immunokompetentnych do miejsca reakcji zapalnej, co jednocześnie sprzyja rozwojowi nadmiernej komórkowej odpowiedzi, efektem której są niepożądane zmiany patologiczne. Z kolei konsekwencją wiązania kalgranulin rodziny S100, wykazujących właściwości cytokin prozapalnych, jest aktywacja limfocytów i makrofagów oraz związana z nią indukcja proliferacji limfocytów i syntezy IL-2 przez te komórki, a także wytwarzania IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  przez makrofagi [217-219].

Do nieglikowanych ligandów wiązanych przez receptory RAGE należą również amyloidogenne izoformy SAA, a także zmienione konformacyjnie monomery oraz agregaty amyloidu A. Zależna od SAA stymulacja jednojądrzastych fagocytów jest m.in. konsekwencją interakcji tego białka ostrej fazy z błonowymi receptorami RAGE, co prowadzi do uruchomienia szlaków sygnałowych warunkujących aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i nasilenie syntezy IL-6, M-CSF oraz hemoksygenazy typu I. Dlatego też, wysokie lokalne stężenie A-SAA w tkankach i towarzysząca mu intensywne ekspresja RAGEs mogą odgrywać kluczową rolę w indukcji lub utrzymywaniu zmienionych właściwości komórek i powstawaniu złogów amyloidowych. Ponieważ amyloidozie układowej towarzyszy nasiloną ekspresją RAGEs, sugeruje się, iż tkankowa akumulacja amyloidu A może być procesem warunkowanym obecnością tych receptorów, a nie pasywnym [220]. Oddziaływanie A-SAA z receptorami RAGE odgrywa również zasadniczą rolę w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów i sepsy. Wiązanie A-SAA przez zapalne synowioocyty skutkuje, zależną od aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, indukcją syntezy prozapalnych cytokin, mianowicie IL-6 i IL-8, oraz promowaniem przewlekłego stanu zapalnego w obrębie stawów [221]. Ponadto wiązanie SAA z receptorami RAGE, ale także TLR4 makrofagów, pobudza syntezę amfoteryny, czyli wysokomobilnego niehistonowego białka 1 (HMGB1, *high mobility group box 1*), którego zmiany stężenia są skorelowane z klinicznym pogorszeniem przebiegu sepsy. Obserwowany wzrost stężenia amfoteryny jest rezultatem aktywacji, związanych z RAGEs i TLR4, wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, warunkowanych fosforylacją, zależnej od RNA, kinazy białkowej R. Dodatkowo

efektem aktywacji RAGEs i TLR4 makrofagów przez SAA jest indukcja syntezy tlenku azotu oraz prozapalnych cytokin i chemokin, takich jak IL-6, IL-12, MCP-1 oraz RANTES [222].

#### 1.6.3.4. Aktywacja inflamasomu NLRP3 przez SAA

Inflamasomy są cytoplazmatycznymi, multimetrycznymi kompleksami białkowymi stanowiącymi fundamentalny element wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Konsekwencją mutacji genów kodujących komponenty inflamasomów są zróżnicowane zmiany patologiczne, co podkreśla istotną rolę tych kompleksów w utrzymaniu homeostazy makroorganizmu, a także patogenezie chorób zapalnych. Funkcjonalna aktywność inflamasomów związana jest z regulacją syntezy prozapalnych cytokin – IL-1 $\beta$  i IL-18, warunkujących indukcję ekspresji wielu genów, których produkty modulują odpowiedź komórkową i przebieg reakcji zapalnej, a także syntezę kostymulujących cytokin, np. IFN- $\gamma$ . Wytwarzanie biologicznie aktywnych IL-1 $\beta$  i IL-18 związane jest z aktywacją przez inflamasomy proteazy cysteinowej, mianowicie kaspazy 1, odpowiedzialnej za proteolityczne modyfikacje prekursorowych form tych interleukin. Ponadto efektem zależnej od inflamasomów aktywacji tego enzymu jest proteoliza gazderminy D, prowadząca do pyroptozy komórek, będącej zapalnym typem ich programowanej śmierci. Skutkiem pyroptozy jest ograniczanie dostępu wewnątrzkomórkowym patogenom do miejsc ich namnażania, i tym samym ich ekspozycja na czynniki odpowiedzi odpornościowej, a także powstawanie alarmin ukierunkowujących odpowiedź układu odpornościowego. Poprzez zdolność rozpoznawania szerokiego spektrum egzogennych PAMPs i endogennych alarmin inflamasomy klasyfikowane są jako kluczowa grupa wewnątrzkomórkowych receptorów PRRs odpowiedzialnych za inicjowanie odpowiedzi zapalnej [223-225]. Biologiczna aktywność inflamasomów jest ściśle determinowana ich budową strukturalną, obejmującą białko receptorowe, adaptorowe i prekursor kaspazy 1. W rozpoznawanie i wiązanie ligandów zaangażowane są NOD-podobne receptory NRL (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*), białko AIM2 (*absent-in-melanoma 2*), pyryna, a także białko IFI16 (*interferon-inducible protein 16*). Spośród NLRs, zdolność do tworzenia inflamasomów została udowodniona dla NLRP1, NLRP3 i NLRP4, jednakże badania doświadczalne wskazują, iż również NLRP2, NLRP6, NLRP7 i NLRP12 wykazują potencjał do formowania tych białkowych kompleksów [224, 226]. Jednym

z najbardziej poznanych inflamasomów jest NLRP3, odgrywający strategiczną rolę w odpowiedzi odpornościowej przeciwko infekcjom wywołanym przez patogenne wirusy, bakterie i grzyby. Białko receptorowe NLRP3 tego kompleksu tworzą 3 domeny – N-końcowa pyrynowa domeny PYD (*pyrin domain*), centralna domena NOD (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) i C-końcowa, bogata w leucynę, domena LRR (*leucine-rich repeat*). Wiązanie ligandu przez receptor NLRP3 prowadzi do jego oligomeryzacji i aktywacji inflamasomu, warunkowanej dalszym wiązaniem adaptorowego białka ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-activation domain CARD*) i prekursora kaspazy 1, zależnym od interakcji pomiędzy homologicznymi domenami PYD oraz CARD, odpowiednio, NLRP3 i ASC oraz ASC i prekursora kaspazy 1. Konsekwencją tych oddziaływań jest powstanie, na drodze autokatalitycznej proteolizy, aktywnej enzymatycznie kaspazy 1, warunkującej syntezę bioaktywnych IL-1 $\beta$  i IL-18 [224, 225, 227]. Kanoniczny model inflamasomu NLRP3 obejmuje dostarczenie dwóch sygnałów niezbędnych do jego aktywacji. Źródłem pierwszego z nich, o charakterze pobudzającym, jest wiązanie PAMPs drobnoustrojów lub endogennych cytokin przez, odpowiednio, błonowe receptory TLR lub TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) i IL-1R (*interleukin-1 receptor*), co prowadzi do zależnej od adaptorowych białek MyD88 i TRIF aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B i stymulacji ekspresji cząsteczki NLRP3. Natomiast, drugi aktywacyjny sygnał jest wynikiem stymulacji zróżnicowanych, wspomagających aktywację receptora NLRP3, błonowych cząsteczek na skutek ich oddziaływań z szerokim spektrum strukturalnie i chemicznie odmiennych ligandów (np. purynergicznego receptora P2X7 z zewnątrzkomórkowym ATP). Interakcje te prowadzą do molekularnych zmian komórkowych (np. syntezy reaktywnych form tlenu, uszkodzenia lizosomów, dysfunkcji mitochondriów, zmian stężeń jonów), które rozpoznawane przez białko receptorowe inflamasomu warunkują jego aktywację [224].

Surowiczy amyloid A posiada zdolność aktywowania inflamasomu NLRP3 ludzkich makrofagów oraz indukowania syntezy biologicznie aktywnej IL-1 $\beta$  przez te komórki. Indukcja ekspresji mRNA *NLRP3* makrofagów i synteza prekursora IL-1 $\beta$  jest efektem wiązania A-SAA z receptorami TLR2 i TLR4. Natomiast, prowadząca do wytwarzania biologicznie aktywnej IL-1 $\beta$ , aktywacja inflamasomu NLRP3 przez A-SAA jest konsekwencją bezpośredniej interakcji tego białka ostrej fazy z purynergicznym receptorem P2X7 i zależnej od adaptorowej cząsteczki ASC dalszej

autokatalitycznej aktywacji kaspazy 1. Dowodzi to, iż A-SAA jest endogennym prozapalnym mediatorem, indukującym w makrofagach, niezależne od wspomagających cząsteczek, wzbudzenie dwóch sygnałów niezbędnych do aktywacji inflamasomu NLRP3. Ponadto indukowana przez A-SAA synteza IL-1 $\beta$ , będąca wynikiem aktywacji inflamasomu NLRP3, jest zależna od aktywności katepsyny B, której wydzielanie warunkowane jest również stymulacją receptora P2X7. Wskazuje to, iż katepsyna B makrofagów może być czynnikiem odpowiedzialnym za proteolizę A-SAA do amyloidogennych fragmentów i związany z tym rozwój amyloidozy [228]. Podobny mechanizm aktywacji inflamasomu NLRP3 przez A-SAA, związany z wzbudzeniem dwóch fundamentalnych sygnałów, opisano w przypadku neutrofilów i komórek dendrytycznych. Efektem stymulacji ludzkich neutrofilów przez A-SAA jest indukcja ekspresji mRNA *NLRP3*, synteza prekursora IL-1 $\beta$ , a także, zależne od fosforylacji tyrozynowej kinazy Syk, aktywacja kaspazy 1 oraz wytwarzanie bioaktywnej formy IL-1 $\beta$  [229]. Natomiast, aktywacja, przez A-SAA, inflamasomu NLRP3 komórek dendrytycznych jest wynikiem wiązania tego białka ostrej fazy przez receptor TLR2 i aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zależnych od adaptorowego białka MyD88, których konsekwencją jest pobudzenie syntezy cząsteczki NLRP3 i prekursora IL-1 $\beta$ . Wydzielanie biologicznie aktywnej, dojrzałej formy IL-1 $\beta$  przez te komórki warunkowane jest funkcjonalną aktywnością adaptorowej cząsteczki ASC i kaspazy 1.

Jednakże, nie zawsze biologiczna aktywność A-SAA jest czynnikiem promującym pełną aktywację inflamasomu NLRP3. W przypadku zapalnych synowocytów, indukowanych kryształami moczanu monosodowego, A-SAA warunkuje jedynie wzbudzenie sygnału pobudzającego, związanego z nasilaniem syntezy białka NLRP3 i prekursora IL-1 $\beta$  [173].

#### **1.6.4. Interakcje A-SAA z drobnoustrojami**

Oprócz modulowania odpowiedzi odpornościowej, surowiczy amyloid A, jako białko ostrej fazy o właściwościach opsonizujących, może pełnić funkcję krążącego receptora PRR rozpoznającego konserwatywne wzorce molekularne patogennych drobnoustrojów. Wysokie stężenie A-SAA towarzyszy wielu ostrym infekcjom wirusowym, m.in. zakażeniom wirusami odry, ospy wietrznej i półpaśca, różyczki, świnki, a także cytomegalowirusem i echowirusem 30, natomiast stężenie tego białka



ostrej fazy utrzymuje się na fizjologicznym poziomie w przypadku przewlekłych infekcji wirusami zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*) i C [230]. Jednakże, jak wykazują badania, wysokie stężenie A-SAA (50-100 µg/ml), charakterystyczne dla ostrej fazy zakażenia HCV, może interferować z infekcyjnym potencjałem wirusa. Intensywna synteza A-SAA warunkuje bowiem bezpośrednio, zależne od stężenia, interakcje tego białka z osłonkowymi glikoproteinami wirionu HCV, hamując wnikanie patogenu do komórek ludzkiego wątrobiaka. Niestety, ze względu na sprzeczne wyniki badań doświadczalnych, nadal niejasny jest wpływ A-SAA na etap adhezji cząstek wirusowych [231, 232]. Ponadto udowodniono, iż obserwowane hamowanie infekcji HCV nie było wynikiem potencjalnych zmian w poziomie ekspresji błonowego receptora zmiatającego SR-BI docelowych komórek. Pomimo, iż SR-BI jest receptorem wiążącym A-SAA, a także docelowym ko-receptorem komórkowym wirusa HCV, hamowanie wnikania patogenu do komórek wątrobiaka, przez białko ostrej fazy, przebiegało bez zaangażowania SR-BI, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności wiązania wirusowej glikoproteiny E2 z tym ko-receptorem. Dodatkowo, inhibitorem przeciwwirusowej aktywności A-SAA jest HDL, jednakże biorąc pod uwagę, iż zarówno replikacja HCV, jak i synteza białka ostrej fazy zachodzą w wątrobie wysoce prawdopodobną jest ich niezaburzona, lokalna interakcja. Nie można wykluczyć, iż przeciwwirusowa aktywność A-SAA wobec HCV jest unikatowym zjawiskiem, gdyż taki efekt biologiczny, warunkowany przez to białko ostrej fazy, nie dotyczy infekcji wywoływanych przez inne wirusy (np. wirusa żółtej gorączki), których genom stanowi RNA o dodatniej polarności. Sugeruje się, iż może to być związane z ewolucyjnym przystosowaniem wirusa HCV zmierzającym do ograniczenia jego infekcyjnych właściwości w wątrobie [232].

Opsonizacyjne właściwości A-SAA przejawiają się także w jego interakcji z bakteriami. Swoiste wiązanie A-SAA jest charakterystyczne przede wszystkim dla Gram-ujemnych bakterii, mianowicie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Serratia marcescens*, a efekt ten dotyczy zarówno żywych komórek bakteryjnych, jak i lizatów komórkowych oraz występuje zarówno w warunkach fizjologicznego, jak i podwyższonego stężenia białka ostrej fazy. Opsonizacja bakterii przez A-SAA zachodzi z różnym, lecz wysokim powinowactwem, które zależne jest od gatunku drobnoustroju i, w przeciwieństwie do interakcji A-SAA z HCV, nie jest hamowana przez HDL. Docelowym ligandem *E. coli* rozpoznawanym i wiązany przez A-SAA jest, wykazujące

aktywność poriny, powierzchniowe białko membranowe OmpA (*outer membrane protein A*), które jest konserwatywnym komponentem komórek przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*. Ponadto u Gram-ujemnych bakterii innych rodzin występują homologii białka OmpA, np. białko OprF (*outer membrane porin F*) *P. aeruginosa*, które warunkują ich opsonizację przez A-SAA. Nie są znane obecnie precyzyjne funkcje białek OmpA i OprF, jednakże wskazuje się, iż są one zaangażowane w utrzymanie integralności zewnętrznej membrany komórek bakterii, a także w mechanizmy patogenności polegające na ograniczaniu aktywności litycznej komplementu oraz warunkowaniu interakcji z komórkami śródbłonna mikronaczyń mózgu, niezbędnych do przekroczenia tej bariery [233]. Już w warunkach fizjologicznego stężenia A-SAA, wiązanie białka ostrej fazy z komórkami bakterii Gram-ujemnych nasila proces fagocytozy tych drobnoustrojów przez neutrofile oraz makrofagi, co może mieć kluczowe znaczenie dla szybkiej eliminacji czynnika zakaźnego i ograniczenia infekcji. Ponadto fagocytoza opsonizowanych przez A-SAA bakterii prowadzi do stymulacji mechanizmów zapalnych komórek żernych, przejawiających się nasiloną produkcją reaktywnych form tlenu przez neutrofile oraz pobudzoną syntezą IL-10 i TNF- $\alpha$  przez makrofagi. Brak modulującego wpływu A-SAA na pochłanianie przez makrofagi nie wiążących białka ostrej fazy komórek *Streptococcus pneumoniae* wskazuje, iż obserwowane nasilenie efektorowych funkcji fagocytów w stosunku do Gram-ujemnych bakterii jest wynikiem właściwości opsonizacyjnych A-SAA, a nie zdolności tego białka do bezpośredniego aktywowania makrofagów [234].

Przeciwbakteryjny potencjał A-SAA może być także wynikiem tworzenia przez to białko kanałów jonowych w membranie komórek bakteryjnych, prowadzących do zaburzenia jonowej homeostazy. Aktywność ta warunkowana jest silnym hydrofobowym charakterem części N-końcowej A-SAA, odpowiedzialnej za interakcje z hydrofobowymi komponentami komórek bakteryjnych. Tworzenie, zależnych od A-SAA, kanałów jonowych nie jest procesem selektywnym, dotyczącym swoistych celów molekularnych obecnych w membranach bakteryjnych, lecz związane jest z amfifilową strukturą białka ostrej fazy, determinującą jego bezpośrednie interakcje z membranowymi lipidami. Indukowane przez A-SAA powstawanie kanałów jonowych prowadzi do lizy komórek bakteryjnych na skutek zaburzenia ich równowagi jonowej, wskazując efekt synergistyczny z aktywnością biologiczną defensyn i protegryn [235, 236]. Ponadto A-SAA wspomaga przeciwbakteryjną odpowiedź odpornościową pełniąc

funkcję białka wiążącego i transportującego retinol. Poprzez promowanie dojrzewania i ukierunkowywanie różnicowania, odpowiednio, komórek wrodzonej i nabytej odpowiedzi odpornościowej, a także stymulowanie odbudowy, uszkodzonej w wyniku zakażenia, bariery nabłonkowych komórek, retinol odgrywa zasadniczą rolę w modulowaniu przeciwwzakaźnych mechanizmów odpornościowych. W warunkach homeostazy za wiązanie retinolu w jelicie i jego transport do miejsca magazynowania – wątroby oraz pełniących fizjologiczne funkcje tkanek odpowiedzialne jest wyspecjalizowane białko RBP (*retinol binding protein*), którego poziom ulega znacznemu obniżeniu w następstwie zakażenia bakteryjnego. Towarzyszący infekcji niedobór białka RBP i zwiększone zapotrzebowanie komórek na retinol rekompensowane są przejmowaniem biologicznej aktywności transportera RBP przez A-SAA. Sugeruje się, iż funkcjonalna aktywność A-SAA, wynikająca ze zdolności wiązania retinolu odgrywa strategiczną rolę w rozwoju efektywnej, przeciwwzakaźnej odpowiedzi odpornościowej. Koncepcję tą potwierdzają badania z zastosowaniem modelu myszy laboratoryjnych defektywnych w zakresie syntezy A-SAA, u których infekcji *S. typhimurium* towarzyszyło zwiększenie liczby bakterii w wątrobie i śledzionie [237].

Aktywność biologiczna A-SAA nie zawsze jednak prowadzi do eliminacji etiologicznego czynnika zakażenia bakteryjnego. Poprzedzająca infekcję oportunistyczną, Gram-ujemną pałeczką *Acinetobacter baumannii* reakcja ostrej fazy sprzyja rozwojowi bakteryjnego zapalenia płuc. Promowanie zakażenia *A. baumannii* związane jest m.in. z wysokim stężeniem A-SAA i wytworzeniem stanu „paraliżu odpornościowego”, charakteryzującego się hamowaniem prozapalnych mechanizmów odpornościowych i zaburzoną eliminacją bakterii. Osłabienie efektywności odpowiedzi odpornościowej warunkowane jest ograniczeniem wytwarzania, przez makrofagi pęcherzyków płucnych, prozapalnych cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-6) i chemokin (KC, *keratinocyte-derived chemokine*, MIP-2, *macrophage inflammatory protein-2*) oraz napływu neutrofilów i syntezy metaloproteinaz. Wskazuje się, iż, będące konsekwencją niedostatecznego stężenia chemotaktycznych mediatorów lub upośledzonej odpowiedzi na antygeny *A. baumannii*, zmniejszenie liczebności populacji neutrofilów w płucach jest bezpośrednią przyczyną niedostatecznej eliminacji czynnika zakaźnego i rozwoju infekcji [238]. Podobny defekt prozapalnej odpowiedzi odpornościowej, promujący zakażenie, zanotowano także w przypadku wtórnego zapalenia płuc, o etiologii *P. aeruginosa*, u myszy laboratoryjnych z zapaleniem otrzewnej [239].

Pomimo wielu lat badań zmierzających do wyjaśnienia patogenezы gruźlicy i, datowanych na ubiegłe stulecie, pierwszych klinicznych wskazówek [240], zwracających uwagę na potencjalne zaangażowanie A-SAA w przebieg zakażenia *M. tuberculosis*, do chwili obecnej nie udało się osiągnąć satysfakcjonujących, naukowo udowodnionych, wyjaśnień na tej płaszczyźnie. Zapewne jednym z zasadniczych powodów niewątpliwie ograniczonej wiedzy w tym zakresie jest niewielka liczba badań podjętych w celu poznania tych ewentualnych zależności. Jak wspomniano powyżej, już w roku 1984 De Beer i wsp. [240] zauważyli podwyższony poziom A-SAA u pacjentów chorych na gruźlicę, przy czym najwyższe stężenia tego białka ostrej fazy były charakterystyczne dla postaci rozsianej gruźlicy oraz pierwotnej gruźlicy, której towarzyszyło rozległe uszkodzenie płuc. Ponadto, w oparciu o obserwacje, iż, z wyjątkiem osobników ze znamionnymi zmianami w obrębie płuc, skutkiem podjętej terapii przeciwprątkowej jest obniżenie surowiczego stężenia A-SAA, autorzy postulowali zaadaptowanie kontroli poziomu tego białka ostrej fazy jako przydatnego markera pozwalającego na monitorowanie skuteczności wprowadzonej strategii leczenia. Powyższe sugestie potwierdzają współczesne prace doświadczalne, które jednak nie zawsze dostarczają równoważnych odpowiedzi. Z jednej strony, wskazują one bowiem, iż zakażenie *M. tuberculosis* nie przyczynia się do zmian stężenia A-SAA w ślinie, ale białko to stanowi interesujący marker w ocenie zasadności podjętego postępowania terapeutycznego [241]. Natomiast, z drugiej, dowodzą one zasadniczo podwyższonego surowiczego stężenia A-SAA zarówno u pacjentów z gruźlicą w porównaniu do zdrowych osobników populacji, jak i u pacjentów z pozytywnym wynikiem badania bakteriologicznego w porównaniu do pacjentów z negatywnym wynikiem tego samego oznaczenia diagnostycznego. Dodatkowo, potwierdzają one również przydatność A-SAA jako jednego z trzech wartościowych białek w kontekście podejmowanych procedur diagnostyki laboratoryjnej [242].

Innym aspektem sugerującym potencjalny modulujący wpływ A-SAA nie tylko na przebieg, ale także na konsekwencje zakażenia *M. tuberculosis* jest uzasadnione powiązanie gruźlicy z rozwojem klinicznych powikłań w postaci wtórnej amyloidozy. Związana z przebiegiem gruźlicy patogenezа wtórnej amyloidozy warunkowana jest intensywną syntezą prozapalnych cytokin, w tym IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ , pobudzających wytwarzanie A-SAA w wątrobie. Z kolei przewlekłe podwyższony poziom tego białka ostrej fazy i powstawanie amyloidogennych form A-SAA są rozpatrywane jako czynniki

predysponujące w znamienym stopniu rozwój wtórnej amyloidozy nerek [243-246]. W zależności od badanej populacji, średni okres pojawiania się tego poważnego powikłania klinicznego szacowany jest na około 2-17 lat od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych, jednakże badania kazuistyczne dostarczyły dowodów na obecność wtórnej amyloidozy już nawet od 2 tygodni do 1 miesiąca po klinicznym rozpoznaniu gruźlicy [244, 246]. Częstość diagnozowania amyloidozy nerek u osób chorujących na gruźlicę waha się od 35% do 72% i dotyczy zarówno osobników z aktywną postacią choroby, jak i zakażonych latentnie oraz wyleczonych [245, 246]. Ponadto, obok podłoża związanego z etiologicznym czynnikiem zakażenia i uruchamianymi mechanizmami odpowiedzi odpornościowej, rozwój amyloidozy determinują predyspozycje genetyczne oraz czynniki środowiskowe [243].

## **ROZDZIAŁ 2**

***CEL PRACY***

## **2. CEL PRACY**

Celem pracy doktorskiej była **ocena interakcji *Mycobacterium tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A oraz określenie jej biologicznego znaczenia we wczesnych etapach zakażenia, tym patogenem, ludzkich makrofagów.**

Główny cel pracy realizowano poprzez doświadczalną weryfikację sformułowanych na wstępie hipotez badawczych.

## **ROZDZIAŁ 3**

### ***HIPOTEZY BADAWCZE***



### 3. HIPOTEZY BADAWCZE

#### **HIPOTEZA 1: *Mycobacterium tuberculosis* posiada zdolność wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A**

Sposób weryfikacji:

- a) analiza interakcji prątka gruźlicy z ludzkim, rekombinowanym A-SAA1 (hrA-SAA1)
- b) ocena swoistości wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki *M. tuberculosis*

#### **HIPOTEZA 2: Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* warunkowane jest przez ligand/ligandy stanowiące komponent/komponenty komórek tego wewnątrzkomórkowego patogenu**

Sposób weryfikacji:

- a) izolacja i identyfikacja komponentu/komponentów komórek prątka gruźlicy zaangażowanych w interakcje tego drobnoustroju z hrA-SAA1
- b) określenie powinowactwa wiązania hrA-SAA1 przez zidentyfikowane ligandy prątka gruźlicy

#### **HIPOTEZA 3: Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* moduluje przebieg wczesnych etapów infekcji ludzkich makrofagów**

Sposób weryfikacji:

- a) określenie wpływu wiązania hrA-SAA1 na procesy adhezji i wnikania prątka gruźlicy do ludzkich makrofagów
- b) ocena zaangażowania ligandu/ligandów *M. tuberculosis* wiążących hrA-SAA1 we wczesne etapy (adhezja, wnikanie) infekcji ludzkich makrofagów

#### **HIPOTEZA 4: Interakcja *M. tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A moduluje odpowiedź funkcjonalną tych bakterii**

Sposób weryfikacji:

- a) analiza odpowiedzi transkrypcyjnej prątka gruźlicy na wiązanie hrA-SAA1

# **ROZDZIAŁ 4**

## ***MATERIAŁ I METODY***

## 4. MATERIAŁ I METODY

### 4.1. MATERIAŁ

#### 4.1.1. Szczepy bakteryjne

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*Mtb*), wirulentny szczep wyjściowy
  - Szczepy mutanty *Mtb*:
    - Szczep *MtbAtpA*↑ zawierający dodatkową kopię genu *rv1308* (*atpA*) kodującego podjednostkę regulatorową - łańcuch  $\alpha$  syntazy ATP katalizującej syntezę ATP z ADP z wykorzystaniem błonowego gradientu protonów
    - szczep *MtbABC*↑ zawierający dodatkową kopię genu *rv2477c* (*abc*) kodującego wiążące ATP białko typu ABC zaangażowane w aktywny transport związków makrolidowych
  - *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155
  - Rekombinowane szczepy *E. coli* BL21 (DE3), ekspresyjnego szczepu bakteryjnego będącego lizogenem  $\lambda$ DE3, niosącego chromosomalną kopię genu polimerazy RNA faga T7 pod kontrolą promotora *lacUV*:
    - szczep *E. coli* pHIS/*atpA* nadprodukujący białko Rv1308 (AtpA) prątka gruźlicy
    - szczep *E. coli* pHIS/*abc* nadprodukujący białko Rv2477c (ABC) prątka gruźlicy
- Szczepy mutanty *M. tuberculosis* H37Rv oraz rekombinowane szczepy *E. coli* BL21 (DE3) zostały skonstruowane przez dr hab. Annę Brzostek w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

#### 4.1.2. Podłoża do hodowli bakterii

- płynne podłoże do hodowli prątków BBL, Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), wzbogacone:
  - Middlebrook OADC Enrichment (Becton Dickinson) 10 %
  - Tween80 (Sigma) 0,05 %
- stałe podłoże do hodowli prątków, BBL Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson), wzbogacone:
  - Middlebrook OADC Enrichment (Becton Dickinson) 10 %
  - glicerol (Sigma) 1 %
- płynne podłoże do hodowli *E. coli* BL21 (DE3), LB Broth (Sigma)

- stałe podłoże do hodowli *E. coli* BL21 (DE3), LB Agar (Sigma)

#### 4.1.3. Rekombinowane białka

- ludzki, rekombinowany Apo-SAA (hrA-SAA1), (Sigma) w postaci liofilizowanej, otrzymany w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Białko ostrej fazy rekonstruowano zgodnie z zaleceniami producenta do stężenia końcowego 1 µg/ml, stosując 0,1% wodny roztwór kwasu octowego
- rekombinowane białko Rv1308 (AtpA) prątka gruźlicy otrzymane w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21 (DE3), w ramach części doświadczalnej niniejszej pracy doktorskiej
- rekombinowane białko Rv2477c (ABC) prątka gruźlicy otrzymane w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21 (DE3), w ramach części doświadczalnej niniejszej pracy doktorskiej

#### 4.1.4. Preparaty krwiopochodne

Komercyjnie dostępny kożuszek leukocyarno-płytkowy o objętości około 60 ml (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi). Doświadczenia z wykorzystaniem kożuszków leukocyarno-płytkowych nie wymagają zgody Komisji Etycznej, gdyż w rozumieniu obowiązującego prawa komórki krwi są anonimowe i badania prowadzone na takim materiale nie są uznawane za eksperyment medyczny (ustawa z dnia 22 sierpnia 1997r.).

#### 4.1.5. Odczynniki i podłoża do hodowli komórkowych

- ludzka surowica otrzymana z pełnej krwi grupy AB osobników płci męskiej (HS), (Sigma)
- surowica płodów cielęcych (FBS), (Sigma)
- penicylina/streptomycyna (P/S), odpowiednio, 10 000 U/ml / 10 mg/ml (Sigma)
- 2-merkaptoetanol (Sigma)
- rekombinowany, ludzki czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), (Gibco)
- podłoże hodowlane Iscove's zawierające 4 mM stabilizowanej L-glutaminy i 25 mM HEPES (IMDM), (Biowest) z dodatkiem:

- 10% FBS, P (100 U/ml) /S (100 µg/ml) oraz 0,05 mM 2-merkaptioetanolu (**podłoże A**) – izolacja monocytów krwi obwodowej z zastosowaniem gradientu stężeń perkolu
- 10% HS, P (100 U/ml) /S (100 µg/ml), 0,05 mM 2-merkaptioetanolu oraz 10 ng/ml M-CSF (**podłoże B**) – różnicowanie monocytów krwi obwodowej do dojrzałych makrofagów
- 0,1% BSA oraz 3 mM CaCl<sub>2</sub> (**podłoże C**) – wiązanie ludzkiego SAA przez prątki gruźlicy
- 0,2% BSA oraz 0,05 mM 2-merkaptioetanolu (**podłoże D**) – fagocytoza prątków gruźlicy
- 10% HS oraz 0,05 mM 2-merkaptioetanolu (**podłoże E**) – wewnątrzkomórkowy wzrost prątków gruźlicy
- 0,5% HS, P (100 U/ml) /S (100 µg/ml) oraz 0,05 mM 2-merkaptioetanolu (**podłoże F**) – płukanie hodowli makrofagów
- 0,5% HS oraz 0,05 mM 2-merkaptioetanolu (**podłoże G**) - płukanie hodowli makrofagów przed i po fagocytozie

#### 4.1.6. Odczynniki i bufony do izolacji monocytów krwi obwodowej

- 0,5M wodny roztwór kwasu etylenodiaminotetraoctowego (UltraPure™ 0,5M EDTA), pH 8,0 (EDTA), (Invitrogen)
- Histopaque®-1077 (Sigma)
- Percoll® PLUS (Sigma)
- buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, 10xkoncentrat, pH 7,2 (10xPBS), (Sigma)
- izoosmotyczny perkol
  - Percoll® PLUS (Sigma) 9,25 ml
  - 10xPBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> 0,75 ml
- 46% izoosmotyczny perkol
  - izoosmotyczny perkol 46 ml
  - podłoże A (4.1.2) 54 ml
- 0,4% roztwór błękitu trypanuu w wodnym roztworze 0,81% chlorku sodu i 0,06% wodorofosforanu potasu (Trypan Blue Dye, 0,4% solution), (BIO-RAD)
- buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, pH 7,2 (PBS), (Biowest)

- buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,2 (PBS), (Biowest) z dodatkiem 2 mM EDTA (PBS/EDTA)

#### 4.1.7. Antybiotyki

- ampicylina (Sigma)
- gentamycyna, roztwór wodny o stężeniu 50 mg/ml (Sigma)
- tetracyklina HCl (BioShop)

#### 4.1.8. Surowice odpornościowe

- królicza surowica odpornościowa swoista dla białka Rv1308 (AtpA) prątka gruźlicy, przygotowana w ramach części doświadczalnej niniejszej pracy doktorskiej
- królicza surowica odpornościowa swoista dla białka Rv1308 (AtpA) prątka gruźlicy, przygotowana w ramach części doświadczalnej niniejszej pracy doktorskiej

Surowice otrzymano poprzez immunizację królików rasy Białej Nowozelandzkiej rekombinowanymi białkami prątka gruźlicy. Zastosowane procedury doświadczalne z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach nr 9 w Łodzi (zgoda nr 62/ŁB728/2014).

#### 4.1.9. Odczynniki i bufony do pośredniego testu immunoenzymatycznego ELISA

- **buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej, pH 7,2 (10x koncentrat), (10xPBS)**
  - chlorek sodu, NaCl (Sigma) 80 g
  - chlorek potasu, KCl (Sigma) 2 g
  - wodorofosforan sodu,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma) 11,5 g
  - diwodorofosforan potasu,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma) 2 g
  - woda dejonizowana do 1 000 ml
- **buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej, pH 7,2 (1xPBS)**
  - 10xPBS 100 ml
  - woda dejonizowana 900 ml
- **bufor węglanowy 0,1M, pH 9,6**
  - węglan sodu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck) 1,65 g

- wodorowęglan sodu, NaHCO<sub>3</sub>, (Sigma) 2,9 g
  - woda dejonizowana do 1 000 ml
- Wartość pH buforu ustalono stosując 10N wodny roztwór wodorotlenku sodu (NaOH), (Sigma).
- **bufor płuczący**
    - 1xPBS, pH 7,2
    - Tween20 (Sigma) 0,05 %
  - **bufor blokujący**
    - 1xPBS, pH 7,2
    - FBS (Biowest) 10 %
  - **bufor fosforanowo-cytrynianowy 0,04M, pH 4,5**
    - kwas cytrynowy, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O (Sigma) 8,4 g
    - wodorofosforan disodowy, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma) 10,7 g
    - woda dejonizowana do 1 000 ml
  - **roztwór substratu i chromogenu**
    - roztwór soli amonowej kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS), (Sigma) o stężeniu 1 mg/ml w buforze fosforanowo-cytrynianowym z dodatkiem 0,25 µl/ml 30% nadtlenku wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (Fluka)

#### 4.1.10. Zestawy, odczynniki i bufora do immunoenzymatycznego testu „cellular” ELISA (cELISA)

- **bufor płuczący (4.1.9.)**
- **bufor blokujący**
  - 1xPBS, pH 7,2 100 ml
  - BSA, albumina surowicy bydlęcej (Sigma) 3 g
- **bufor fosforanowo-cytrynianowy 0,04M, pH 4,5 (4.1.9.)**
- **przeciwciała**
  - poliklonalne, królicze przeciwciała klasy IgG swoiste dla ludzkiego SAA1 (Sigma)
  - poliklonalne, kozie przeciwciała klasy IgG swoiste dla króliczych immunoglobulin klasy IgG, znakowane peroksydazą chrzanową (Jackson Immuno Research)
- **streptawidyna znakowana peroksydazą chrzanową (Sigma)**
- **roztwór substratu i chromogenu (4.1.9.)**

#### 4.1.10.1. Zestaw do biotynylacji białek (EZ-Link<sup>®</sup> Micro Sulfo-NHS-Biotinylation Kit, Thermo Scientific)

- Skład zestawu:
  - biotyna – No-Weigh<sup>™</sup> Sulfo-NHS-Biotin
  - buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej – BupH<sup>™</sup> Phosphate Buffered Saline Pack (PBS), pH 7,2
  - kolumny do izolacji białek biotynylowanych – Zeba<sup>™</sup> Spin Desalting Column

#### 4.1.11. Bufory i materiały do izolacji surowego preparatu antygenowego z komórek prątka gruźlicy

- **bufor PEN, pH 6,5 (3xkoncentrat) (wg. Heinz i wsp., 2003, [247])**
  - wodorofosforan sodu, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma) 300 mM
  - diwodorofosforan sodu, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (Sigma) 200 mM
  - chlorek sodu, NaCl (Sigma) 450 mM
  - kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA (Sigma) 0,3 mM
  - woda dejonizowana
- **bufor PEN, pH 6,5 (1xPEN)**
  - 3xPEN 100 ml
  - woda dejonizowana 200 ml
- kulki krzemionkowe o średnicy 1,0 mm – Lysing Matrix B (MP Biomedicals)
- eter monooktylowy glikolu polietylenowego, OPOE (Sigma)

#### 4.1.12. Bufory i odczynniki do jednokierunkowego rozdzielania elektroforetycznego (SDS-PAGE)

- **bufor do rozdzielania elektroforetycznego, pH 8,3 (10x koncentrat)**
  - Tris base (Sigma) 30 g
  - glicyna (Sigma) 144 g
  - siarczan dodecyłu sodu, SDS (Sigma) 10 g
  - woda dejonizowana do 1 000 ml
- **bufor do rozdzielania elektroforetycznego, pH 8,3 (1x)**
  - bufor do rozdzielania elektroforetycznego, pH 8,3 (10x koncentrat) 80 ml
  - woda dejonizowana 320 ml



- **0,5M Tris-HCL, pH 6,8**

- Tris base (Sigma) 6 g
- woda dejonizowana 100 ml

Wartość pH buforu ustalono stosując 6N roztwór kwasu solnego (HCl), (Sigma)

- **1,5M Tris-HCL, pH 8,8**

- Tris base (Sigma) 18,2 g
- woda dejonizowana 100 ml

Wartość pH buforu ustalono stosując 6N roztwór kwasu solnego (HCl), (Sigma)

- **0,5% błękit bromofenolowy**

- sól sodowa błękitu bromofenolowego (Sigma) 50 mg
- woda dejonizowana 10 ml

- **10% roztwór nadsiarazan amonu (APS)**

- nadsiarazan amonu,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Sigma) 100 mg
- woda dejonizowana 1 ml

- **bufor próbkowy (5xkoncentrat)**

- 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 1 ml
- glicerol (Sigma) 0,8 ml
- 10% wodny roztwór SDS (Sigma) 1,6 ml
- 2-merkaptoetanol 0,4 ml
- 0,5% błękit bromofenolowy 0,4 ml
- woda dejonizowana 3,8 ml

- **12% poliakrylamidowy żel**

**żel wyrównujący**

- 30% akrylamid, bis-solution (Sigma) 1 ml
- 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 2,5 ml
- 10% wodny roztwór SDS (Sigma) 1 ml
- woda dejonizowana 7,5 ml
- N'-tetrametyloetylenodiamina, TEMED (Merck) 12  $\mu\text{l}$
- 10% APS 120  $\mu\text{l}$

**żel rozdzielający**

- 30% akrylamid, bis-solution (Sigma) 8 ml
- 1,5M Tris-HCl, pH=8,8 5 ml
- 10% wodny roztwór SDS (Sigma) 0,2 ml

- woda dejonizowana 6 ml
- N<sup>3</sup>-tetrametyloetylenodiamina, TEMED (Merc) 20  $\mu$ l
- 10% APS 180  $\mu$ l
- wzorzec masy relatywnej białek - PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

#### 4.1.13. Odczynniki i bufor do dwukierunkowego rozdziału elektroforetycznego (2D SDS-PAGE)

- bufor do rehydratacji białek – Bufor RedyPrep 2-D Starter Kit Rehydration/SampleBuffer (BIO-RAD)
- paski poliakrylamidowe do ogniskowania izoelektrycznego – ReadyStrip™ IPG Strips (BIO-RAD)
- komercyjny, gradientowy (4-12%) oraz niegradientowy (12%) poliakrylamidowy żel – Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (BIO-RAD)
- wzorzec masy relatywnej białek – Precision Plus Protein™ Standard (BIO-RAD)

- **0,5M Tris-HCL, pH 8,5**

- Tris base (Sigma) 6 g
- woda dejonizowana 100 ml

Wartość pH buforu ustalono stosując 6N roztwór kwasu solnego (HCl), (Sigma)

- **bufor do ogniskowania izoelektrycznego**

- mocznik (Sigma) 480,5 g
- tiomocznik (Sigma) 152,3 g
- CHAPS (Sigma) 4 %
- ditiotretitol, DTT (Sigma) 1 %
- bufor równoważący – IPG Buffer (Amersham Pharmacia Biotech) 0,2 %
- Triton X-100 (Sigma) 0,5 %
- woda dejonizowana do 20 ml

- **bufor równoważący**

- 0,5 M Tris-HCl, pH=8,5 10 ml
- 10% wodny roztwór SDS (Sigma) 20 ml
- glicerol (Sigma) 30 ml
- mocznik (Sigma) 96,1 g

- woda dejonizowana do 100 ml
- z dodatkiem 200 mg DTT (Sigma) lub 480 mg jodoacetamidu (Sigma) na 10 ml buforu

#### 4.1.14. Bufory i materiały do techniki Western blot i Dot blot

- **bufor do transferu białek na membrany nitrocelulozowe (5xkoncentrat)**

- Tris base (Sigma) 30,3 g
- glicyna (Sigma) 144 g
- siarczan dodecyłu sodu, SDS (Sigma) 10 g
- woda dejonizowana do 1 000 ml

- **bufor do transferu białek na membrany nitrocelulozowe (1x)**

- bufor do transferu białek na membrany nitrocelulozowe (5xkoncentrat) 600 ml
- metanol (Sigma) 200 ml
- woda dejonizowana 200 ml

- bufor blokujący – Western Blocker™ Solution (Sigma)

- bufor płuczący (4.1.9)

- membrana nitrocelulozowa PROTRAN® do elektrotransferu białek (Whatman®)

- bibuły celulozowe, 7 cm x 8,4 cm (Thermo Scientific)

- **przeciwciała**

- monoklonalne, mysie przeciwciała izotypu IgG1 swoiste dla motywu polihistydynowego (6His-Tag), stanowiącego znacznik rekombinowanych białek (Novagen)
- poliklonalne, kozie przeciwciała klasy IgG swoiste dla immunoglobulin myszy, znakowane peroksydazą chrzanową (Jackson Immuno Research)
- poliklonalne, kozie przeciwciała klasy IgG swoiste dla immunoglobulin króliczych, znakowane peroksydazą chrzanową (Jackson Immuno Research)

- streptawidyna znakowana peroksydazą chrzanową (Sigma)

- **odczynnik do wywołania reakcji barwnej**

- 4-chloro-1-naftol (Sigma) 50 mg
- metanol (Sigma) 10 ml
- 30% nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (Fluka) 25 µl
- 1xPBS 40 ml

#### 4.1.15. Odczynniki do izolacji RNA prątka gruźlicy

- bufor do izolacji RNA – TRIzol™ Reagent (Invitrogen)

- kulki krzemionkowe o średnicy 1,0 mm – Lysing Matrix B, (MP Biomedicals)
- chloroform (Sigma)
- izopropanol (Sigma)
- etanol (Sigma)
- woda wolna od nukleaz – UltraPure™ DEPC-Treated Water (Invitrogen)
- 70% wodny roztwór etanolu
  - etanol (Sigma) 70 ml
  - woda wolna od nukleaz (4.1.15) 30 ml
- **80% wodny roztwór etanolu**
  - etanol (Sigma) 80 ml
  - woda wolna od nukleaz (4.1.15) 20 ml
- **3M octan potasu, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K (Sigma)**
  - octan potasu, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K (Sigma) 2.9 g
  - woda wolna od nukleaz (4.1.15) do 10ml

Wartość pH roztworu ustalono stosując lodowaty kwas octowy, CH<sub>3</sub>COOH, (Sigma)
- glikogen – GlycoBlue™ Coprecipitant (Invitrogen)
- inhibitor RNaz – RNasin® plus (Promega)
- zestaw do analizy jakościowej RNA – RNA 6000 Nano (Agilent)
- enzym deoksyrybonukleaza I, DNaza I, TURBO™ DNase (Invitrogen)
- odczynnik do oczyszczania RNA – AMPure XP (Beckman)
- zestaw do usuwania rybosomalnego RNA – Ribo-Zero® rRNA Removal Kit (Illumina)
- zestaw do uzyskiwania bibliotek RNAseq – KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (Roche)
- zestaw do analizy ilościowej i jakościowej bibliotek RNAseq – DNA 1000 (Agilent)

#### 4.1.16. Bufor do izolacji proteomu prątków gruźlicy

- **1M Tris-HCl, pH 7,5**
  - Tris base (Sigma) 12,1 g
  - woda dejonizowana 100 ml

Wartość pH buforu ustalono stosując 6N roztwór kwasu solnego (HCl), (Sigma)
- bufor do izolacji proteomu:
  - kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA (Sigma) 1 mM
  - fluorek fenylometylosulfonylu, PMSF (Sigma) 1 mM

- |  |       |
|--|-------|
| - DTT (Sigma)  | 2 mM  |
| - mocznik (Sigma)  | 8M    |
| - 1M Tris-HCl, pH 7,5                                      | 0,05M |
| - TritonX-100 (Sigma)                                      | 1 %   |
| - Igepal <sup>®</sup> CA-630 (Sigma)                       | 1 %   |
| - inhibitory proteaz – Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) |       |

#### 4.1.17. Zestawy, odczynniki i bufory do chromatografii powinowactwa

##### 4.1.17.1. Zestaw do chromatografii powinowactwa (MicroLink<sup>™</sup> Protein Coupling Kit, Thermo Scientific)

- Skład zestawu:
  - kolumny ze złożem agarozowym – AminoLink<sup>®</sup> Plus Coupling Resin Spin Columns
  - bufor opłaszczający – Coupling Buffer: BupH<sup>™</sup> Phosphate Buffered Saline Pack (PBS), pH 7,2
  - bufor blokujący – Quenching Buffer: 1M Tris-HCl, 0,05% azydku sodu (NaN<sub>3</sub>), pH 7,4
  - roztwór 5M cyjanoborowodoru sodu (NaBH<sub>3</sub>CN) w 0,01M roztworze wodorotlenku sodu (NaOH)
  - bufor płuczący – Wash solution: 1M chlorku sodu (NaCl), 0,05% azydku sodu (NaN<sub>3</sub>)
  - bufor do elucji zawierający aminy pierwszorzędowe – Elution Buffer, pH 2,8
  - probówki – Microcentrifuge Collection Tubes

##### 4.1.17.2. Kolumny kobaltowe do chromatografii powinowactwa (HisPur<sup>™</sup> Cobalt Spin Columns)

- Bufory:
  - bufor do równoważenia/płukania – Equilibration/Wash Buffer: 50 mM fosforanu sodu (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 300 mM chlorku sodu (NaCl), 10 mM imidazolu, 6M mocznik, pH 7,4
  - bufor do elucji – Elution Buffer: 50 mM fosforanu sodu (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 300 mM chlorku sodu (NaCl), 150 mM imidazolu, 6M mocznika, pH 7,4

##### 4.1.17.3. Zestaw do izolacji białek rekombinowanych (His·Bind<sup>®</sup> Purification Kit, Novagen)

- Skład zestawu:
  - złoża agarozowe – His·Bind® Resin
  - kolumny do chromatografii – Chromatography columns
  - bufor wiążący – Binding Buffer, 8xkoncentrat: 4M chlorku sodu (NaCl), 160 mM Tris-HCl, 40 mM imidazolu, pH 7,9
  - bufor płuczający – Wash Buffer, 8xkoncentrat: 4M chlorku sodu (NaCl), 480 mM imidazolu, 160 mM Tris-HCl, pH 7,9
  - bufor do elucji – Elute Buffer, 4xkoncentrat: 4M imidazolu, 2M chlorku sodu (NaCl), 80 mM Tris-HCl, pH 7,9
  - bufor do oczyszczania i konserwacji złoża – Strip Buffer, 4xkoncentrat: 2M chlorku sodu (NaCl), 400 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), 80 mM Tris-HCl, pH 7,9
  - bufor do opłaszczania i równoważenia złoża – Charge Buffer, 8xkoncentrat: 400 mM siarczanu niklu (NiSO<sub>4</sub>)
- **1M Tris-HCl, pH 9,0**
  - Tris base (Sigma) 12,1g
  - woda dejonizowana do 100 ml

Wartość pH buforu ustalono stosując 6 N roztwór kwasu solnego (HCl), (Sigma)
- kolumny do odsalania i zmiany buforu w próbach – PD-10 Columns-CGE (GE Healthcare)
- bufor do równoważenia kolumn PD-10 Columns-CGE – Labmate PD-10 Buffer Reservoir (GE Healthcare)
- ultrafiltry do zagęszczania prób – Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore)

#### 4.1.18. Inne bufony i odczynniki

- **Tris-NaCl, pH 7,5**
  - Tris base (Sigma) 0,6g
  - chlorek sodu, NaCl (Sigma) 0,87g
  - woda dejonizowana do 100 ml

Wartość pH buforu ustalono stosując 6 N roztwór kwasu solnego (HCl), (Sigma)
- izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd, IPTG (Sigma)
- chlorek wapnia, CaCl<sub>2</sub>, (Sigma)
- odczynnik do procedury oczyszczania rekombinowanych białek – BugBuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen)

- odczynnik Bradford – Bradford Reagent (Sigma)
- barwnik elektroforetycznie rozdzielonych białek – Imperial™ Protein Stain (Pierce)
- barwnik Giemzy (Sigma)
- aceton (Sigma)
- formaldehyd (Sigma)
- lizozym (Sigma)
- benzonaza – Benzonase® Nuclease (Milipore)
- bufor do powierzchniowego rezonansu plazmonowego – Bufor HBS-EP (GE Healthcare)
- woda dedykowana do hodowli komórkowych – Cell Culture Water (Biowest)
- buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,2 (PBS), (Biowest)

## 4.2. METODY

### 4.2.1. Hodowla szczepów bakteryjnych

#### 4.2.1.1. Hodowla prątków *Mycobacterium*

Szczep wyjściowy *M. tuberculosis* H37Rv, szczepy mutanty *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ oraz szczep *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 hodowano w płynnym podłożu Middlebrook'a 7H9, wzbogaconym o 10% OADC oraz 0,05% Tween80 (4.1.2), w temperaturze 37°C. Hodowlę mykobakterii prowadzono do momentu uzyskania przez zawiesiny bakteryjne gęstości optycznej odpowiadającej wartości absorbancji równej 1 mierzonej przy długości fali 600 nm ( $OD_{600}=1,0$ ). Przeprowadzone wstępne doświadczenia pozwoliły ustalić, iż gęstość komórek bakteryjnych w zawiesinie hodowli prątków charakteryzujących się taką wartością absorbancji wynosi  $1 \times 10^8$  komórek/ml.

Szczepy mutanty *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ hodowano w obecności tetracykliny, o końcowym stężeniu 0,005%, w celu indukcji nadprodukcji w komórkach prątków gruźlicy białek AtpA i ABC pełniących funkcję ligandów dla ludzkiego SAA. Antybiotyk dodawano do podłoża hodowlanego 24 godziny przed zaplanowanym eksperymentem.

#### 4.2.1.2. Hodowla *Esherichia coli*

Hodowlę rekombinowanych szczepów *E.coli* pHIS/*atpA* i *E.coli* pHIS/*abc* prowadzono w temperaturze 37°C z intensywnym wytrząsaniem w płynnym podłożu LB (4.1.2), zawierającym, jako selekcyjny antybiotyk, ampicylinę w stężeniu końcowym 100 µg/ml, w kolbach na wytrząsarce. Nadprodukcję rekombinowanych białek rAtpA i rABC prętka gruźlicy prowadzono w takich samych warunkach przez okres 3 godzin stosując podłoże z dodatkiem 0,5 mM IPTG jako induktora.

### 4.2.2. Wiązanie hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków

W celu określenia zdolności wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* prątki hodowano w płynnym podłożu Middlebrook'a 7H9 (4.1.2) do uzyskania przez zawiesiny bakteryjne gęstości optycznej  $OD_{600}=0,8-1,0$ , a następnie pobierano objętości zawiesin odpowiadające  $2 \times 10^8$  komórek prątków. Zawiesiny wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut. Otrzymane osady zawieszono w podłożu C (4.1.5), zawierającym hrA-SAA1 o stężeniu końcowym 1 µg/ml oraz 5 µg/ml. Kontrole negatywne stanowiły prątki zawieszono



w podłożu C (4.1.5) bez dodatku badanego białka ostrej fazy. Komórki badane i kontrolne prątków inkubowano w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C, przez okres 90 minut. W kolejnym etapie bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 16 000xg, w czasie 15 minut, a następnie płukano trzykrotnie podłożem Middlebrook'a 7H9 wirując w tych samych warunkach. Otrzymane jako osady komórki prątków zawieszano w 500 µl 0,5% roztworu formaldehydu w PBS zawierającym jony Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (4.1.18) z dodatkiem 5mM CaCl<sub>2</sub> i наносono do studzienek płytki hodowlanej 96-studzienkowej, w objętości 120 µl odpowiadającej 4,8x10<sup>7</sup> komórkom bakteryjnym. Tak przygotowane próby badane i kontrole suszono w temperaturze 37°C, przez okres 18-20 godzin, w celu utrwalenia komórek prątków.

Związany przez żywe komórki prątków hrA-SAA1 wykrywano stosując technikę cELISA. Utrwalone w studzienkach komórki tych bakterii płukano czterokrotnie buforem płuczającym (4.1.9), a następnie blokowano wolne miejsca na nośniku polistyrenowym stosując 280 µl buforu blokującego (4.1.10) w temperaturze 4°C, w czasie 18 godzin. Po inkubacji studzienki płukano sześciokrotnie buforem płuczającym (4.1.9) oraz наносono do nich poliklonalne, królicze przeciwciała klasy IgG swoiste dla hrA-SAA1 (100 µl) rozcieńczone 1:500 w buforze płuczającym (4.1.9). Po całonocnej inkubacji studzienki płukano sześciokrotnie buforem płuczającym (4.1.9). Powstałe kompleksy immunologiczne hrA-SAA1-przeciwciało identyfikowano przy użyciu poliklonalnych, kozich przeciwciał klasy IgG swoistych dla króliczych immunoglobulin klasy IgG, znakowanych peroksydazą chrzanową (100 µl), rozcieńczonych 1:2 000 w buforze płuczającym, oraz roztworu substratu i chromogenu (4.1.10) dodawanego w objętości 100 µl do każdej studzienki. Reakcję barwną wywoływano w temperaturze pokojowej, w ciemności, w czasie 20 minut. Wartości OD prób badanych i kontrolnych mierzono przy długości fali λ=405 nm stosując czytnik płytek Multiscan EX (Thermo Scientific).

Optymalne rozcieńczenia stosowanych w teście immunoglobulin ustalono we wstępnych doświadczeniach miareczkowania przeciwciał.

### 4.2.3. Swoistość wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków

#### 4.2.3.1. Znakowanie ludzkiego hrA-SAA1 biotyną

Ludzki rA-SAA1 znakowano biotyną przy użyciu komercyjnego zestawu EZ-Link<sup>®</sup> Micro Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Thermo Scientific), (4.1.10.1) zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta.

Rekombinowany surowiczy amyloid A o stężeniu 250 µg/ml znakowano stosując 50-krotny cząsteczkowy nadmiar 11 mM roztworu biotyny w PBS (4.1.17.1) na łaźni lodowej w czasie 2 godzin. Dołączone do zestawu złoże odsalające (Zeba<sup>™</sup> Desalt Spin Column, Thermo Scientific) równoważono poprzez trzykrotne płukanie buforem PBS (4.1.17.1). W celu usunięcia niezwiązanego z białkiem nadmiaru biotyny, próbę zawierającą znakowany hrA-SAA1 nanoszono na powierzchnię złoża, a następnie po jej całkowitym wnikięciu w głąb wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 1 000xg, w czasie 2 minut. Otrzymaną frakcję bt-hrA-SAA1 porcjonowano i przechowywano w temperaturze -20°C.

Stopień wyznakowania biotyną ludzkiego hrA-SAA1 oceniano stosując technikę Dot blot. Na nitrocelulozową membranę nanoszono 1 µg znakowanego biotyną hrA-SAA1 oraz PBS jako kontrolę negatywną (4.1.17.1). Membranę suszono w temperaturze pokojowej, w czasie 30 minut, a następnie wolne miejsca na nitrocelulozowym nośniku blokowano przy użyciu komercyjnego buforu blokującego Western Blocker<sup>™</sup> Solution (Sigma) w temperaturze 37°C, w czasie 90 minut. W kolejnym etapie membranę z naniesionym biotynylowanym białkiem ostrej fazy płukano trzykrotnie w buforze płuczającym (4.1.9), w czasie 5 minut. Obecność bt-hrA-SAA1 wykrywano przy użyciu streptawidyny znakowanej peroksydazą chrzanową, rozcieńczonej 1:1 000 w buforze płuczającym (4.1.9), według rekomendacji producenta, w temperaturze pokojowej, w czasie 1 godziny. Reakcję barwną wywoływano z zastosowaniem roztworu 4-chloro-1-naftolu jako chromogenu (4.1.14).

#### 4.2.3.2. Test kompetycji

Ocenę specyficzności wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* przeprowadzono stosując test kompetycji polegający na hamowaniu wiązania białka znakowanego w obecności nadmiaru nieznakowanego homologicznego białka. W tym celu z hodowli prątków o gęstości optycznej

OD<sub>600</sub>=0,8-1,0 pobrano objętości zawiesin bakteryjnych odpowiadające  $2 \times 10^8$  komórek prątków. Bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut. Osady mykobakterii zawieszano w podłożu C (4.1.5) zawierającym 5 µg/ml znakowanego biotyną hrA-SAA1 (bt-hrA-SAA1), a następnie do odpowiednich prób dodawano jednokrotny (5 µg/ml) lub trzykrotny (15 µg/ml) nadmiar nieznakowanego homologicznego białka ostrej fazy. Kontrolę testu stanowiły bakterie inkubowane w podłożu C (4.1.5) zawierającym stężenie 5µg/ml bt-hrA-SAA1. Próby badane i kontrolne inkubowano w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C, przez okres 2 godzin. Po inkubacji prątki wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 16 000xg, w czasie 15 minut, a następnie płukano trzykrotnie podłożem Middlebrook'a 7H9 wirując w tych samych warunkach. Otrzymane jako osady komórki prątków zawieszano w 500 µl 0,5% roztworu formaldehydu w PBS zawierającym jony Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (4.1.18) z dodatkiem 5 mM CaCl<sub>2</sub> i наносzono do studzienek płytki hodowlanej 96-studzienkowej, w objętości 150 µl, odpowiadającej  $6 \times 10^7$  komórkom bakteryjnym. Tak przygotowane próby badane i kontrole suszono w temperaturze 37°C, w czasie 18-20 godzin, w celu utrwalenia komórek prątków.

Zahamowanie wiązania bt-hrA-SAA1 przez komórki prątków w obecności nadmiaru nieznakowanego homologicznego białka oceniono stosując technikę cELISA według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.2. Do utrwalonych komórek bakterii dodawano streptawidynę znakowaną peroksydazą chrzanową (200 µl) rozcieńczoną 1:200 w buforze płuczającym (4.1.9), według rekomendacji producenta. Reakcję barwną wywoływano poprzez dodanie do każdej studzienki 100 µl roztworu substratu i chromogenu (4.1.10) oraz inkubację w temperaturze pokojowej, w ciemności, w czasie 20 minut. Wartości OD prób badanych i kontrolnych mierzono przy długości fali  $\lambda=405$  nm stosując czytnik Multiscan EX (Thermo Scientific).

#### **4.2.4. Izolacja i identyfikacja ligandów *M. tuberculosis* wiążących hrA-SAA1**

##### **4.2.4.1. Otrzymywanie surowego preparatu antygenowego**

Surowy preparat antygenowy, zawierający pełną pulę białek membranowych *M. tuberculosis*, otrzymano zgodnie z procedurą opisaną przez Heinz i wsp., 2003 [247]. Izolację białek przeprowadzano z komórek otrzymanych ze 100 ml hodowli prątka gruźlicy o gęstości optycznej OD<sub>600</sub>=0,8-1,0. Zawiesiny bakteryjne wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut. Otrzymany osad

komórek bakterii zawieszano w buforze 1xPEN (4.1.11), a następnie dodawano kulki krzemionkowe o średnicy 0,1 mm w proporcji 1 objętość kulek na 3 objętości zawiesiny bakteryjnej. Komórki prątków dezintegrowano w homogenizatorze komórkowym FastPrep-24 (MP Biomedicals) stosując trzy 20-sekundowe cykle, przy prędkości 6 M/s przedzielone 3-minutowymi etapami chłodzenia na łaźni lodowej. W kolejnym etapie zawiesiny bakteryjne inkubowano z dodatkiem OPOE w końcowym stężeniu 0,05%, w temperaturze pokojowej, przez okres 30 minut. Po inkubacji próby wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 16 000xg, w czasie 30 minut, a otrzymany supernatant, zawierający pełną pulę białek prętka gruźlicy, porcjowano i przechowywano w temperaturze -20°C.

#### **4.2.4.2. Technika chromatografii powinowactwa**

Izolację ligandów prętka gruźlicy wiążących hrA-SAA1 przeprowadzano przy użyciu techniki chromatografii powinowactwa, wykorzystując komercyjny zestaw MicroLink™ Protein Coupling Kit (Thermo Scientific), (4.1.17.1) oraz procedurę zalecaną przez producenta zestawu.

W pierwszym etapie załączone w zestawie złożo agarozowe płukano trzykrotnie buforem opłaszczającym Coupling Buffer (4.1.17.1), a następnie opłaszczano 100 µg ludzkiego hrA-SAA1, rozpuszczonego w 300 µl buforu opłaszczającego. Po wymieszaniu, do złoża, zawieszzonego w buforze opłaszczającym z dodatkiem hrA-SAA1, dodawano 2 µl 5M roztworu cyjanoborowodoru sodu w 0,01M roztworze NaOH z dodatkiem 0,05% Tween20. Gotowe złożo agarozowe inkubowano w temperaturze pokojowej, w czasie 4 godzin, mieszając co 1 godzinę (immobilizacja hrA-SAA1). Opłaszczony hrA-SAA1 złożo płukano trzykrotnie buforem opłaszczającym Coupling Buffer (4.1.17.1), a następnie blokowano pozostałe wolne grupy wiążące złoża poprzez jego inkubację z 300 µl buforu blokującego Quenching Buffer (4.1.17.1) w temperaturze pokojowej, w czasie 30 minut. Po trzykrotnym wypłukaniu buforem płuczającym Wash solution (4.1.17.1), do złoża dodawano 500 µl surowego preparatu antygenowego zawierającego pełną pulę białek membranowych prętka gruźlicy (około 1-1,5 mg białka) i inkubowano w temperaturze 4°C, przez noc na kołyszce laboratoryjnej w celu związania się potencjalnych ligandów mykobakteryjnych z immobilizowanym na złożu hrA-SAA1. Następnie złożo płukano pięciokrotnie buforem płuczającym, rozcieńczonym w proporcji 1:1 wodą dejonizowaną z dodatkiem 0,05% Tween20, oraz trzykrotnie nierozcieńczonym buforem płuczającym. Elucję ligandów

związanych z hrA-SAA1, immobilizowanym na złożu agarozowym, prowadzono dwukrotnie buforem do elucji Elution Buffer (4.1.17.1), stosując każdorazowo 100  $\mu$ l tego buforu oraz inkubację w temperaturze pokojowej, przez okres 10 minut. Wartości pH otrzymanych eluatów neutralizowano poprzez dodanie 5  $\mu$ l roztworu 1M Tris-HCl, pH 9,0 (4.1.17). Obecne w eluowanych frakcjach białka *M. tuberculosis* wiążące ludzki hrA-SAA1 precypitowano przy użyciu acetonu, w proporcji 1 objętość eluatu na 4 objętości acetonu, w temperaturze -20°C przez całą noc. Precypitowane białka wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 16 000xg, w czasie 20 minut, a następnie rozpuszczano w 40  $\mu$ l PBS bez jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (4.1.6).

#### 4.2.4.3. Jednokierunkowy rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE

Wyizolowane z zastosowaniem chromatografii powinowactwa (4.4.2) ligandy mykobakteryjne wiążące hrA-SAA1 analizowano stosując jednokierunkowy rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE w warunkach redukujących. Przed rozdziałem próby białkowe denaturowano i zredukowano przy użyciu buforu próbkowego (4.1.12) w temperaturze 37°C, w czasie 20 minut, w łaźni wodnej. Następnie białka rozdzielano w 12% poliakrylamidowym żelu, w buforze do rozdziału elektroforetycznego (4.1.12) przy napięciu 100V oraz w obecności wzorca masy relatywnej białek PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Po rozdziale elektroforetycznym żel płukano trzykrotnie wodą dejonizowaną, a następnie barwiono frakcje białkowe przy użyciu barwnika Imperial Protein Stain (Sigma) przez noc. Żel odbarwiano poprzez intensywne, wielokrotne płukanie wodą dejonizowaną, a następnie analizowano w kierunku obecności białek prątka gruźlicy wiążących hrA-SAA1.

#### 4.2.4.4. Dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny 2D SDS-PAGE

Surowy preparat antygenowy, zawierający pełną pulę białek membranowych *M. tuberculosis*, dializowano wobec wody dejonizowanej w temperaturze pokojowej, przez okres 2 godzin, a następnie w temperaturze 4°C, przez okres 12 godzin. Odsolony preparat białkowy liofilizowano, a następnie rozpuszczano w buforze rehydratacyjnym (4.1.13) do stężenia 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Próby białkowe inkubowano w temperaturze 37°C, przez okres 15 minut i nanoszono, w objętości 125  $\mu$ l, na poliakrylamidowe paski o długości 7 cm. Po 12 godzinach rehydratacji, białka ogniskowano w temperaturze pokojowej, przy użyciu linearnego gradientu pH 4-7 (rozdział w pierwszym kierunku), w buforze do ogniskowania izoelektrycznego (4.1.13), do osiągnięcia napięcia o wartości 100kVh. Paski ze

zogniskowanymi białkami równoważono w buforze równoważącym (4.1.13) z dodatkiem DTT o końcowym stężeniu 2% przez okres 15 minut, a następnie w tym samym buforze z dodatkiem jodoacetamidu o końcowym stężeniu 4,8% przez kolejne 15 minut. W kolejnym etapie białka rozdzielano w warunkach denaturujących, w buforze do rozdziału elektroforetycznego (4.1.12), przy napięciu 100V, stosując 4-20% gradientowy oraz 12% niegradientowy poliakrylamidowy żel, w obecności wzorca masy relatywnej białek Precision Plus Protein™ Standard (BIO-RAD). Po rozdziale elektroforetycznym żele płukano trzykrotnie wodą dejonizowaną, a następnie frakcje białkowe barwiono barwnikiem Imperial Protein Stain (Sigma) przez noc. Żel odbarwiano poprzez intensywne, wielokrotne płukanie wodą dejonizowaną.

#### 4.2.4.5. Technika Western blot

Celem wytypowania ligandów wiążących hrA-SAA1 surowy preparat białkowy komórek prątka gruźlicy, zawierający pełną pulę białek membranowych, rozdzielony przy użyciu jedno- oraz dwukierunkowego rozdziału elektroforetycznego typu SDS-PAGE, poddano analizie techniką Western blot.

Przed wykonaniem elektrotransferu na nitrocelulozową membranę, poliakrylamidowy żel oraz celulozowe bibuły stabilizowano w buforze do transferu (4.1.14) w temperaturze pokojowej, przez okres 15 minut. Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na nitrocelulozowe membrany stosując pole elektryczne o napięciu 10V w temperaturze pokojowej, w czasie 90 minut. W celu zablokowania wolnych miejsc na nitrocelulozowym nośniku, membranę wraz z przeniesionymi białkami inkubowano w komercyjnym buforze blokującym Western Blocker™ Solution (Sigma) w temperaturze 4°C, przez noc, a następnie płukano pięciokrotnie buforem płuczającym (4.1.9). W kolejnym etapie przeniesione na membranę mykobakteryjne białka poddano reakcji wiązania z bt-hrA-SAA1 o stężeniu 5 µg/ml, w komercyjnym buforze PBS, zawierającym jony Ca<sup>2+</sup> oraz Mg<sup>2+</sup> (4.1.18), z dodatkiem 0,1% BSA, w temperaturze pokojowej, w czasie 1,5 godziny. Po pięciokrotnym płukaniu membrany buforem płuczającym (4.1.9) związany przez mykobakteryjne białka bt-hrA-SAA1 wykrywano przy użyciu streptawidyny znakowanej peroksydazą chrzanową, rozcieńczonej 1:1 000 w buforze płuczającym (4.1.9), według rekomendacji producenta, w temperaturze pokojowej, przez 1 godzinę. Reakcję barwną wywoływano z zastosowaniem roztworu 4-chloro-1-naftolu jako chromogenu (4.1.14).

#### 4.2.4.6. Tandemowa spektrometria mas ESI/MS/MS

Wytypowane, z zastosowaniem złożonej metodologii obejmującej techniki chromatografii powinowactwa i Western blot, mykobakteryjne białka wiążące hrA-SAA1 przekazano do dalszej identyfikacji przy użyciu tandemowej spektrometrii mas ESI/MS/MS z jonizacją cząsteczek metodą elektrorozpylania (*electrospray ionisation tandem mass spectrometry*), komercyjnie wykonywanej w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Do analizy przekazano wycięte fragmenty poliakrylamidowych żeli, zawierające wytypowane mykobakteryjne ligandy, które w ramach przeprowadzanej w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas procedury poddawano wstępnej redukcji i blokowaniu zredukowanych wiązań disiarczkowych, a następnie degradacji proteolitycznej przy użyciu standardowo stosowanego enzymu trypsyny. Otrzymane mieszaniny peptydów i ich fragmentów rozdzielane były z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej, a pomiar ich mas wykonany był przy użyciu spektrometrii mas. Analiza wyników obejmowała ich porównanie z bazą danych sekwencji białkowych (NCBI, UniProt) przy pomocy oprogramowania MASCOT. Ponadto wykonano analizę statystyczną wiarygodności uzyskanych przypisań oraz określono listę białek obecnych w dostarczonych próbach badanych.

#### 4.2.5. Wiązanie hrA-SAA1 przez rekombinowane białka prątka gruźlicy

##### 4.2.5.1. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy w systemie ekspresyjnym *E.coli* BL21 (DE3)

Wykorzystane na tym etapie badań rekombinowane szczepy *E. coli* pHIS/*atpA* i *E. coli* pHIS/*abc* zostały skonstruowane przez dr hab. Annę Brzostek w ramach współpracy z Pracownią Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Oba szczepy otrzymano według procedury opisanej przez Sheffield i wsp., 1999 [248] na drodze transformacji komórek *E. coli* BL21 (DE3) plazmidem ekspresyjnym pHIS-Parallel1, niosącym docelowy gen. Ponadto wektor ten zawiera gen warunkujący oporność na ampicylinę oraz sekwencję kodującą motyw polihistydynowy, co umożliwiła ekspresję białek posiadających w części N-końcowej domenę zbudowaną z 6 histydyn (6-HIS Tag).

Hodowle *E. coli* pHIS/*atpA* i *E. coli* pHIS/*abc* prowadzono w płynnym podłożu LB (4.1.2) z dodatkiem ampicyliny o końcowym stężeniu 100 µg/ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, do uzyskania zawiesin bakteryjnych o gęstości optycznej OD<sub>600</sub>=0,5. Bakterie przechowywano w temperaturze 4°C, przez całą noc, a następnie hodowle wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 1 500xg, w czasie 10 minut oraz wysiewano stosując takie samo podłoże hodowlane. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem do uzyskania zawiesin bakteryjnych o gęstości optycznej OD<sub>600</sub>=0,6. Nadprodukcję rekombinowanych białek rAtpA i rABC przez szczepy *E. coli* indukowano przy użyciu IPTG o końcowym stężeniu 0,5 mM, w temperaturze 37°C, w czasie 3 godzin, stosując intensywne wytrząsanie. Kontrole stanowiły zawiesiny bakteryjne hodowane w podłożu bez dodatku czynnika indukującego nadprodukcję docelowych białek. Następnie bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 1 500xg, w czasie 10 minut, a otrzymane osady przechowywano w -20°C.

W celu izolacji i oczyszczenia rekombinowanych białek prętka gruźlicy rozmrożone na lodzie osady bakterii lizowano w buforze BugBuster™ Protein Extraction Reagent (Sigma) z dodatkiem 1 mg/ml lizozymu, 10 µg/ml PMSF oraz 25 U/ml benzonazy, stosując 5 ml gotowego buforu na 1g osadu, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej, przez okres 20 minut. Obecne w ciałkach inkluzyjnych nierozpuszczalne formy rekombinowanych białek rAtpA i rABC izolowano stosując metodę chromatografii metalopowinowactwa przy użyciu kolumn HisPur™ Cobalt Spin Columns (4.1.17.1), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Otrzymane osady, zawierające ciała inkluzyjne, rozpuszczano w buforze 1x Binding Buffer (4.1.17.3) z dodatkiem 6M mocznika i 10 µg/ml PMSF. W celu usunięcia nierozpuszczonych zanieczyszczeń próby bakteryjne wirowano w temperaturze 4°C przy prędkości 16 000xg, w czasie 30 minut, a otrzymane ekstrakty białkowe mieszano z jednakową objętością buforu Equilibration/Wash Buffer (4.1.17.1). Załączone w zestawie złoża agarozowe, wysycone jonami kobaltu (Co<sup>2+</sup>) wiążącymi sekwencje 6-HIS Tag rekombinowanych białek, równoważono buforem Equilibration/Wash Buffer (4.1.17.1) w objętości odpowiadającej dwukrotnej objętości złoża agarozowego. Obecne w ekstraktach rekombinowane białka rAtpA i rABC oczyszczano stosując 30 minutową inkubację na złożu agarozowym. Następnie, po trzykrotnym wypłukaniu złoża, rekombinowane mykobakteryjne białka eluowano również trzykrotnie, buforem Elution Buffer (4.1.17.1), nanoszonym w objętości 1 ml, a uzyskane frakcje białek rekombinowanych przechowywano w temperaturze 4°C.



#### 4.2.5.2. Nadprodukcja i oczyszczanie rozpuszczalnych, rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy w systemie ekspresyjnym *E.coli* BL21 (DE3)

Hodowle *E. coli* pHIS/*atpA* i *E. coli* pHIS/*abc* prowadzono w płynnym podłożu LB (4.1.2) z dodatkiem ampicyliny o końcowym stężeniu 100 µg/ml w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, do uzyskania zawiesin bakteryjnych o gęstości optycznej OD<sub>600</sub>=0,6. Następnie zawiesiny bakteryjne schłodzono do temperatury pokojowej, a nadprodukcję rekombinowanych białek rAtpA i rABC przez szczepy *E. coli* indukowano przy użyciu IPTG o końcowym stężeniu 0,4 mM, w temperaturze 25°C, w czasie 4 godzin, stosując intensywne wytrząsanie. Kontrole stanowiły zawiesiny bakteryjne hodowane w podłożu bez dodatku czynnika indukującego nadprodukcję docelowych białek. Następnie bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 8 000xg, w czasie 10 minut.

W celu izolacji i oczyszczenia rekombinowanych białek prątka gruźlicy otrzymane osady bakterii zawieszano w 5 ml buforu 1x Binding Buffer (4.1.17.3) z dodatkiem 100 µg/ml lizozymu, 174 µg/ml PMSF oraz 10 U/ml benzonazy, a następnie inkubowano w temperaturze 4°C, przez okres 30 minut. Zawiesiny bakteryjne dezintegrowano przy użyciu homogenizatora Bioblock Scientific Ultrasonic Homogenizer (Labo Plus) stosując dziesięć 10-sekundowych cykli, przedzielonych 1-minutowymi przerwami. W celu pozbycia się resztek komórek otrzymane homogenizaty wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 13 000xg, w czasie 40 minut. Supernatanty, zawierające rozpuszczalne, rekombinowane białka rAtpA i rABC sączono przez nitrocelulozowe filtry o średnicy porów 0,45 µm, a następnie oczyszczano wykorzystując komercyjny zestaw His•Bind® Purification Kit (4.1.17.3), nieznacznie modyfikując procedurę zalecaną przez producenta. Załączone w zestawie złoża agarozowe, zawierające immobilizowane jony niklu (Ni<sup>2+</sup>) wiążące sekwencje 6-HIS Tag rekombinowanych białek, równoważono poprzez przemycie wodą dejonizowaną (3 objętości złoża), buforem 1x Charge Buffer (5 objętości złoża; 4.1.17.3) oraz buforem do 1x Binding Buffer (3 objętości złoża; 4.1.17.3). Otrzymane w pierwszym etapie supernatanty, zawierające rozpuszczalne, rekombinowane białka, 5-krotnie przepuszczano przez złoża, które następnie płukano buforem 1x Binding Buffer (10 objętości złoża; 4.1.17.3) oraz buforem płuczącym 1x Wash Buffer (6 objętości złoża; 4.1.17.3). W kolejnym etapie rekombinowane białka eluowano buforem do elucji 1x Elute Buffer (10 ml; 4.1.17.3), zbierając je w postaci frakcji o objętości 1 ml. W celu wymiany buforu na bufor Tris-NaCl, pH 7,5 (4.1.18) otrzymane frakcje białek rekombinowanych

nanoszono na kolumny PD-10 Columns-CGE (GE Healthcare), (4.1.17), a następnie zateżano do końcowej objętości 1 ml przy użyciu ultrafiltrów Amicon® Ultra Centrifugal Filter Units (4.1.17) o wartości granicznej 30 kDa, według procedury rekomendowanej przez producenta. W celu przedłużenia stabilności rozpuszczalnych rekombinowanych białek dodawano do nich glicerol, do końcowego stężenia 10%, a następnie porcjowano i przechowywano w -20°C.

#### **4.2.5.3. Oznaczenie stężenia białek metodą Bradford**

Stężenie białek rekombinowanych oznaczano z wykorzystaniem odczynnika Bradford Reagent (Sigma), zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta. Stężenie białka określano na podstawie krzywej wzorcowej zależności wartości absorbancji od stężenia albuminy bydlęcej (BSA) w zakresie stężeń od 0,1 do 1,4 mg/ml. Do studzienek płytki 96-studzienkowej nanoszono po 5 µl zebranych frakcji rekombinowanych białek oraz poszczególnych stężeń wzorcowego białka, a następnie dodawano 250 µl odczynnika Bradford. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 5 minut. Wartości absorbancji przy długości fali  $\lambda = 595$  nm mierzono stosując czytnik Multiscan EX (Thermo Scientific).

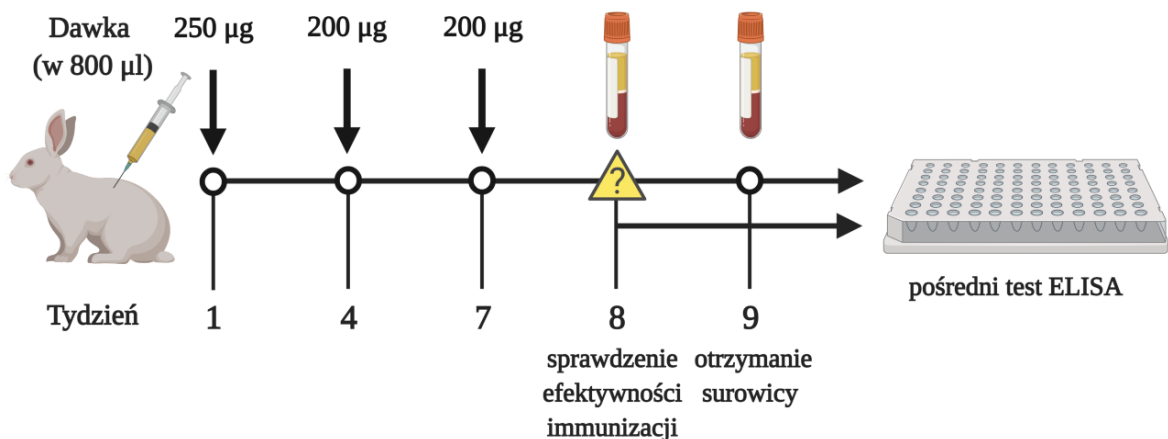
#### **4.2.5.4. Identyfikacja rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy techniką Western blot**

Otrzymane z ciałek inkluzyjnych oraz rozpuszczalne rekombinowane białka rAtpA i rABC rozdzielano w 12% poliakrylamidowym żelu według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.4.3. Elektrotransfer rekombinowanych białek na nitrocelulozowe membrany wykonano według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.4.5. Przeniesione na nitrocelulozowe membrany rekombinowane białka rAtpA i rABC prątka gruźlicy inkubowano z monoklonalnymi, mysimi przeciwciałami izotopu IgG1 swoistymi dla motywu 6-His Tag (4.1.14), w stężeniu 0,4 µg/ml, w buforze płuczającym (4.1.9), w temperaturze pokojowej, przez okres 1 godziny. Powstałe kompleksy immunologiczne rekombinowane białko-przeciwciało wykrywano poprzez inkubację membran nitrocelulozowych z poliklonalnymi, kozimi przeciwciałami klasy IgG swoistymi dla immunoglobulin myszy, znakowanymi peroksydazą chrzanową (4.1.14), w stężeniu 0,2 µg/ml, w buforze płuczającym (4.1.9), w temperaturze pokojowej, przez okres 1 godziny. Reakcję barwną wywoływano z zastosowaniem roztworu 4-chloro-1-naftolu jako

chromogenu (4.1.14). Optymalne stężenia stosowanych immunoglobulin ustalono eksperymentalnie we wstępnych doświadczeniach.

#### 4.2.5.5. Otrzymanie surowic odpornościowych

Surowice odpornościowe, swoiste dla białka rAtpA i rABC, otrzymano na drodze immunizacji królików rasy Białej Nowozelandzkiej. Zastosowany kalendarz szczepień obejmował podanie drogą podskórną dawek antygeny (I – 250  $\mu\text{g}$ , II – 200  $\mu\text{g}$ , III – 200  $\mu\text{g}$ ) w postaci emulsji z niekompletnym adiuwantem Freund'a, w odstępach 3-tygodniowych. Siedem dni po ostatnim szczepieniu, z żyły brzeżnej ucha pobrane zostały próby krwi o objętości 0,5 ml w celu określenia efektywności zastosowanej procedury immunizacji, w oparciu o miana swoistych przeciwciał wyznaczone z wykorzystaniem pośredniego testu immunoenzymatycznego ELISA, wykonywanego według procedury opisanej w podrozdziale 4.5.6.



Ryc. 9. Schemat immunizacji królików rasy Białej Nowozelandzkiej oraz otrzymania surowic odpornościowych

Dziesięć dni po ostatniej immunizacji oraz po ustaleniu miana przeciwciał swoistych dla białka rAtpA i rABC króliki poddano znieczuleniu ogólnemu i pobrano od nich krew przez nakłucie dosercowe. Króliczą krew pełną inkubowano w temperaturze 37°C, w czasie 1 godziny, a następnie, po odklejeniu skrzepów w temperaturze 4°C przez okres 4-5 godzin. Otrzymaną surowicę wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 720xg, w czasie 15 minut w celu usunięcia elementów morfotycznych krwi, porcjowano i przechowywano w -20°C (Ryc. 9).

#### **4.2.5.6. Określenie miana przeciwciał z wykorzystaniem pośredniego testu immunoenzymatycznego ELISA**

W celu określenia miana króliczych immunoglobulin klasy IgG swoistych dla rekombinowanego białka rAtpA lub rABC wykorzystano pośredni test ELISA.

Studzienki płytki 96-studzienkowej opłaszczano odpowiednim rekombinowanym antygenem o stężeniu 20 µg/ml (100 µl) w buforze węglanowym, pH 9,6 (4.1.9), w temperaturze 4°C przez całą noc. Kolejnego dnia studzienki płukano trzykrotnie buforem płuczającym (4.1.9), a wolne miejsca na polisterynowym nośniku blokowano stosując 280 µl buforu blokującego (4.1.9), w temperaturze 37°C przez okres 1 godziny. Po ponownym, trzykrotnym płukaniu buforem płuczającym (4.1.9) do studzienek наносono surowice badane (100 µl) w rozcieńczeniach od 1:100 do 1:51 200 w buforze blokującym (4.1.9) i inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 1 godziny. W kolejnym etapie do wypłukanych trzykrotnie buforem płuczającym (4.1.9) studzienek наносono poliklonalne, kozie przeciwciała klasy IgG swoiste dla króliczych immunoglobulin klasy IgG, znakowane peroksydazą chrzanową (100 µl) w rozcieńczeniu 1:2000, w buforze blokującym (4.1.9) i inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 1 godziny. Reakcję barwną wywoływano stosując roztwór substratu i chromogenu (4.1.9) dodawanego w objętości 100µl do każdej studzienki w temperaturze pokojowej, w ciemności, w czasie 20 minut. Wartości OD prób badanych i kontrolnych mierzono przy długości fali  $\lambda=405$  nm stosując czytnik Multiscan EX (Thermo Scientific).

#### **4.2.5.7. Wiązanie hrA-SAA1 przez rekombinowane białka prątka gruźlicy**

W celu potwierdzenia zdolności wytypowanych białek prątka gruźlicy do wiązania hrA-SAA1 wykorzystano technikę Western blot. Rekombinowane mykobakteryjne białka rAtpA i rABC, w ilości 2 µg i 5 µg, rozdzielono w 12% poliakrylamidowym żelu według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.4.3. Elektrotransfer rekombinowanych białek na nitrocelulozowe membrany wykonano według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.4.5. Przeniesione na nitrocelulozowe membrany mykobakteryjne białka poddano reakcji wiązania z bt-hrA-SAA1 o końcowym stężeniu 10 µg/ml w buforze płuczającym (4.1.9), z dodatkiem 0,1% BSA oraz 0,05% Tween20, w temperaturze pokojowej przez okres 2 godzin. Wiązanie bt-hrA-SAA1 do mykobakteryjnych białek wykrywano przy użyciu streptawidyny znakowanej peroksydazą chrzanową, rozcieńczonej 1:1 000 w buforze

płuczającym (4.1.9), według rekomendacji producenta, w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Reakcję barwną wywoływano z zastosowaniem roztworu 4-chloro-1-naftolu jako chromogenu (4.1.14).

#### **4.2.5.8. Swoistość wiązania hrA-SAA1 przez rekombinowane białka rAtpA i rABC prątka gruźlicy**

Swoistość interakcji białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy z hrA-SAA1 oceniano z zastosowaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego, wykonywanego przy współpracy z dr Jakubem Kryczką z Pracowni Sygnalizacji Komórkowej, Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Przed wykonaniem analizy rozpuszczalne białka rAtpA i rABC prątka gruźlicy nanoszono na kolumny PD-10 Columns-CGE (4.1.17) w celu wymiany buforu Tris-NaCl, pH 7,5 (4.1.18) na bufor PBS bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  (4.1.6), a następnie rozcieńczano w tym samym buforze do wartości stężeń 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ . Rekombinowany ludzki SAA1 kowalencyjnie immobilizowano na powierzchni sensorowego chipu CM5, stosując procedurę rekomendowaną przez producenta. Kontrolę oznaczenia stanowiła kowalencyjnie immobilizowana albumina surowicy bydlęcej. Rezonans plazmonowy wykonywano w buforze PBS bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  (4.1.6) z dodatkiem surfaktantu P20 o końcowym stężeniu 0,005%, w temperaturze 22°C. Tworzenie kompleksów hrA-SAA1-rekombinowane białko prątka gruźlicy obserwowano przy wartości przepływu 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

#### **4.2.6. Konstrukcja szczepów mutantów *M. tuberculosis* z nadprodukcją białek wiążących hrA-SAA1**

Wykorzystane w pracy doktorskiej szczepy mutanty *MtbAtpA* $\uparrow$  oraz *MtbABC* $\uparrow$ , zdolne do indukowanej tetracykliną nadprodukcji białka AtpA (Rv1308) lub ABC (Rv2477c), zostały skonstruowane przez dr hab. Annę Brzostek w ramach współpracy z Pracownią Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Szczepy mutanty otrzymano na drodze transformacji komórek prątka gruźlicy replikacyjnym plazmidem pKW08 noszącym docelowy gen i pod kontrolą promotora tetracyklinowego (*ptet*).

#### **4.2.6.1. Potwierdzenie nadprodukcji białek AtpA i ABC przez szczepy mutanty *MtbAtpA*<sup>↑</sup> i *MtbABC*<sup>↑</sup> techniką Western blot**

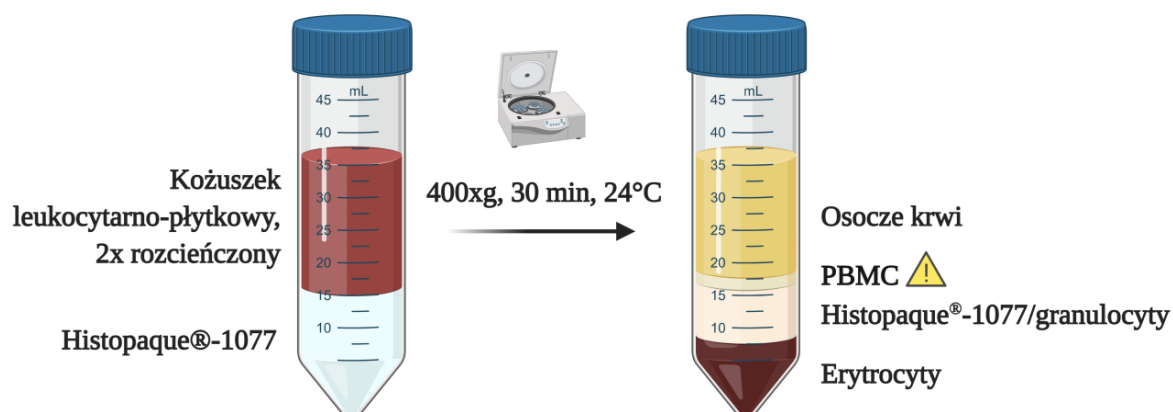
Izolację białek rAtpA i rABC z szczepów *MtbAtpA*<sup>↑</sup> i *MtbABC*<sup>↑</sup> przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.2.4.1 Ilość białka w otrzymanych preparatach białkowych oznaczano z wykorzystaniem odczynnika Bradford Reagent (Sigma) zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.2.5.3. Otrzymane preparaty białkowe, w ilości 5 µg, 10 µg i 20 µg, rozdzielano elektroforetycznie w 12% poliakrylamidowym żelu, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.2.4.3. Elektrotransfer rozdzielonych białek na nitrocelulozowe membrany przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.2.5.4. Przeniesione na nitrocelulozowe membrany białka rAtpA i rABC inkubowano z króliczymi surowicami swoistymi dla białka AtpA (rozcieńczenie 1:1 000) lub ABC (rozcieńczenie 1:500) rozcieńczonymi w buforze płuczącym (4.1.9), w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Powstałe kompleksy immunologiczne rekombinowane białko-przeciwciało wykrywano poprzez inkubację membran nitrocelulozowych z poliklonalnymi, kozimi przeciwciałami klasy IgG swoistymi dla immunoglobulin króliczych, znakowanymi peroksydazą chrzanową, w rozcieńczeniu 1:2 000, w buforze płuczącym (4.1.9), w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Reakcję barwną wywoływano z zastosowaniem roztworu 4-chloro-1-naftolu jako chromogenu (4.1.14). Optymalne stężenia stosowanych immunoglobulin ustalono eksperymentalnie we wstępnych doświadczeniach.

#### **4.2.7. Otrzymywanie ludzkich makrofagów pochodzenia monocytarnego**

##### **4.2.7.1. Izolacja PBMC z kożuszka leukocyтарno-platekowego**

Ludzkie makrofagi pochodzenia monocytarnego otrzymano zgodnie z procedurą opisaną przez Seager Danciger i wsp., 2004 [249]. Kożuszek leukocyтарno-platekowy, otrzymany z pełnej krwi zdrowych dawców, rozcieńczano dwukrotnie w buforze PBS/EDTA (4.1.6), a następnie nawarstwiano na gradient Histopaque®-1077 (Sigma) w proporcji 2:1 i wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 400xg (bez hamowania), w czasie 30 minut. Otrzymaną interfazę, zawierającą frakcję jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), płukano trzykrotnie PBS/EDTA (4.1.6) wirując

komórki w temperaturze pokojowej, przy prędkości 300xg (pierwsze wirowanie) oraz 120xg (drugie i trzecie wirowanie), w czasie 10 minut w celu pozbycia się płytek krwi (**Ryc. 10**).



**Ryc. 10. Rozdział kożuszka leukocytarno-płytkowego z zastosowaniem wirowania w gradiencie gęstości Histopaque®-1077**

#### 4.2.7.2. Określenie gęstości i żywotności komórek

Gęstość oraz żywotność komórek oceniano przy użyciu komory Bürkera oraz mikroskopu świetlnego stosując 0,4% roztwór błękitu trypanu Trypan Blue Dye (4.1.6) w proporcji 1:1. Gęstość liczono ze wzoru:

$$d = L \times R \times 10^4$$

$d$  – liczba komórek na 1 ml zawiesiny

$L$  – liczba komórek

$R$  – rozcieńczenie zawiesiny komórek

Żywotność, wyrażaną w procentach, liczono ze wzoru:

$$z = \frac{Lw - Lm}{Lw} \times 100\%$$

$z$  – żywotność

$Lw$  – liczba wszystkich komórek (nie mniej niż 100)

$Lm$  – liczba martwych komórek

#### 4.2.7.3. Izolacja monocytów krwi obwodowej

Zawiesinę PBMC ( $125 \times 10^6$  komórek) wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 300xg, w czasie 10 minut, a następnie zawieszano w 25 ml podłoża A (4.1.5), nawarstwiano na 46% roztwór izoosmotycznego perkolu (4.1.6) w proporcji 1:1 i wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 550xg (bez hamowania), w czasie 30 minut. Interfazę, zawierającą monocyty krwi obwodowej, płukano jednokrotnie zimnym PBS/EDTA (4.1.6) wirując komórki w temperaturze 4°C, przy prędkości 400xg, w czasie 10 minut. W kolejnym etapie osad komórek zawieszano w zimnym PBS bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  (4.1.6) i oceniano gęstość, a także żywotność stosując procedury opisaną w podrozdziale 4.2.7.2. Czystość otrzymanej zawiesiny monocytów krwi obwodowej określano w mikroskopie świetlnym oceniając morfologię komórek w rozmazach barwionych 0,4% wodnym roztworem barwnika Giemzy.

#### 4.2.7.4. Różnicowanie makrofagów z monocytów krwi obwodowej

Monocyty krwi obwodowej, wyizolowane z kożuszka leukocytno-płytkowego, różnicowano do makrofagów w obecności rekombinowanego, ludzkiego czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów. Potrzebną do eksperymentu ilość komórek wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 400xg, w czasie 10 minut, a następnie zawieszano w podłożu B i hodowano na płytkach 24-studzienkowych w liczbie  $5 \times 10^5$  komórek/studzienkę, w wilgotnej atmosferze z dodatkiem 10%  $\text{CO}_2$ , w temperaturze 37°C, przez okres 8 dni. Komórki, po 5 dniach hodowli, dożywiano podłożem B (4.1.6).

#### 4.2.8. Wpływ interakcji prątka gruźlicy z hrA-SAA1 na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów

##### 4.2.8.1. Opłaszczanie *M. tuberculosis* ludzkim rA-SAA1

Hodowle wyjściowego szczepu prątka gruźlicy oraz szczepów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ o gęstości optycznej  $\text{OD}_{600} = 0,8-1,0$ , w objętości odpowiadającej  $1 \times 10^8$  komórek bakterii wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut. Opłaszczanie komórek bakterii ludzkim białkiem ostrej fazy prowadzono w 0,5 ml podłoża C (4.1.5), zawierającego hrA-SAA1 o końcowym stężeniu 3  $\mu\text{g/ml}$  lub 15  $\mu\text{g/ml}$ , i inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez okres 1,5 godziny. Kontrolę stanowiły odpowiednie zawiesiny bakteryjne zawieszane w podłożu C (4.1.5), bez dodatku



hrA-SAA1. Następnie bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut i zawieszano w podłożu D (4.1.5).

#### **4.2.8.2. Fagocytoza**

Dzień przed eksperymentem dojrzałe ludzkie makrofagi płukano jednokrotnie podłożem F (4.1.5), oraz dwukrotnie podłożem G (4.1.5) w celu usunięcia niewyróżnicowanych komórek oraz antybiotyków o działaniu prątkobójczym. Następnie do komórek dodano podłoże D (4.1.5) oraz zakażano je odpowiednimi bakteriami opłaszczonymi bądź nieopłaszczonymi hrA-SAA1 w stosunku 10 komórek bakterii na 1 makrofaga na (MOI=10:1) i wirowano w temperaturze 37°C, przy prędkości 1 000xg, w czasie 10 minut, w celu osadzenia bakterii na dnie studzienek. Fagocytozę prowadzono w wilgotnej atmosferze zawierającej 10% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C przez okres 2 godzin. Makrofagi wraz z pochłoniętymi prątkami gruźlicy płukano trzykrotnie podłożem G (4.1.5) w celu usunięcia zlokalizowanych zewnątrzkomórkowo oraz nieprzylegających do makrofagów bakterii i lizowano lub hodowano w podłożu E (4.1.5).

#### **4.2.8.3. Określenie liczby jednostek koloniotwórczych (CFU)**

Wpływ wiązania hrA-SAA1 przez prątką gruźlicy na przyleganie i wnikanie tych bakterii do ludzkich makrofagów oceniano bezpośrednio po fagocytozie (dzień 0). W przypadku oceny przylegania bakterii do komórek docelowych, makrofagi z pochłoniętymi bakteriami poddano dodatkowej inkubacji w podłożu E (4.1.5) zawierającym gentamycynę o końcowym stężeniu 1 mg/ml, w wilgotnej atmosferze zawierającej 10% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C przez okres 2 godzin (w celu usunięcia zlokalizowanych zewnątrzkomórkowo prątków gruźlicy). Zdolność bakterii do wewnątrzkomórkowego wzrostu w obecności badanego białka ostrej fazy określano po 72 godzinach (dzień 3) oraz 144 godzinach (dzień 6) hodowli makrofagów z pochłoniętymi prątkami gruźlicy w wilgotnej atmosferze zawierającej 10% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C. Izolację bakterii z ludzkich makrofagów przeprowadzano poprzez lizę fagocytów stosując bufor do lizy (4.1.18) w objętości 1 ml/studzienkę. W celu uwzględnienia, w dniu 3 i 6, bakterii znajdujących się pozakomórkowo, podłoże znad hodowli makrofagów wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut, a następnie lizowano i łączono ze znajdującym się w studzienkach lizatem fagocytów do końcowej objętości 1 ml. W kolejnym etapie bakterie rozcieńczano stosując szereg 10-krotnych rozcieńczeń

w płynnym podłożu Middlebrook'a 7H9 (4.1.2) i wysiewano z wybranych rozcieńczeń na stałe podłoże Middlebrook'a 7H10 (4.1.2). Wyrośnięte na podłożach stałych kolonie prętka gruźlicy liczono po trzech tygodniach hodowli bakterii w wilgotnej atmosferze, w temperaturze 37°C.

#### 4.2.9. Analiza proteomiczna szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑

Wpływ nadprodukcji białka AtpA i ABC u szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ na proteom tych bakterii określano poprzez wykonanie komercyjnej analizy proteomicznej z zastosowaniem spektrometrii mas ESI/MS/MS w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Izolację proteomu wyjściowego szczepu prętka gruźlicy oraz szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ przeprowadzano z 10 ml odpowiedniej hodowli o gęstości optycznej  $D_{600}=0,8-1,0$ . Bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, przez okres 20 minut oraz trzykrotnie płukano buforem PBS bez jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  (4.1.6) poprzez wirowanie w tych samych warunkach. Osady bakterii zawieszano w 200 µl buforu do izolacji proteomu (4.1.16), a następnie dodawano kulki krzemionkowe o średnicy 0,1 mm w proporcji 1 objętość kulek na 2 objętości zawiesiny bakteryjnej. Komórki prętków dezintegrowano w homogenizatorze komórkowym FastPrep-24 (MP Biomedicals) stosując trzy 45-sekundowe cykle, przy prędkości 6 M/s, przedzielone 5-minutowymi etapami chłodzenia na łaźni lodowej. W kolejnym etapie zawiesiny bakteryjne wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 16 000xg, w czasie 10 minut. Ilość białka w otrzymanych supernatantach, zawierających pełen zestaw białek prętków gruźlicy, oznaczano z wykorzystaniem odczynnika Bradford Reagent (Sigma) zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.2.5.3. a następnie porcjowano i przechowywano w temperaturze -20°C. Przed wykonaniem analizy spektrometrycznej 20µg odpowiedniego preparatu białkowego precypitowano stosując zimny aceton, w proporcji 4 objętości acetonu na 1 objętość próby, w temperaturze -20°C, przez całą noc. W kolejnym etapie precypitaty wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 16 000xg, przez okres 15 minut. Nadmiar acetonu dokładnie usuwano, a osady zawierające proteom prętków gruźlicy suszono w temperaturze pokojowej, w czasie 15 minut i przekazywano do analizy proteomicznej z wykorzystaniem spektrometrii mas ESI/MS/MS. Uzyskane dane proteomiczne w formacie surowym analizowano z wykorzystaniem oprogramowania MaxQuant w wersji 1.6.3.4,

stosując fabrycznie ustawione parametry przeszukiwania, wobec bazy danych białek *M. tuberculosis* (Tuberculist\_v25, [www.mycobrowser.epfl.ch](http://www.mycobrowser.epfl.ch)). Przy przeszukiwaniu jako możliwe stałe modyfikacje wybrano karbamidometylacje cystein, natomiast oksydacje i acetylacje N-końców białek jako modyfikacje zmienne. Wyniki analiz z wykorzystaniem MaxQuant mają charakter danych półilościowych i zostały wyliczone na podstawie intensywności pików masowych identyfikowanych dla poszczególnych peptydów, przyporządkowanych do odpowiednich białek.

#### **4.2.10. Analiza transkryptomu prątka gruźlicy w odpowiedzi na wiązanie hrA-SAA1**

Wpływ wiązania hrA-SAA1 przez prątki gruźlicy na odpowiedź funkcjonalną tych bakterii na poziomie transkryptomu określano poprzez wykonanie analizy ilościowej i jakościowej RNA *M. tuberculosis*. Izolację RNA bakterii przeprowadzono przy współpracy z dr Renatą Płocińską oraz dr Przemysławem Płocińskim z Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Materiał genetyczny został przekazany do sekwencjonowania w technologii Illumina, wykonywanego komercyjnie przez Pracownię Biobank Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Hodowle prątka gruźlicy H37Rv, o gęstości optycznej  $OD_{600}=0,8-1,0$ , w objętości odpowiadającej  $2 \times 10^8$  komórek bakterii, wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, przez okres 20 minut. Opłaszczanie komórek bakterii ludzkim białkiem ostrej fazy prowadzono w 0,5 ml podłoża C (4.1.5) zawierającego hrA-SAA1 o końcowym stężeniu 15  $\mu\text{g/ml}$  i inkubowano w temperaturze 37°C, w czasie 3 godzin. Kontrolę stanowiły zawiesiny bakteryjne zawieszono w podłożu C (4.1.5), bez dodatku hrA-SAA1. Następnie bakterie wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4 000xg, w czasie 20 minut, zawieszano w 300  $\mu\text{l}$  wody wolnej od nukleaz (4.1.15) i dodawano bufor do izolacji RNA (4.1.15) w proporcjach 1 objętość zawiesiny bakteryjnej na 3 objętości buforu. W kolejnym etapie do zawiesin bakteryjnych dodawano kulki krzemionkowe o średnicy 0,1 mm, chłodzono na łaźni lodowej i dezintegrowano w homogenizatorze komórkowym FastPrep-24 (MP Biomedicals) stosując dwa 45-sekundowe cykle, przy prędkości 6 M/s, przedzielone 5-minutowymi etapami chłodzenia na łaźni lodowej. Otrzymane homogenizaty bakteryjne chłodzono na łaźni lodowej do momentu opadnięcia kulek krzemionkowych na dno probówek, a następnie zebrane z dna

osadów lizaty wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 12 000xg, w czasie 5 minut, w celu pozbycia się resztek komórek oraz genomowego DNA związanego z nukleoproteinami. Otrzymane supernatanty inkubowano w temperaturze pokojowej, przez okres 5 minut, w celu dysocjacji nukleoprotein związanych z RNA, a następnie do klarownych lizatów dodawano 250 µl chloroformu i wytrząsano do uzyskania jednolitej emulsji. W celu separacji faz próby inkubowano w czasie 10 minut na łaźni lodowej i wirowano w temperaturze 4°C przy prędkości 12 000xg przez okres 15 minut. Górną, wodną fazę, zawierającą RNA prątków gruźlicy, precypitowano w obecności jednej objętości zimnego izopropanolu, 0,1 objętości 3M roztworu octanu potasu (4.1.15) oraz 2 µl glikogenu GlycoBlue (Thermo Scientific) w temperaturze -20°C, w czasie 30 minut, a następnie w temperaturze -80°C, w czasie 16 godzin. Precypitaty wirowano w temperaturze 4°C, przy prędkości 20 000xg, przez okres 30 minut, a otrzymany osad, zawierający RNA prątków gruźlicy, płukano 70% wodnym roztworem etanolu (4.1.15), wirując w tych samych warunkach. Osady, zawierające bakteryjny RNA, suszono przez okres 20 minut na łaźni lodowej, zawieszano w 50 µl wody wolnej od nukleaz (4.1.15), dodawano 1 µl inhibitora RNaz (4.1.15) i inkubowano przez 30 minut na łaźni lodowej oraz przechowywano w -80°C. Stężenie wyizolowanego materiału genetycznego mierzono przy użyciu spektrofotometru DS11 FX (Denovix). Analiza jakościowa RNA, obejmująca ocenę stosunku absorbancji 260/280 (>2) oraz integralności RNA (>8,5), została wykonana przy użyciu zestawu odczynników RNA Nano (Agilent) oraz urządzenia 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent) zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta.

Przed wykonaniem sekwencjonowania preparaty zawierające RNA prątka gruźlicy, odpowiadające około 10 µg materiału genetycznego, trawiono enzymem DNazą I Turbo (Thermo Fisher Scientific) według procedury rekomendowanej przez producenta, w celu pozbycia się DNA. RNA oczyszczano z wykorzystaniem odczynnika AMPure XP (Beckman), zawierającego mikrocząstki magnetyczne wiążące kwasy nukleinowe, stosując 2 objętości odczynnika na 1 objętość próbki RNA. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 10 minut i zbierano na złożu magnetycznym. Następnie osady RNA związane na złożu magnetycznym płukano dwukrotnie objętością 500 µl 80% wodnego roztworu etanolu przez okres 30 sekund. Oczyszczone RNA odzyskiwano poprzez zawieszenie złoża magnetycznego w wodzie wolnej od RNaz (4.1.5) i odseparowanie mikrocząstek na statywie magnetycznym. Do przygotowania każdej z bibliotek RNASeq wykorzystywano 2 µg oczyszczonego RNA. W kolejnym etapie z materiału genetycznego

usuwano rybosomalne RNA z wykorzystaniem zestawu Ribo-Zero<sup>®</sup> rRNA Removal Kit (Illumina) według procedury zalecanej przez producenta. RNA poddane rybodeplecji ponownie oczyszczano z użyciem odczynnika AMPure XP (Beckman) według procedury opisanej powyżej. Niciowo-specyficzne biblioteki RNAseq uzyskiwano z RNA prątków gruźlicy przy użyciu zestawu KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (Roche). Ilość i jakość bibliotek oceniano przy użyciu zestawu DNA 1000 (Agilent) z wykorzystaniem urządzenia 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent). Biblioteki normalizowano na podstawie analizy PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem zestawu NEBNext<sup>®</sup> (NEB), a następnie sekwencjonowano w technologii Illumina na urządzeniu NextSeq550 (Illumina). Analiza bioinformatyczna otrzymanych surowych wyników sekwencjonowania polegała na odcięciu sekwencji adapterów oraz odfiltrowaniu odczytów zbyt krótkich (<20nt) lub/i o niskiej jakości (<30) z wykorzystaniem skryptu Cutadapt, oraz odseparowaniu odczytów o wysokiej jakości sygnałów, wytypowanych przy pomocy algorytmu Sickle. Odczyty te zostały wykorzystane do mapowania względem referencyjnego genomu prątka w wersji NC\_000926.3, pobranego z bazy NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), z wykorzystaniem programu Bowtie2. Zmapowane odczyty zostały następnie przyporządkowane i zliczone do odpowiednich transkryptów bądź genów przy pomocy oprogramowania HTSeq-count, uwzględniając specyficzność nici sekwencji. Różnice w ekspresji wizualizowano przy pomocy platformy RNA-seq Degust (<http://degust.erc.monash.edu/>) oraz algorytmów programu R.

#### **4.2.11. Analiza statystyczna**

Opracowanie statystyczne otrzymanych w niniejszej pracy doktorskiej wyników wykonano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software). Normalność rozkładu zmiennych oceniano testem Kołmogrova-Smirnova. Różnice między dwoma grupami zmiennych oceniano, w zależności od normalności rozkładu, parametrycznym testem T-Studenta lub nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya. Różnice między wieloma grupami analizowano testem One-way ANOVA. Przeprowadzone analizy uznawano za istotne statystycznie przy wartości granicznej  $p \leq 0,05$ .

# **ROZDZIAŁ 5**

***WYNIKI***

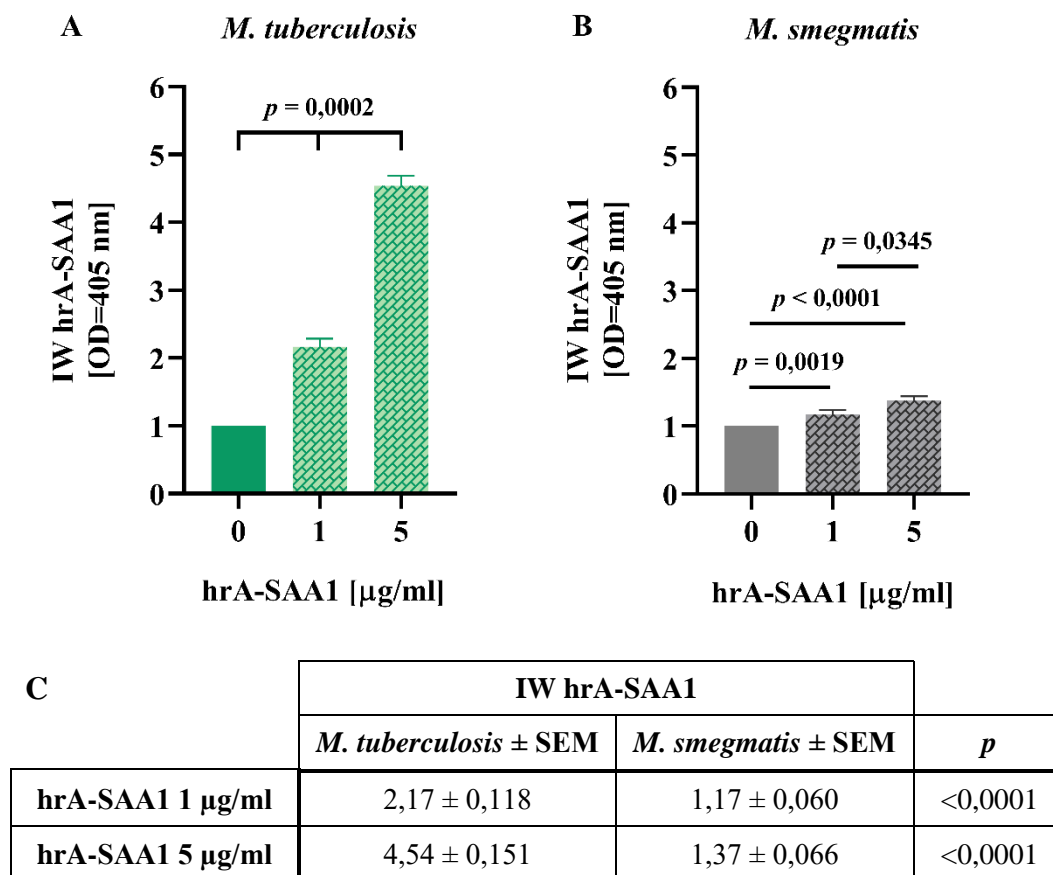
## 5. WYNIKI

### 5.1. HIPOTEZA 1

*Mycobacterium tuberculosis* posiada zdolność wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A

#### 5.1.1. Analiza interakcji *M. tuberculosis* z ludzkim surowicznym amyloidem A

Ocenę zdolności żywych komórek *M. tuberculosis* do wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnego hrA-SAA1, w stężeniach końcowych 1 µg/ml i 5 µg/ml, oraz komercyjnych poliklonalnych króliczych immunoglobulin swoistych dla ludzkiego A-SAA1. Związane przez bakterie białko ostrej fazy wykrywano wykorzystując test cELISA, zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2.2. Dodatkowo, efektywność wiązania hrA-SAA1 przez *M. tuberculosis* porównano z tą samą właściwością środowiskowych prątków saprofitycznych gatunku *M. smegmatis*. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci względnej intensywności obserwowanego wiązania (IW) stanowiącej iloraz średniej wartości absorbancji próby badanej ( $OD_{405/B}$ ) przez średnią wartość absorbancji odpowiadającej próbie kontrolnej ( $OD_{405/K}$ ). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż żywe komórki *M. tuberculosis* (**Ryc. 11A**) znamienne wiążą hrA-SAA1 (hrA-SAA1/ 1 µg/ml,  $p=0,0002$ ; hrA-SAA1/ 5 µg/ml,  $p=0,0002$ ), a ilość związanego białka ostrej fazy jest wprost proporcjonalna do jego końcowego stężenia, zastosowanego w ramach prowadzonych doświadczeń, co przejawia się statystycznie istotnym nasileniem wiązania hrA-SAA1 wraz ze wzrostem stężenia tego białka ( $p=0,0002$ ). Zależną od stężenia białka ( $p=0,0345$ ) zdolność do interakcji z hrA-SAA1 stwierdzono także w przypadku *M. smegmatis*, a efekt ten był statystycznie istotny w obecności obu badanych końcowych stężeń surowiczego amyloidu A (hrA-SAA1/ 1 µg/ml,  $p=0,0019$ ; hrA-SAA1/ 5 µg/ml,  $p<0,0001$ ), (**Ryc. 11B**). Ponadto zaobserwowano, iż patogenne prątki *M. tuberculosis* charakteryzują się istotnie wyższą intensywnością interakcji z hrA-SAA1 (hrA-SAA1/ 1 µg/ml, IW=2,17; hrA-SAA1/ 5 µg/ml, IW=4,54;  $p<0,0001$ ) w porównaniu do niepatogennych prątków *M. smegmatis* (hrA-SAA1/ 1 µg/ml, IW=1,17; hrA-SAA1/ 5 µg/ml, IW=1,37), (**Ryc. 11C**).



**Ryc. 11.** Wiązanie hrA-SAA1 przez żywe komórki *M. tuberculosis* (A) i *M. smegmatis* (B); IW – względna intensywność wiązania hrA-SAA1, OD<sub>405/B</sub> – wartość absorbancji próby badanej, OD<sub>405/K</sub> – wartość absorbancji próby kontrolnej, SEM – błąd standardowy średniej

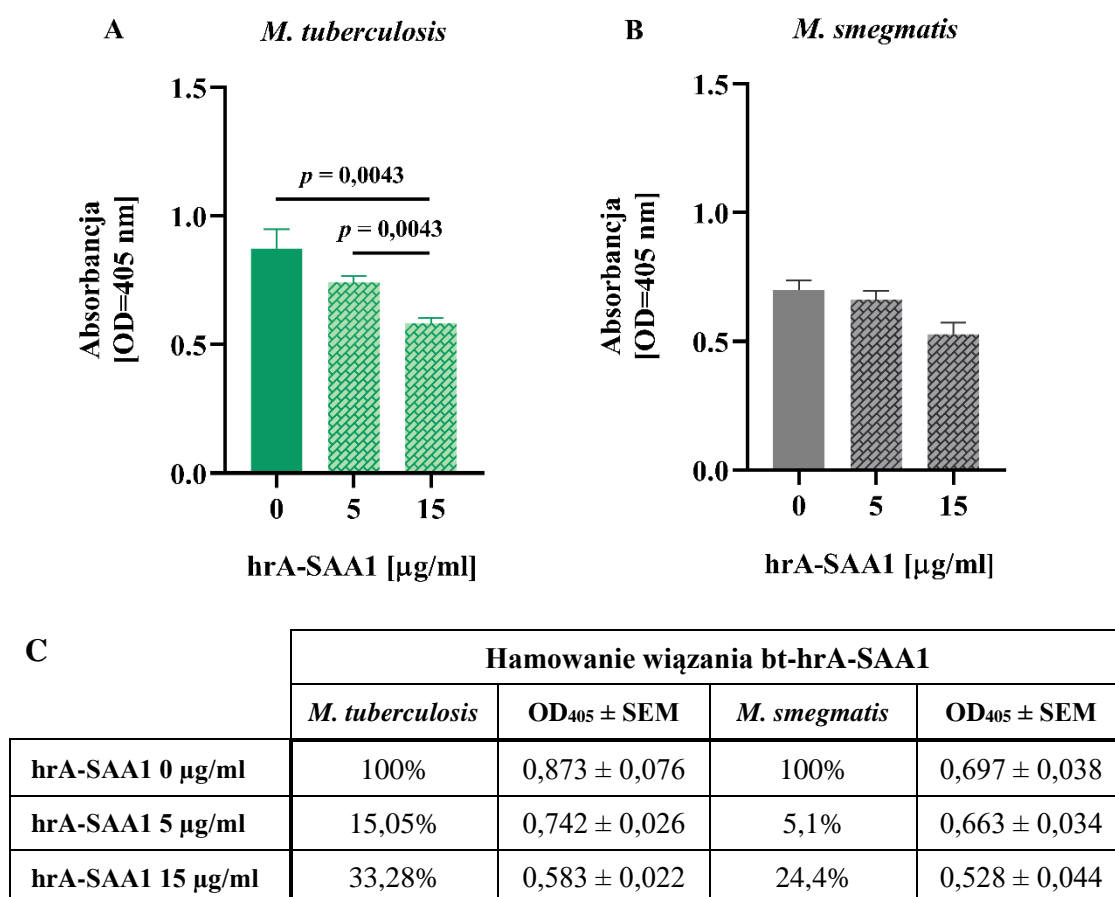
### 5.1.2. Swoistość wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków

Ocenę swoistości wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki prątków *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* przeprowadzono z wykorzystaniem testu kompetycji, polegającego na konkurencyjnym hamowaniu wiązania znakowanego surowiczego amyloidu A w obecność nadmiaru nieznakowanego homologicznego białka. W tym celu żywe komórki prątków inkubowano ze znakowanym biotyną hrA-SAA1, w stężeniu końcowym 5 µg/ml, w obecności jednokrotnego (5 µg/ml) i trzykrotnego (15 µg/ml) nadmiaru nieznakowanego hrA-SAA1, postępując według procedury przedstawionej w podrozdziale 4.2.3.2.

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, iż interakcja z hrA-SAA1 charakteryzuje się swoistością jedynie w przypadku patogennego prątka gruźlicy, co przejawia się znamienym hamowaniem wiązania znakowanego biotyną hrA-SAA1, przy zastosowaniu trzykrotnego (33,28%,  $p=0,0043$ ) nadmiaru nieznakowanego



homologicznego białka ostrej fazy (**Ryc. 12A, 12C**). Ponadto ustalono, iż warunkowane trzykrotnym nadmiarem nieznakowanego hrA-SAA1 nasilenie hamowania wiązania biotynylowanego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* wykazuje istotność statystyczną, nie tylko w porównaniu do próby kontrolnej, ale także do próby badanej, w której zastosowano jednokrotny nadmiar nieznakowanego hrA-SAA1 (15,05%,  $p=0,0043$ ). Natomiast, statystycznie znaczącego hamowania wiązania znakowanego biotyną hrA-SAA1, przez użyte końcowe stężenia nieznakowanego homologicznego białka, nie zaobserwowano w przypadku saprofitycznych prątków *M. smegmatis*, co świadczy o nieswoistym charakterze interakcji tych bakterii z badanym ludzkim białkiem ostrej fazy (**Ryc. 12B, 12C**).



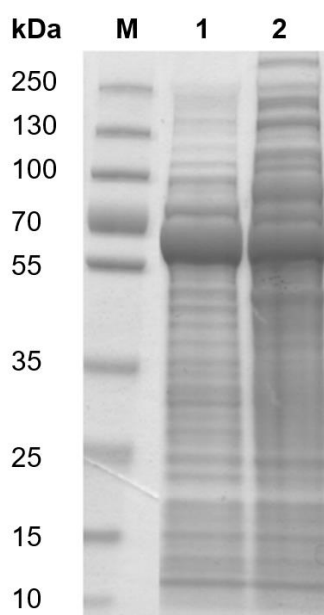
**Ryc. 12.** Hamowanie wiązania znakowanego biotyną hrA-SAA1 (bt-hrA-SAA1) przez żywe komórki *M. tuberculosis* (A) i *M. smegmatis* (B) w obecności jednokrotnego (5 µg/ml) i trzykrotnego (15 µg/ml) nadmiaru nieznakowanego homologicznego białka; SEM – błąd standardowy średniej

## 5.2. HIPOTEZA 2

Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* warunkowane jest przez ligand/ligandy stanowiące komponent/komponenty komórek tego wewnątrzkomórkowego patogenu

### 5.2.1. Izolacja i identyfikacja ligandów *M. tuberculosis* wiążących ludzki rA-SAA1

Poszukiwanie ligandu/ligandów *M. tuberculosis* wiążących hrA-SAA1 rozpoczęto od przygotowania surowego preparatu antygenowego z komórek prątka gruźlicy, wzbogaconego we frakcję białek membranowych, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.2.4.1. Jakość otrzymanego preparatu białkowego oceniano stosując technikę jednokierunkowej elektroforezy SDS-PAGE, w warunkach redukujących (**Ryc. 13**), natomiast stężenie całkowitego białka określano z wykorzystaniem metody Bradford (podrozdział 4.2.5.3) i wynosiło ono 1,7 mg/ml.

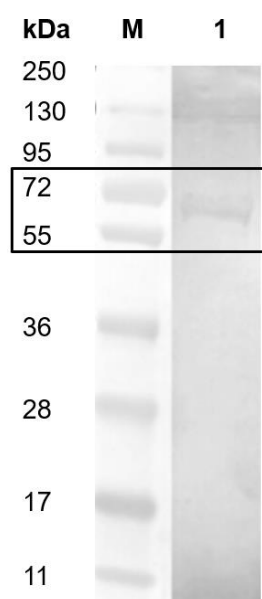


**Ryc. 13.** Wzbogacony we frakcję białek membranowych, surowy preparat antygenowy otrzymany z komórek *M. tuberculosis*, rozdzielony z zastosowaniem jednokierunkowej elektroforezy SDS-PAGE w warunkach redukujących, w 12% poliakrylamidowym żelu; linia 1 – ilość nanoszonego całkowitego białka 30 µg, linia 2 – ilość nanoszonego całkowitego białka 120 µg, M – wzorzec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)

Wzbogacony we frakcję białek membranowych, preparat białkowy z komórek *M. tuberculosis* wykorzystano następnie do wytypowania i izolacji potencjalnych mykobakteryjnych ligandów, zaangażowanych w wiązanie ludzkiego hrA-SAA1,

stosując złożoną metodykę obejmującą jednokierunkowy i dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny typu SDS-PAGE, odpowiednio, w warunkach redukujących, w 12% poliakrylamidowym żelu i w niegradientowym (12%) oraz gradientowym (4-20%) poliakrylamidowym żelu, w powiązaniu z techniką Western blot, według procedury opisanej w podrozdziale 4.2.4.4. Przeniesione na nitrocelulozowe membrany, pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego, elektroforetycznie rozdzielone białka poddano reakcji wiązania ze znakowanym biotyną hrA-SAA1, w stężeniu końcowym 10 µg/ml (jednokierunkowy rozdział elektroforetyczny) lub 5 µg/ml (dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny), (podrozdział 4.2.4.5).

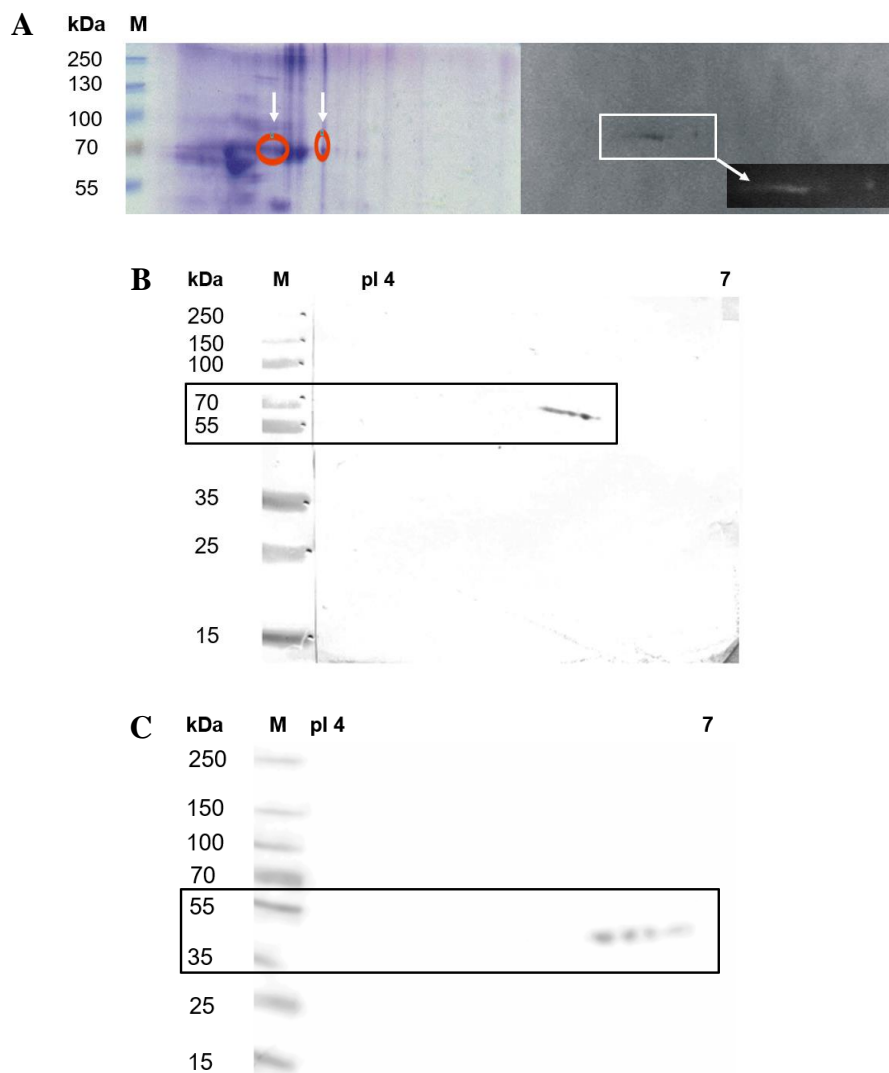
Analiza interakcji hrA-SAA1 z, rozdzielonymi z użyciem jednokierunkowej elektroforezy SDS-PAGE, białkami komórek prątka gruźlicy wykazała, iż badane białko ostrej fazy wiązane jest przez mykobakteryjne białko/białka, których przybliżona masa cząsteczkowa wynosi 70kDa (**Ryc. 14**).



**Ryc. 14.** Wiązanie znakowanego biotyną hrA-SAA (10 µg/ml) przez białko/białka *M. tuberculosis* rozdzielone przy użyciu jednokierunkowego rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE; linia 1 - ilość nanoszonego całkowitego białka 10 µg, M – wzorzec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)

Otrzymane wyniki potwierdziły doświadczenia z użyciem mapy proteomu *M. tuberculosis*, przygotowanej poprzez dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny 125 µg białek komórkowych tego patogenu w obecności nieciągłego gradientu punktu izoelektrycznego, pI 3-10. Badania te wskazały, iż wiązanie hrA-SAA1 przez prątka gruźlicy warunkowane jest potencjalnie przez bakteryjne białko o masie cząsteczkowej

wynoszącej około 70 kDa, występujące w postaci 4 izoform różniących się punktem izoelektrycznym, lub alternatywnie przez 4 różne białka o takiej samej masie cząsteczkowej (**Ryc. 15A**).

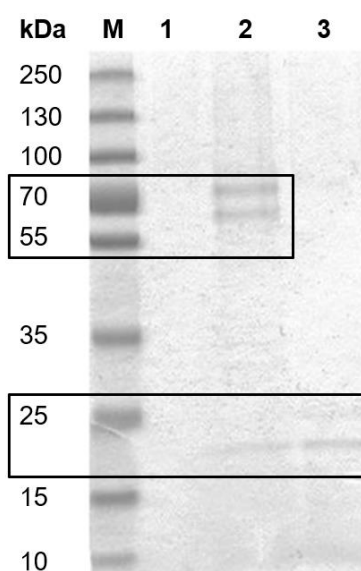


**Ryc. 15.** Wiązanie znakowanego biotyną hrA-SAA1 (5 µg/ml) przez białko/białka *M. tuberculosis* rozdzielone przy użyciu dwukierunkowego rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE: A – w obecności nieciągłego gradientu pI 3-10, w 12% poliakrylamidowym żelu, B – w obecności linearnego gradientu pI 4-7, w niegradientowym 12% poliakrylamidowym żelu, C – w obecności linearnego gradientu pI 4-7, w gradientowym 4-20% poliakrylamidowym żelu; M – wzorzec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)

Oparte o dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny, poszukiwanie ligandu/ligandów prątka gruźlicy zaangażowanych w interakcję z hrA-SAA1 uzupełniono o analizę wiązania białka ostrej fazy przez komponenty proteomu *M. tuberculosis*, rozdzielone z zastosowaniem zawężonego, linearnego gradientu punktu izoelektrycznego, pI 4-7. Doświadczenia te potwierdziły wcześniejsze wyniki, uzyskane

z zastosowaniem mapy proteomu przygotowanej przy użyciu nieciągłego gradientu punktu izoelektrycznego, wskazując jednocześnie, iż masa cząsteczkowa białka/białek prątka gruźlicy potencjalnie wiążących hrA-SAA1 mieści się w zakresie 55-70 kDa (**Ryc. 15B, 15C**).

Do izolacji mykobakteryjnych ligandów wiążących ludzki surowiczy amyloid A zastosowano także wysoce swoistą technikę chromatografii powinowactwa, wykonaną przy użyciu komercyjnego zestawu MicroLink™ Protein Coupling Kit (podrozdział 4.2.4.2). Obecne w eluatach białko/białka prątka gruźlicy, wiążące immobilizowany na agarozowym złożu hrA-SAA1, precypitowano przy użyciu acetonu, rozdzielano z zastosowaniem jednokierunkowego rozdzielania elektroforetycznego SDS-PAGE, w warunkach redukujących, w 12% poliakrylamidowym żelu, a następnie barwiono odczynnikami Imperial™ Protein Stain (Pierce). Analiza profilu przeprowadzonego rozdzielania elektroforetycznego pozwoliła na wytypowanie 3 komponentów białkowych prątka gruźlicy, obecnych przede wszystkim w eluowanych ze złoża agarozowego frakcjach 2. i 3., reprezentujących potencjalne ligandy tego patogenu warunkujące interakcje z hrA-SAA1. Przybliżona masa cząsteczkowa wyselekcjonowanych białek, określona w odniesieniu do zastosowanego w jednokierunkowym rozdzielaniu elektroforetycznym wzorca masy cząsteczkowej białek, wynosiła 70 kDa, 60 kDa i 20 kDa (**Ryc. 16**).



**Ryc. 16.** Białka *M. tuberculosis* wiążące hrA-SAA1, wyselekcjonowane z zastosowaniem techniki chromatografii powinowactwa i jednokierunkowego rozdzielania elektroforetycznego SDS-PAGE, w warunkach redukujących, w 12% poliakrylamidowym żelu; linia 1 – frakcja 1 eluatu, linia 2 – frakcja 2 eluatu, linia 3 – frakcja 3 eluatu, M – wzorzec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)

### 5.2.2. Identyfikacja ligandu/ligandów *M. tuberculosis* wiążących hrA-SAA1

Wytypowane z wykorzystaniem jednokierunkowej i dwukierunkowej elektroforezy w poliakrylamidowych żelach, w połączeniu z techniką Western blot, oraz techniki chromatografii powinowactwa poszczególne białka *M. tuberculosis*, warunkujące potencjalne interakcje tego wewnątrzkomórkowego patogenu z ludzkim surowiczym amyloidem A, identyfikowano komercyjnie metodą tandemowej spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI/MS/MS), w oparciu o określenie mas cząsteczkowych badanych tryptycznych peptydów i ich fragmentów oraz dalsze porównanie z bazami danych sekwencji białkowych przy pomocy programu MASCOT. Wytypowanie potencjalnych ligandów wiążących ludzki hrA-SAA1 oparte było o identyfikację przynajmniej sześciu niezależnych peptydów z sekwencji danego białka w analizowanej próbce. W dalszych badaniach pomijano białka stanowiące potencjalne tło, które identyfikowane są w większości doświadczalnych analiz z wykorzystaniem ESI/MS/MS do identyfikacji białek *M. tuberculosis* (np. opiekuńcze białka groEL, groES, dnaK).

Analiza spektrometryczna wytypowanych mykobakteryjnych białek wykazała obecność sześciu potencjalnych ligandów *M. tuberculosis*, warunkujących interakcje tego patogenu z hrA-SAA1, mianowicie białek Rv1308 (AtpA), Rv2477c (transportowe białko ABC), Rv3881c (wydzielnicze białko EspB), Rv0009 (izomeraza PpiA), Rv2140c (konserwatywne białko TB18.6) oraz Rv0423c (białko ThiC), (**Ryc. 17**). Wszystkie zidentyfikowane ligandy prątką gruźlicy są komponentami wykrywanymi we frakcji białek membranowych komórek tego patogenu [127].

Spośród sześciu potencjalnych ligandów prątką gruźlicy, wiążących ludzki surowiczy amyloid A, przedmiotem dalszych badań przeprowadzonych w pracy doktorskiej były białka Rv1308 i Rv2477c, natomiast pozostałe cztery ligandy są analizowane w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego częścią jest niniejsza praca. Białko Rv1308, którego masa cząsteczkowa wynosi 59,3 kDa, stanowi, będący podjednostką regulatorową, łańcuch  $\alpha$  syntazy ATP – enzymu katalizującego syntezę ATP z ADP w warunkach błonowego gradientu protonów. Z kolei białko Rv2477c, o masie cząsteczkowej 61,9 kDa, pełni funkcję wiążącego ATP transportowego białka typu ABC, zaangażowanego w aktywny błonowy transport związków makrolidowych. Oba powyższe białka wytypowano poprzez

identyfikację więcej niż sześciu niezależnych peptydów, mianowicie 18 oraz 16 peptydów w przypadku, odpowiednio, Rv1308 oraz Rv2477c (Ryc. 17).

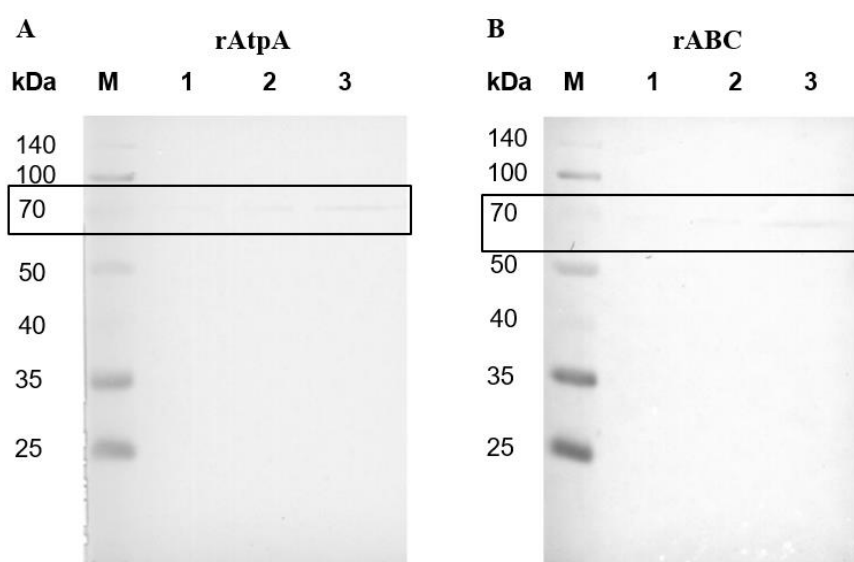
Fasta headers	Proteins	Peptides fa	Peptides mtb	Mol. weight [kDa]	Sequence length	Sequence coverage fa [%]	Sequence coverage fb [%]	Sequence coverage mtb [%]	Intensity fa	Intensity fb	Intensity mtb	Only identified by site	Contaminant
>Rv0384c_cfpB	1			92,535	848			0,9	1,29E+08		1,29E+08		
>Rv1308_atpA	1	18	3	59,288	549	39		6,2	3,60E+08	3,35E+08	2,51E+07		
>Rv1310_atpD	1		1	53,094	486			2,5	3,55E+06		3,55E+06		
>Rv1650_pheT	1		1	88,373	831			1,2	1,04E+05		1,04E+05		
>Rv0440_groEL2	1	13	1	56,726	540	27,4	3,3		1,18E+08	1,18E+08	1,50E+05		
>Rv1133c_metE	1	4	1	81,548	759	6,6	1,3		5,19E+06	5,06E+06	1,31E+05		
>Rv0350_dnaK	1	22		66,83	625	39			3,69E+08	3,69E+08			
>Rv2477c_Rv2477c-ABCtransporter	1	16		61,892	558	32,6			1,72E+08	1,72E+08			
>Rv2455c_Rv2455c	1	15		69,15	653	31,2			1,48E+08	1,48E+08			
Fasta headers	Proteins	Peptides	Sequenc e length	Mol. weight [kDa]	Sequence coverage SAA1 [%]	Sequence coverage SAA2 [%]	Sequence coverage SAA3 [%]	Intensity SAA1	Intensity SAA2	Intensity SAA3			
>Rv0440_groEL2	1	17	540	56,726	44,4	20,9		3,95E+08	1,04E+07				
>Rv3881c_espB	1	10	460	47,593	33			2,50E+07					
>Rv0009_ppiA	1	7	182	19,239	12,6			3,92E+05	1,96E+09				
>Rv2140c_TB18.6	1	6	18,634	176	9,1			2,02E+05	2,01E+08				
>Rv1617_pvKA	1	6	50,667	472	16,1			9,12E+06					
>Rv0423c_thiC	1	6	59,897	547	13			6,36E+06	4,27E+06				
>Rv0957_purH	1	5	55,026	523	20,1			3,01E+07					
>Rv2858c_aldC	1	5	48,258	455	11			2,98E+06					
>Rv3417c_groEL1	1	5	55,877	539	15,4			4,37E+06	3,23E+05				
>Rv3841_bfrB	1	4	20,442	181				28,2					
>Rv3442c_rpsI	1	3	16,436	151				19,2					
>Rv3418c_groES	1	3	10,772	100	15			32	3,60E+05	9,30E+05			
>Rv2831_echA16	1	3	26,63	249				18,5					

Ryc. 17. Identyfikacja ligandów *M. tuberculosis* wiążących hrA-SAA1 z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mas ESI/MS/MS

### 5.2.3. Wiązanie hrA-SAA1 przez białka Rv1308 oraz Rv2477c *M. tuberculosis*

#### 5.2.3.1. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek Rv1308 (rAtpA) i Rv2477c (rABC)

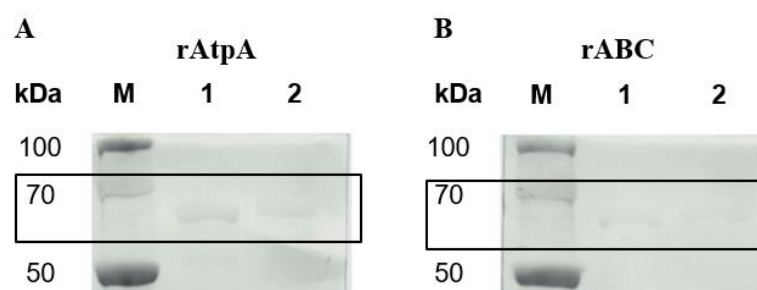
W celu potwierdzenia zdolności białek Rv1308 (AtpA) oraz Rv2447c (ABC) prątka gruźlicy do wiązania hrA-SAA1 przygotowano oczyszczone, rekombinowane formy tych ligandów nadprodukowane w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21 (DE3), zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziałach 4.2.5.1 oraz 4.2.5.2. Zastosowany plazmid pHIS-Parallel1 umożliwił ekspresję białek z dołączoną w części N-końcowej domeną 6-HIS Tag, obejmującą 6 histydyn, co pozwoliło na identyfikację rekombinowanych ligandów przy użyciu techniki Western blot (podrozdział 4.2.5.4) z wykorzystaniem swoistych dla tej domeny monoklonalnych przeciwciał. Otrzymane wyniki potwierdziły zarówno obecność rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy, w otrzymanych, z lizatów, odpowiednio, *E. coli* pHIS/atpA (**Ryc. 18A**) i *E. coli* pHIS/abc (**Ryc. 18B**), eluatach, jak i wysoką czystość przygotowanych preparatów białkowych, oczyszczanych na drodze chromatografii metalopowinowactwa z wykorzystaniem złoża agarozowego wysyconego jonami  $\text{Co}^{2+}$ . Stężenie rekombinowanych białek, w wybranych do wykonania dalszych eksperymentów frakcjach eluatów zawierających białko rAtpA lub rABC, mierzone metodą Bradford (podrozdział 4.2.5.3) wynosiło, odpowiednio, 0,96 mg/ml oraz 1,01 mg/ml.



**Ryc. 18. Rekombinowane białka rAtpA (A) i rABC (B) *M. tuberculosis* identyfikowane przy użyciu techniki Western blot z zastosowaniem mysich, monoklonalnych przeciwciał izotypu IgG1 swoistych dla domeny 6-His Tag; linia 1 – 1  $\mu\text{g}$  białka, linia 2 – 2  $\mu\text{g}$  białka, linia 3 – 5  $\mu\text{g}$  białka, M – wzorec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)**



Zdolność białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy do interakcji hrA-SAA1 oceniano stosując technikę Western blot, której wykonanie opisano w podrozdziale 4.2.5.7. Rozdzielone, z zastosowaniem jednokierunkowej elektroforezy SDS-PAGE, w warunkach redukujących, w 12% poliakrylamidowym żelu, i przeniesione na nitrocelulozowe membrany, rekombinowane mykobakteryjne ligandy poddano reakcji wiązania ze znakowanym biotyną hrA-SAA1 w stężeniu końcowym 10 µg/ml. Analiza otrzymanych wyników, w postaci prążków odpowiadających masom cząsteczkowym badanych białek oraz tworzonym kompleksom ligand-biotynyłowany hrA-SAA1, potwierdziła zdolność zarówno białka rAtpA (**Ryc. 19A**), jak i rABC (**Ryc. 19B**) prątka gruźlicy do wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A.

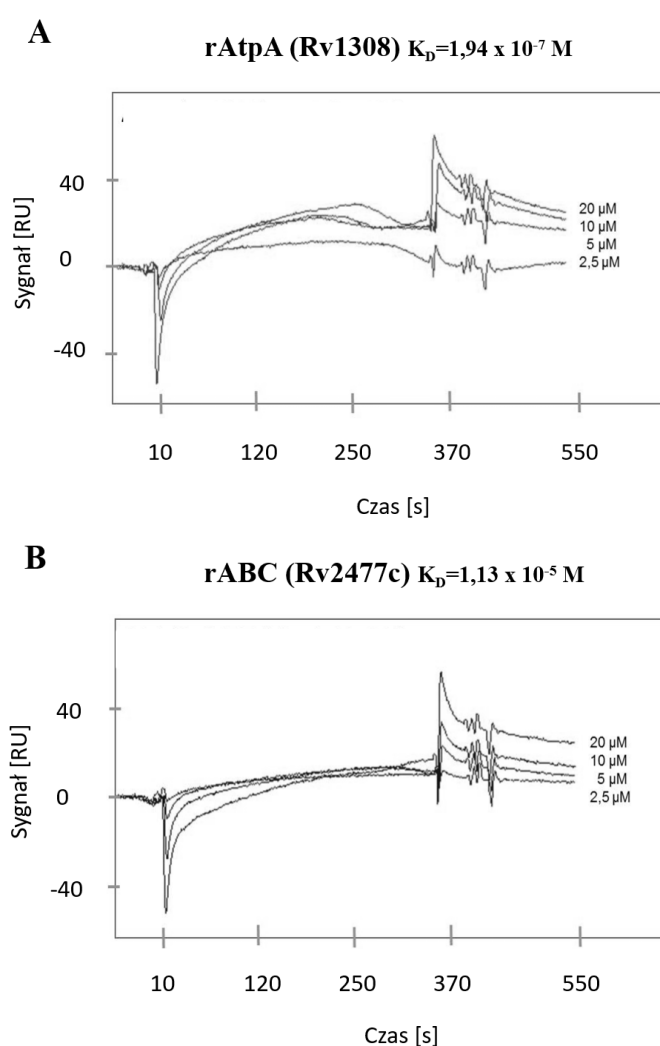


**Ryc. 19. Wiązanie znakowanego biotyną hrA-SAA1 przez rekombinowane białko rAtpA (A) oraz rABC (B) prątka gruźlicy; linia 1 – 2 µg białka, linia 2 – 5 µg białka, M – wzorzec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)**

### 5.2.3.2. Określenie powinowactwa wiązania hrA-SAA1 przez rekombinowane białka rAtpA i rABC

Swoistość interakcji rekombinowanych białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy z ludzkim surowiczym amyloidem A określano poprzez analizę powinowactwa wiązania hrA-SAA1 przez badane mykobakteryjne ligandy z zastosowaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (podrozdział 4.2.5.8). W przeprowadzonych oznaczeniach wykorzystano kowalencyjnie immobilizowany na powierzchni sensora hrA-SAA1, jako docelowy ligand, oraz rozpuszczalne (natywne) formy rekombinowanych białek rAtpA i rABC, jako odrębne anality, które wprowadzono do układu z zachowaniem ich stałego przepływu przez powierzchnię bioczuJNIka, w niezależnych doświadczeniach. Warunkowane różnicami współczynnika załamania promieniowania laserowego, w obecności buforu i analitu, zmiany zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonów, a także parametry kinetyczne, stałe asocjacji ( $K_A$ ) i stałe dysocjacji ( $K_D$ ), badanych

oddziaływań określano stosując komercyjne oprogramowanie Biacore BIAevaluation 3.2. Analiza danych, przedstawionych w postaci sensogramów (**Ryc. 20**) obrazujących kinetykę zachodzących w czasie oddziaływań rekombinowanych białek *M. tuberculosis* z hrA-SAA1, wykazała, iż oba mykobakteryjne ligandy swoiście wiążą badane ludzkie białko ostrej fazy. Ponadto na podstawie otrzymanych wartości stałych dysocjacji, determinujących siłę wiązania białko-białko, stwierdzono, iż interakcja białka rAtpA z hrA-SAA1 ( $K_D=1,94 \times 10^{-7}$  M), (**Ryc. 20A**) charakteryzuje się wyższym powinowactwem w porównaniu do wiązania badanego białka ostrej fazy przez białko rABC ( $K_D=1,13 \times 10^{-5}$  M), (**Ryc. 20B**)



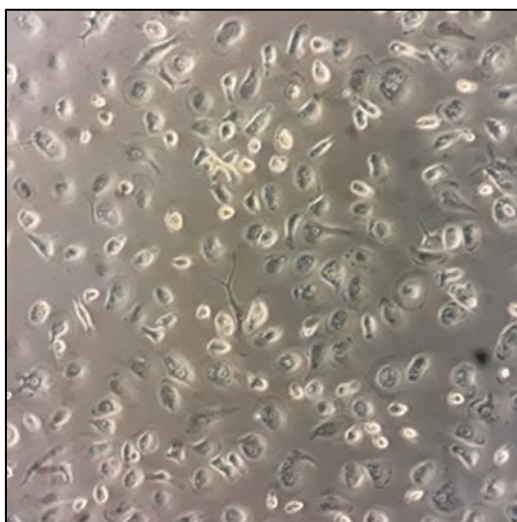
**Ryc. 20. Kinetyka oddziaływań rekombinowanych białek rAtpA (A) i rABC (B) *M. tuberculosis* z hrA-SAA1 określona przy użyciu powierzchniowego rezonansu plazmonowego; końcowe stężenia rekombinowanych białek rAtpA i rABC – 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M oraz 20  $\mu$ M, wartość przepływu analitu – 5  $\mu$ l/min,  $K_D$  – stała dysocjacji, RU – jednostka rezonansowa (1 RU  $\sim$  1 pg związanego białka na  $\text{mm}^2$ ), s – sekunda. Przedstawione w postaci sensogramów A i B kinetyki interakcji białko-białko stanowią średnią wartość otrzymaną w co najmniej trzech niezależnych doświadczeniach dla każdego stężenia analitu**

### 5.3. HIPOTEZA 3

Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* moduluje przebieg wczesnych etapów infekcji ludzkich makrofagów

#### 5.3.1. Wpływ interakcji prątka gruźlicy z hrA-SAA1 na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów

Określenie biologicznej roli interakcji prątka gruźlicy z hrA-SAA1 w przebiegu wczesnych etapów infekcji komórek docelowych przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkich makrofagów różnicowanych z monocytów krwi obwodowej (**Ryc. 21**), które izolowane były z komercyjnych kożuszków leukocyarno-płytkowych, zgodnie z procedurami opisanymi w podrozdziale 4.2.7. Czystość otrzymywanych zawiesin komórkowych, oceniana na podstawie cech morfologicznych, wynosiła nie mniej niż 80%. Wyróżnicowane makrofagi pochodzenia monocytarnego zakażano prątkiem gruźlicy szczepu H37Rv, po wcześniejszej inkubacji bakterii z hrA-SAA1, w stężeniach końcowych odpowiadających fizjologicznemu i 5-krotnie podwyższonemu stężeniu badanego białka ostrej fazy. Liczbę jednostek koloniotwórczych (CFU) prątka gruźlicy określano według procedur opisanych w podrozdziale 4.2.8. Próby kontrolne stanowiły makrofagi zakażane tym samym, ale nieopłaszczonym hrA-SAA1, szczepem prątka gruźlicy.



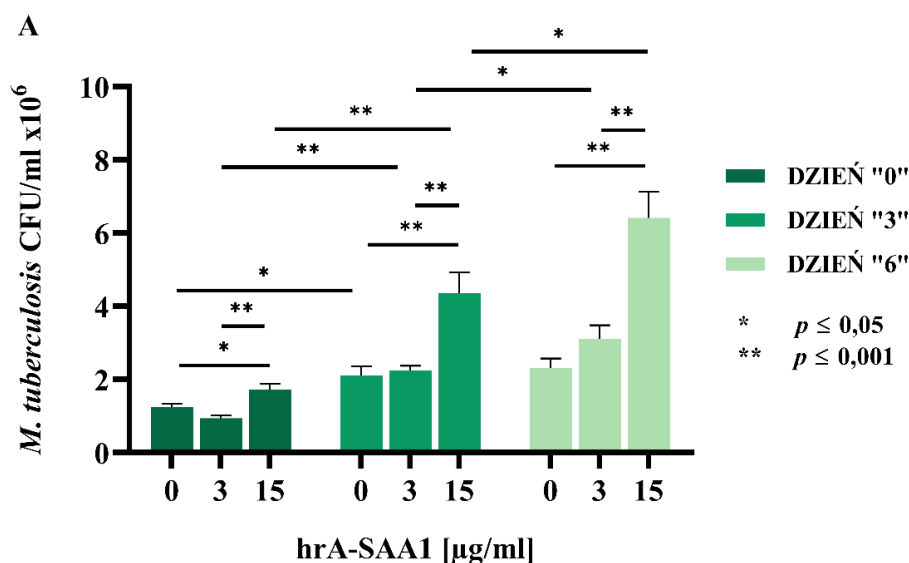
**Ryc. 21.** Wyróżnicowane ludzkie makrofagi pochodzenia monocytarnego, izolowane z kożuszka leukocyarno-płytkowego; zdjęcie własne (100x)

### 5.3.2. Analiza wpływu wiązania hrA-SAA1 przez prątką gruźlicy na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów

Wpływ wiązania hrA-SAA1 przez *M. tuberculosis* na proces wnikania tego patogenu do ludzkich makrofagów, a także wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania prątką gruźlicy, określano wykorzystując do opsonizacji bakterii zarówno fizjologiczne (3 µg/ml), jak i 5-krotnie podwyższone (15 µg/ml) stężenie badanego ludzkiego białka ostrej fazy. Liczbę wnikających, nieopłaszczonych i opłaszczonych hrA-SAA1, komórek prątką gruźlicy określano bezpośrednio w dniu przeprowadzenia testu fagocytozy (dzień 0), natomiast wewnątrzkomórkowy wzrost i przeżywanie bakterii oceniano po 72 (dzień 3) i 144 (dzień 6) godzinach.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, iż interakcja prątką gruźlicy z hrA-SAA1 w stężeniu końcowym 3 µg/ml, odpowiadającym średniemu fizjologicznemu, osobniczemu stężeniu tego białka ostrej fazy, nie przyczynia się do statystycznie znamiennych zmian zarówno we wnikaniu do (dzień 0), jak i wewnątrzkomórkowym namnażaniu oraz przeżywaniu (dzień 3, dzień 6) tego patogenu w ludzkich makrofagach (**Ryc. 22A**). Natomiast, istotne zmiany w liczbie wnikających oraz wewnątrzkomórkowo namnażających się i przeżywających komórek bakterii zanotowano dla prątką gruźlicy opłaszczanego 5-krotnie wyższym od fizjologicznego, 15 µg/ml, stężeniem hrA-SAA1. Poprzedzająca zakażenie ludzkich makrofagów, inkubacja *M. tuberculosis* z 5-krotnie podwyższonym stężeniem hrA-SAA1, spowodowała nasilenie wnikania (dzień 0) tych bakterii do badanych docelowych fagocytów, a zaobserwowane zmiany były znamienne nie tylko w porównaniu do próby kontrolnej ( $Mtb_K/Mtb_{SAA(15)}$   $1,24 \times 10^6$  CFU/ml /  $1,73 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,002$ ), którą stanowił prątek gruźlicy nieopłaszczony badanym białkiem ostrej fazy, ale także w porównaniu do prątką gruźlicy poddawanego interakcji z fizjologicznym stężeniem hrA-SAA1 ( $Mtb_{SAA(3)}/Mtb_{SAA(15)}$   $0,94 \times 10^6$  CFU/ml /  $1,73 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ), (**Ryc. 22A, 22B**). Ponadto opsonizacja prątką gruźlicy hrA-SAA1 w stężeniu końcowym 15 µg/ml przyczyniła się do istotnego zwiększenia intensywności jego wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania w ludzkich makrofagach, w porównaniu do nieopłaszczonych hrA-SAA1 bakterii prób kontrolnych, co przejawiało się 2-krotnym ( $Mtb_K/Mtb_{SAA(15)}$   $2,11 \times 10^6$  CFU/ml /  $4,35 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ) oraz prawie 3-krotnym ( $Mtb_K/Mtb_{SAA(15)}$   $2,32 \times 10^6$  CFU/ml /  $6,41 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ) wzrostem liczby komórek prątką gruźlicy

zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo w ludzkich makrofagach, odpowiednio, po 3 oraz 6 dniach hodowli. Oprócz znamienych różnic w porównaniu do bakterii prób kontrolnych, warunkowane interakcją prątka gruźlicy z 5-krotnie podwyższonym stężeniem hrA-SAA1 nasilenie wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania tego patogenu w badanych fagocytach charakteryzowało się także statystyczną istotnością w porównaniu do odpowiadających zdolności prątka gruźlicy opłaszczanego fizjologicznym stężeniem hrA-SAA1 (dzień 3:  $Mtb_{SAA(3)}/Mtb_{SAA(15)}$   $2,24 \times 10^6$  CFU/ml /  $4,35 \times 10^6$  CFU/ml,  $p < 0,001$ ; dzień 6:  $Mtb_{SAA(3)}/Mtb_{SAA(15)}$   $3,11 \times 10^6$  CFU/ml /  $6,41 \times 10^6$  CFU/ml,  $p < 0,001$ ).



**B**

	DZIEŃ (h)	hrA-SAA1		
		0 µg/ml	3 µg/ml	15 µg/ml
<i>M. tuberculosis</i> CFU/ml x10 <sup>6</sup> ± SEM	0 (0)	1,24 ± 0,093	0,94 ± 0,084	1,73 ± 0,151
	3 (72)	2,11 ± 0,240	2,24 ± 0,132	4,35 ± 0,576
	6 (144)	2,32 ± 0,255	3,11 ± 0,364	6,41 ± 0,724

**Ryc. 22.** Wpływ interakcji *M. tuberculosis* z fizjologicznym (3 µg/ml) i 5-krotnie podwyższonym (15 µg/ml) stężeniem hrA-SAA1 na procesy wnikania oraz wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania patogenu w ludzkich makrofagach; CFU – liczba jednostek koloniotwórczych, h – liczba godzin, SEM – błąd standardowy średniej

Dodatkowo, zarówno *M. tuberculosis* poddawany, poprzedzającej zakażenie ludzkich makrofagów, interakcji z 5-krotnie podwyższonym, jak i z fizjologicznym stężeniem ludzkiego surowiczego amyloidu A charakteryzował się nasileniem procesów wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania w zależności od czasu trwania zakażenia,

przejawiającym się znamionym wzrostem liczby wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych komórek bakterii w kolejnych, monitorowanych dniach hodowli (dzień 0 / dzień 3: *Mtb*<sub>SAA(3)</sub> 0,94x10<sup>6</sup> CFU/ml / 2,24x10<sup>6</sup> CFU/ml,  $p < 0,001$ ; *Mtb*<sub>SAA(15)</sub> 1,73x10<sup>6</sup> CFU/ml / 4,35x10<sup>6</sup> CFU/ml,  $p < 0,001$ ; dzień 3 / dzień 6: *Mtb*<sub>SAA(3)</sub> 2,24x10<sup>6</sup> CFU/ml / 3,11x10<sup>6</sup> CFU/ml,  $p = 0,016$ ; *Mtb*<sub>SAA(15)</sub> 4,35x10<sup>6</sup> CFU/ml / 6,41x10<sup>6</sup> CFU/ml,  $p = 0,009$ ). Natomiast, w przypadku prątka gruźlicy nieopłaszczanego hrA-SAA1 statystycznie istotny wzrost liczby wewnątrzkomórkowo namnażających się bakterii zaobserwowano jedynie w czasie pierwszych 3 dni od momentu zakażenia ludzkich makrofagów (dzień 0 / dzień 3: *Mtb*<sub>K</sub> 1,24x10<sup>6</sup> CFU/ml / 2,11x10<sup>6</sup> CFU/ml,  $p = 0,003$ ), (**Ryc. 22A, 22B**).

### 5.3.3. Analiza modulującego wpływu wiązania hrA-SAA1 na proces adhezji prątka gruźlicy do ludzkich makrofagów

Wpływ wiązania hrA-SAA1 przez prątka gruźlicy na proces adhezji tego wewnątrzkomórkowego patogenu do ludzkich makrofagów oceniano poprzez określenie i porównanie liczby, zewnątrzkomórkowo zlokalizowanych, przylegających do błony komórkowej fagocytów, nieopłaszczonych i opłaszczonych hrA-SAA1, komórek bakterii. Doświadczenia te przeprowadzono dla prątka gruźlicy po wcześniejszej interakcji z 5-krotnie podwyższonym stężeniem surowiczego amyloidu A, które znamionie modulowało proces wnikania tego patogenu do docelowych fagocytów. Liczbę przylegających komórek prątków wyliczano jako różnicę pomiędzy średnią wartością ogólnej liczby CFU/ml bakterii, uzyskaną z zakażonych makrofagów bezpośrednio po trwającej 2 godziny fagocytozie (przylegające i wewnątrzkomórkowo zlokalizowane komórki prątka gruźlicy) a średnią wartością liczby CFU/ml bakterii po dodatkowej inkubacji z gentamycyną (1 mg/ml), (wewnątrzkomórkowo zlokalizowane komórki prąta gruźlicy). Otrzymane wyniki przedstawiono jako procentową wartość przylegających komórek prątka gruźlicy stanowiącą średnią odpowiadających procentowych wartości określanych dla indywidualnych osobników (dawców makrofagów), obliczanych według wzoru:

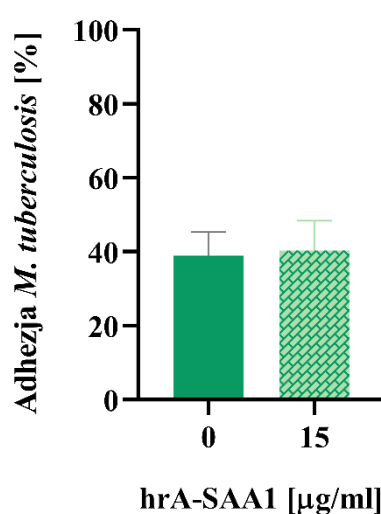
$$xP\% = \frac{(xK - xG)}{xK} \times 100\%$$

$xP\%$  – procent przylegających komórek prątka gruźlicy

$xK$  – liczba CFU/ml prątka gruźlicy bezpośrednio po fagocytozie

$xG$  – liczba CFU/ml prętka gruźlicy po dodatkowej inkubacji z gentamycyną

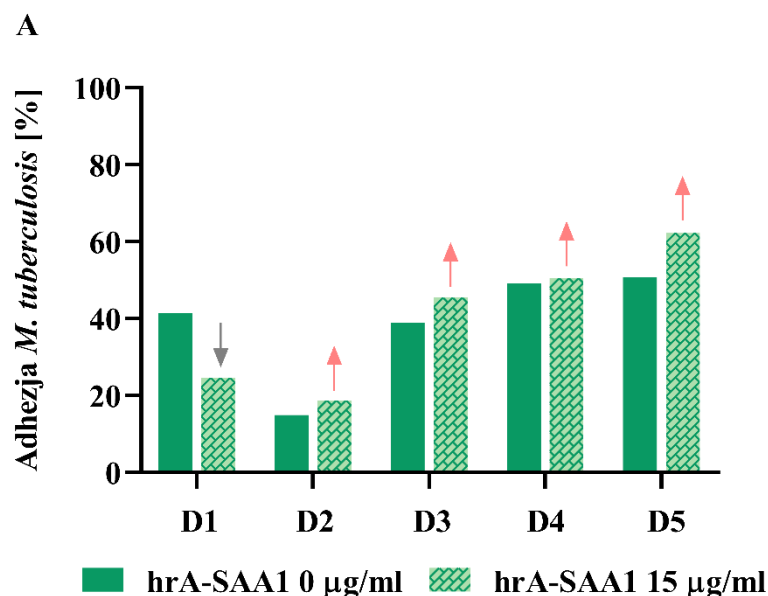
Analiza średnich wartości procentowych liczby komórek prętka gruźlicy przylegających do ludzkich makrofagów, określona na podstawie pięciu niezależnych doświadczeń z wykorzystaniem fagocytów pochodzących od pięciu osobników, wykazała, iż opsonizacja komórek prętka gruźlicy hrA-SAA1, w stężeniu końcowym 5-krotnie wyższym od średniego fizjologicznego stężenia osobniczego (15  $\mu\text{g/ml}$ ), nie przyczynia się do istotnych zmian w procesie adhezji tego patogenu do ludzkich makrofagów (**Ryc. 23**)



**Ryc. 23.** Wpływ wiązania hrA-SAA1 (15  $\mu\text{g/ml}$ ) na proces adhezji *M. tuberculosis* do ludzkich makrofagów

Jednocześnie, w oparciu o wyniki otrzymane dla poszczególnych dawców komórek fagocytów, stwierdzono, iż wpływ opsonizacji *M. tuberculosis* przez hrA-SAA1 na proces przylegania bakterii do badanych docelowych komórek wykazuje duże zróżnicowanie osobnicze (**Ryc. 24B**) i nie zawsze ma charakter pozytywnej modulacji. Nasiloną adhezję opsonizowanych hrA-SAA1 komórek prętka gruźlicy do powierzchni ludzkich makrofagów, w porównaniu do nieopsonizowanych bakterii, odnotowano w przypadku fagocytów izolowanych od osobników D2 (odpowiednio, 14,91% i 18,69%), D3 (odpowiednio, 38,77% i 45,34%), D4 (odpowiednio, 49,13% i 50,48%) oraz D5 (odpowiednio, 50,63% i 62,19%). Natomiast, w przypadku jednego dawcy, oznaczonego jako D1, zaobserwowano zupełnie odwrotną zależność pomiędzy wiązaniem hrA-SAA1 przez prętka gruźlicy a adhezją tego patogenu do docelowych

makrofagów, charakteryzującą się 16,95% spadkiem liczby przylegających komórek bakterii (Ryc. 24A, 24B).



B

hrA-SAA1	Adhezyja <i>M. tuberculosis</i> [%]	
	0 µg/ml	15 µg/ml
D1	41,46	24,51
D2	14,91	18,69
D3	38,77	45,34
D4	49,13	50,48
D5	50,63	62,19

Ryc. 24. Adhezja nieopłaszczonych (0 µg/ml) i opłaszczonych (15 µg/ml) komórek *M. tuberculosis* do ludzkich makrofagów; D1-D5 – dawcy ludzkich makrofagów

#### 5.3.4. Ocena zaangażowania białek AtpA i ABC *M. tuberculosis*, wiążących hrA-SAA1, we wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów

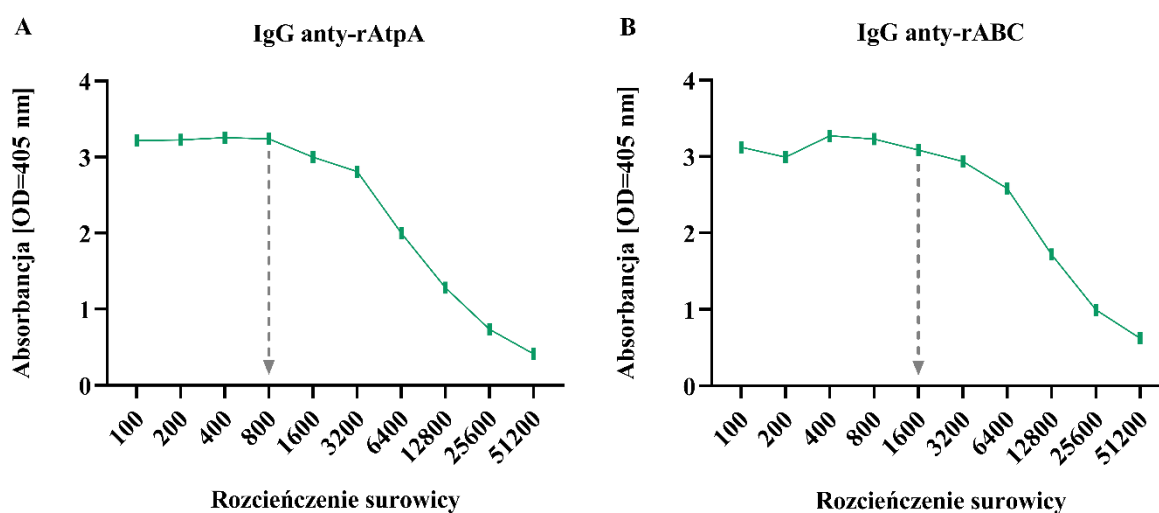
Ocenę zaangażowania, wiążących ludzki A-SAA1, białek AtpA i ABC prętka gruźlicy w proces wnikania tego patogenu oraz jego wewnątrzkomórkowego namnażania i przeżywania w ludzkich makrofagach wykonano stosując szczepy mutanty, odpowiednio, *MtbAtpA*<sup>↑</sup> i *MtbABC*<sup>↑</sup>, nadprodukujące docelowe białko. Wykorzystane rekombinowane szczepy *M. tuberculosis* zostały przygotowane w ramach współpracy z dr hab. Anną Brzostek z Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu



Biologii Medycznej PAN w Łodzi (podrozdział 4.2.6). Doświadczenia te przeprowadzono zarówno dla bakterii nieopłaszczonych hrA-SAA1, jak i po ich wcześniejszej interakcji z 5-krotnie podwyższonym stężeniem surowiczego amyloidu A, które znamienne modulowało proces wnikania tego patogenu do docelowych fagocytów.

#### 5.3.4.1. Przygotowanie i określenie optymalnego miana króliczych, poliklonalnych przeciwciał swoistych dla białek rAtpA i rABC prątka gruźlicy

Źródłem poliklonalnych immunoglobulin IgG swoistych dla białek AtpA i ABC prątka gruźlicy były przygotowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej surowice odpornościowe otrzymane z krwi obwodowej królików rasy Białej Nowozelandzkiej immunizowanych rekombinowanym białkiem rAtpA i rABC, według procedury przedstawionej w podrozdziale 4.2.5.5.

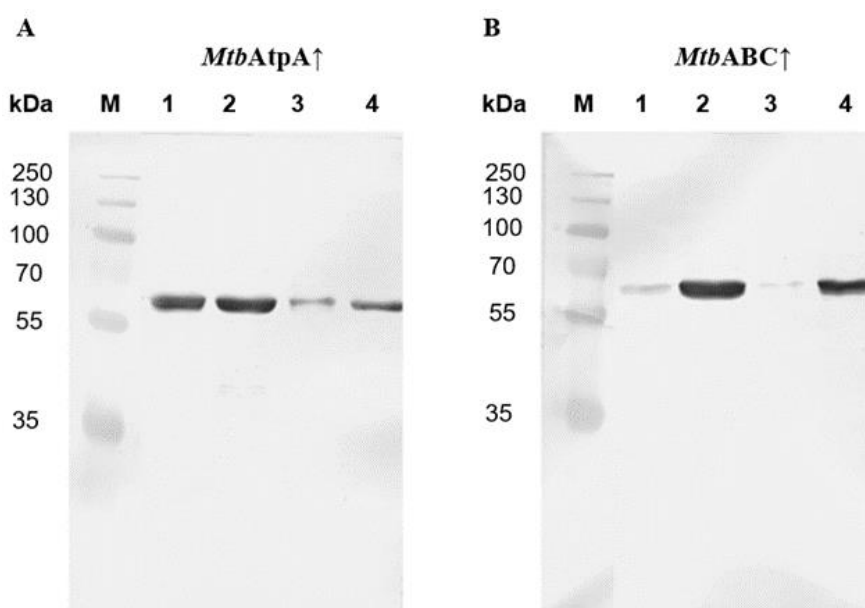


Ryc. 25. Optymalne miana poliklonalnych króliczych immunoglobulin klasy IgG swoistych dla białka rAtpA (A) i rABC (B) prątka gruźlicy

Optymalne doświadczalne miana przeciwciał o swoistości anty-AtpA i anty-ABC wyznaczono poprzez ich miareczkowanie z wykorzystaniem pośredniego testu immunoenzymatycznego ELISA i odpowiadających rekombinowanych antygenów (podrozdział 4.2.5.6). Zastosowany kalendarz szczepień zwierząt laboratoryjnych pozwolił na uzyskanie poliklonalnych surowic odpornościowych, dla których ustalone, optymalne rozcieńczenia przeciwciał do wykonania dalszych oznaczeń z wykorzystaniem technik immunoenzymatycznych wynosiły 1:800 i 1:1 600, odpowiednio, dla immunoglobulin klasy IgG swoistych dla białka AtpA (Ryc. 25A) i ABC (Ryc. 25B).

### 5.3.4.2. Potwierdzenie nadprodukcji białka AtpA oraz ABC przez rekombinowane szczepy *M. tuberculosis*

Nadprodukcję, wiążących ludzki surowicy amyloid A, ligandów AtpA i ABC prątka gruźlicy przez szczepy mutanty, odpowiednio, *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ potwierdzono z wykorzystaniem techniki Western blot oraz przygotowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, swoistych króliczych, poliklonalnych surowic odpornościowych (podrozdział 4.2.6.1).



**Ryc. 26.** Nadprodukcja białek AtpA (A) i ABC (B) przez szczepy mutanty *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ prątka gruźlicy; linie 1 i 3 – 10 µg i 5 µg całkowitego białka szczepu wyjściowego H37Rv, linie 2 i 4 – 10 µg i 5 µg całkowitego białka szczepu mutanta *MtbAtpA*↑ (A) i *MtbABC*↑ (B), M – wzorzec masy cząsteczkowej białek (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)

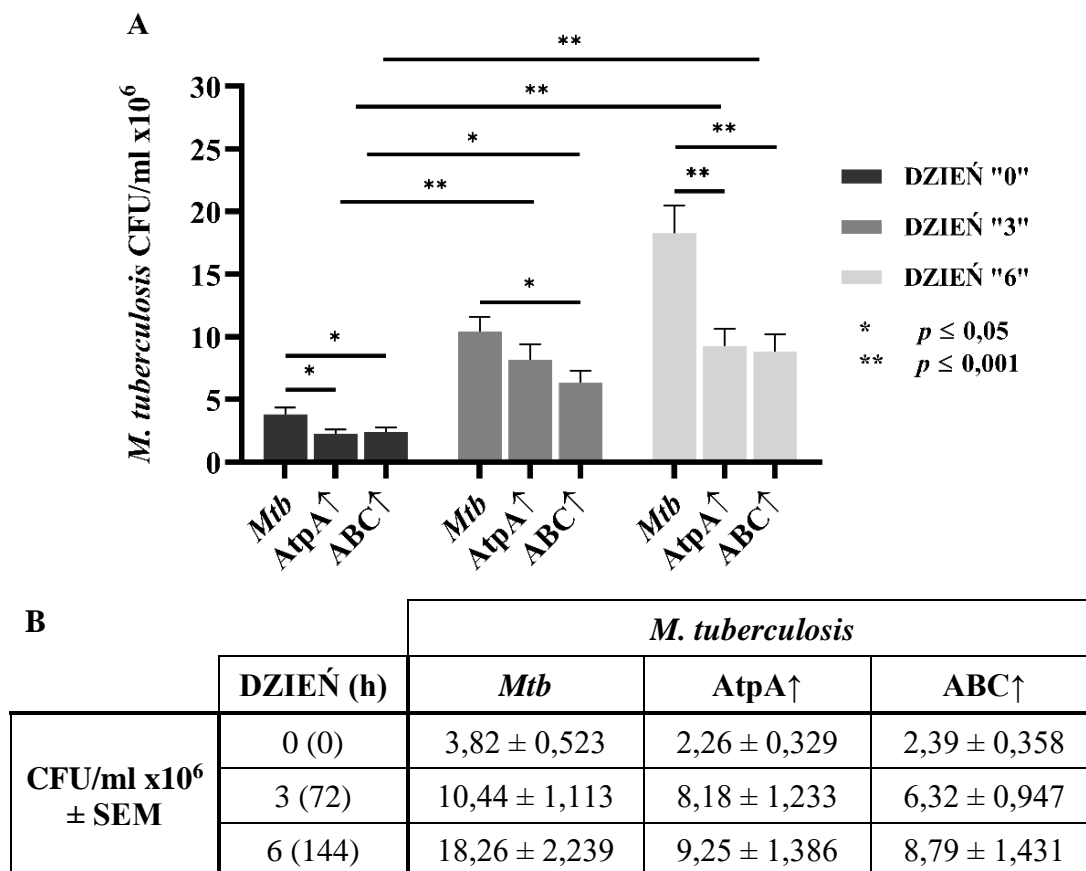
Wstępnym etapem tych doświadczeń było przygotowanie surowych preparatów białkowych zarówno z komórek wyjściowego, kontrolnego szczepu prątka gruźlicy H37Rv, jak i szczepów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑. Stężenia całkowitego białka w uzyskanych preparatach wyznaczono metodą Bradford (podrozdział 4.2.5.3) i wynosiły one, odpowiednio, 0,98 mg/ml, 1,17 mg/ml i 0,96 mg/ml. Analiza otrzymanych wyników wykazała, iż szczepy mutanty *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ charakteryzują się, odpowiednio, nadprodukcją białka AtpA (**Ryc. 26A**) i ABC (**Ryc. 26B**). Wskazuje na to wyższa intensywność prążków, odpowiadających, rozpoznawanym przez swoiste królicze immunoglobuliny klasy IgG, badanym białkom

prątka gruźlicy, uzyskana dla surowych preparatów antygenowych szczepów mutantów w porównaniu do niezmienionego genetycznie szczepu wyjściowego.

#### **5.3.4.3. Wpływ nadprodukcji białek AtpA i ABC na procesy wnikania, wewnątrzkomórkowego namnażania i przeżywania prątka gruźlicy w ludzkich makrofagach**

Zaangażowanie, wiążących ludzki surowiczy amyloid A, białek AtpA i ABC prątka gruźlicy w procesy wnikania oraz wewnątrzkomórkowego namnażania i przeżywania tego patogenu w ludzkich makrofagach badano poprzez porównanie liczby wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych komórek szczepów mutantów, mianowicie *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑, z odpowiadającą liczbą komórek bakterii wyjściowego szczepu H37Rv, odpowiednio, bezpośrednio w dniu przeprowadzania testu fagocytozy (dzień 0) oraz po 72 (dzień 3) i 144 (dzień 6) godzinach od infekcji fagocytów. Analiza otrzymanych wyników wykazała, iż, niespodziewanie w stosunku do wstępnych założeń, nadprodukcji zarówno białka AtpA, jak i ABC towarzyszy znamienne osłabione wnikanie (dzień 0) szczepów mutantów, odpowiednio, *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑, do ludzkich makrofagów w porównaniu do wnikania do docelowych komórek kontrolnego szczepu H37Rv (*MtbAtpA*↑/*Mtb*  $2,26 \times 10^6$  CFU/ml /  $3,82 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,018$ ; *MtbABC*↑/*Mtb*  $2,39 \times 10^6$  CFU/ml /  $3,82 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,014$ ), (**Ryc. 27A, 27B**). Efekt ten przyczynił się do istotnego obniżenia liczby wewnątrzkomórkowego namnażających się rekombinowanych prątków, co zanotowane zostało jako znamienne niższa liczba zlokalizowanych wewnątrz fagocytów komórek szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ (dzień 6) i *MtbABC*↑ (dzień 3 i 6) w porównaniu do liczby wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych prątków szczepu wyjściowego (dzień 3: *MtbABC*↑/*Mtb*  $6,32 \times 10^6$  CFU/ml /  $10,44 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,025$ ; dzień 6: *MtbAtpA*↑/*Mtb*  $9,25 \times 10^6$  CFU/ml /  $18,26 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ; *MtbABC*↑/*Mtb*  $8,79 \times 10^6$  CFU/ml /  $18,26 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ). Natomiast, podobnie do bakterii kontrolnych, rekombinowane szczepy prątka gruźlicy charakteryzowały się statystycznie znamienym wewnątrzkomórkowym wzrostem i przeżywaniem w trakcie kolejnych dni infekcji ludzkich makrofagów (dzień 0 / dzień 3: *MtbAtpA*↑,  $p<0,001$ ; *MtbABC*↑,  $p=0,005$ ; dzień 0 / dzień 6: *MtbAtpA*↑,  $p<0,001$ ; *MtbABC*↑,  $p<0,001$ ). Jednakże, w przeciwieństwie do wyjściowego szczepu H37Rv, nie zaobserwowano istotnych różnic w liczbie wewnątrzkomórkowo

zlokalizowanych komórek szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ pomiędzy 3 i 6 dniem hodowli.

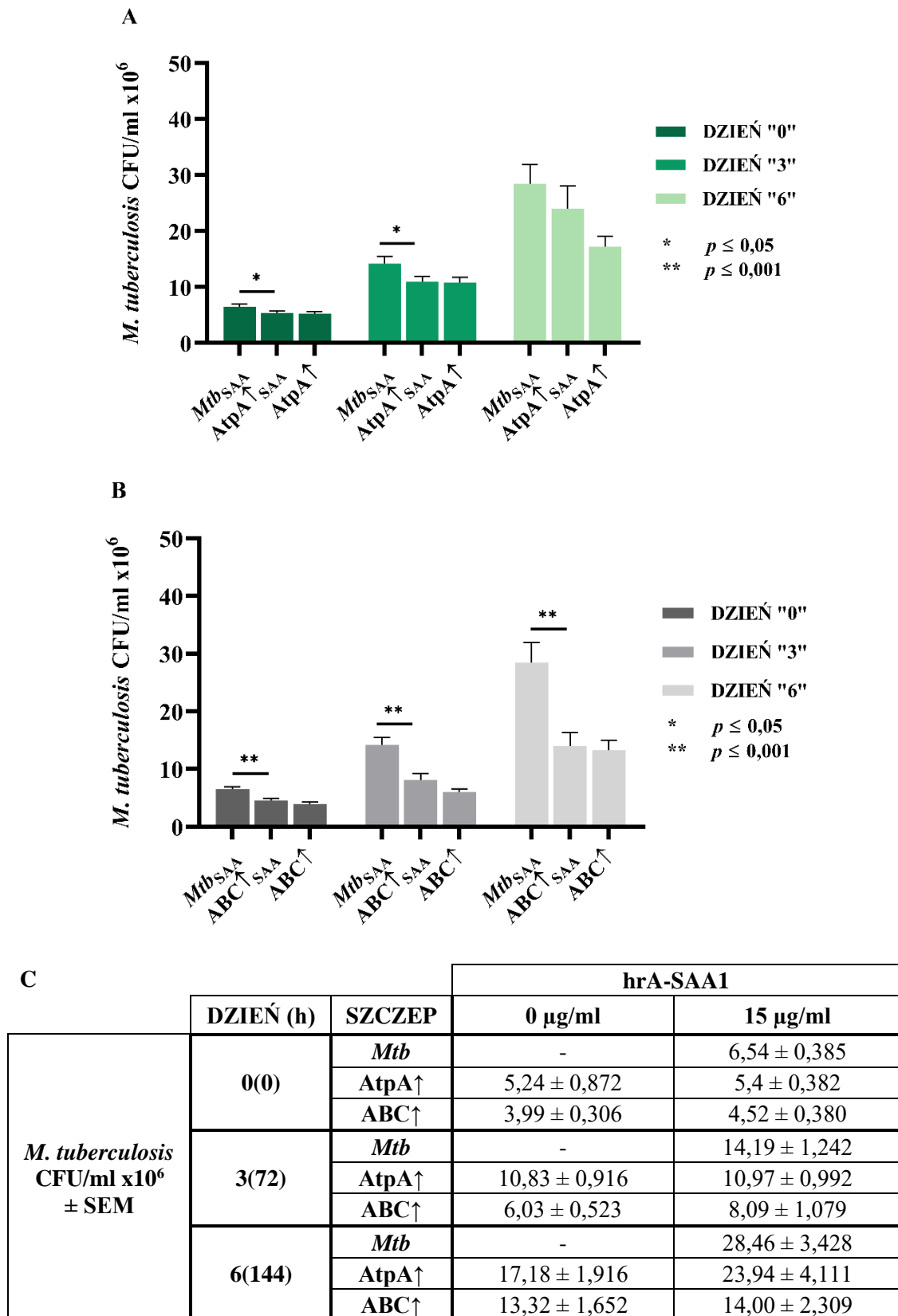


Ryc. 27. Wnikanie (dzień 0) oraz wewnątrzkomórkowy wzrost i przeżywanie (dzień 3 i 6) szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ (*AtpA*↑) i *MtbABC*↑ (*ABC*↑) w ludzkich makrofagach, w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv prątku gruźlicy (*Mtb*); CFU – liczba jednostek koloniotwórczych, h – liczba godzin, SEM – błąd standardowy średniej

#### 5.3.4.4. Wpływ interakcji z hrA-SAA1 na procesy wnikania, wewnątrzkomórkowego namnażania i przeżywania szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ prątku gruźlicy

Pomimo zaobserwowanego osłabionego wnikania, a także wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania w ludzkich makrofagach szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ prątku gruźlicy, charakteryzujących się nadprodukcją białek wiążących ludzki surowiczy amyloid A, postanowiono ocenić wpływ ich interakcji z badanym białkiem ostrej fazy na oceniane etapy infekcji docelowych fagocytów. W doświadczeniach tych szczepy wyjściowy H37Rv i mutanty *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ prątku gruźlicy inkubowano wstępnie z hrA-SAA1 o stężeniu końcowym 15 µg/ml, a liczbę wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych komórek bakteryjnych oceniano poprzez

określenie liczby CFU/ml. Analiza otrzymanych wyników wykazała, iż w porównaniu do odpowiadającego szczepu wyjściowego H37Rv prątka gruźlicy, wiązanie hrA-SAA1 nasila o 23,4% wnikanie do ludzkich makrofagów szczepu mutantu nadprodukującego białko AtpA (dzień 0:  $MtbAtpA\uparrow/Mtb$  59,2%;  $MtbAtpA\uparrow_{SAA}/Mtb_{SAA}$  82,6%), natomiast efekt ten jest nieznaczny (5,8%) w przypadku szczepu mutantu  $MtbABC\uparrow$  (dzień 0:  $MtbABC\uparrow/Mtb$  63,3%;  $MtbABC\uparrow_{SAA}/Mtb_{SAA}$  69,1%), charakteryzującego się nadprodukcją białka ABC. Jednakże, mimo zanotowanego wyraźnego, pozytywnego wpływu interakcji hrA-SAA1 na proces infekcji docelowych komórek przez prątka gruźlicy  $MtbAtpA\uparrow$ , stwierdzone różnice pomiędzy liczbami wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych bakterii tego szczepu mutantu, poddawanych i niepoddawanych wstępnej interakcji z białkiem ostrej fazy, nie wykazały istotności statystycznej. Również nieznaczne okazały się różnice we wnikaniu do ludzkich makrofagów, opłaszczonych hrA-SAA1, komórek badanych mutantów (dzień 0:  $MtbAtpA\uparrow_{SAA}/MtbABC\uparrow_{SAA}$   $5,4 \times 10^6$  CFU/ml /  $4,52 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,064$ ), (**Ryc. 28A, 28B**). Natomiast, analogicznie do szczepów mutantów niepoddawanych interakcji z hrA-SAA1, obserwowano istotnie osłabione wnikanie do ludzkich makrofagów, opłaszczonych ludzkim surowiczym amyloidem A, komórek zarówno mutantu  $MtbAtpA\uparrow$ , jak i  $MtbABC\uparrow$ , w porównaniu do poziomu infekcji docelowych fagocytów przez, poddawany wstępnej interakcji z hrA-SAA1, wyjściowy szczep prątka gruźlicy (dzień 0:  $MtbAtpA\uparrow_{SAA}/Mtb_{SAA}$   $5,4 \times 10^6$  CFU/ml /  $6,54 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,024$ ;  $MtbABC\uparrow_{SAA}/Mtb_{SAA}$   $4,52 \times 10^6$  CFU/ml /  $6,54 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,001$ ), (**Ryc. 28C**).



Ryc. 28. Wpływ interakcji z hrA-SAA1 (15 µg/ml) na procesy wnikania (dzień 0) oraz wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania (dzień 3 i 6) szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ (*AtpA*↑) i *MtbABC*↑ (*ABC*↑) w ludzkich makrofagach, w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv prątka gruźlicy (*Mtb*); CFU – liczba jednostek koloniotwórczych, h – liczba godzin, SEM – błąd standardowy średniej

Konsekwencją istotnie obniżonej liczby wnikających do ludzkich makrofagów komórek szczepów mutantów był znamienne niższy poziom ich wewnątrzkomórkowego wzrostu i liczby wewnątrzkomórkowo przeżywających bakterii, w porównaniu do wyjściowego szczepu kontrolnego (dzień 3: *MtbAtpA* $\uparrow$ <sub>SAA</sub>/*Mtb*<sub>SAA</sub>  $10,97 \times 10^6$  CFU/ml /  $14,19 \times 10^6$  CFU/ml,  $p=0,045$ ; *MtbABC* $\uparrow$ <sub>SAA</sub>/*Mtb*<sub>SAA</sub>  $8,09 \times 10^6$  CFU/ml /  $14,19 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ; dzień 6: *MtbABC* $\uparrow$ <sub>SAA</sub>/*Mtb*<sub>SAA</sub>  $14 \times 10^6$  CFU/ml /  $28,46 \times 10^6$  CFU/ml,  $p<0,001$ ), a wstępna interakcja z hrA-SAA1 nie wpływała modulująco na badane procesy. Ponadto, w kolejnych dniach hodowli, zarówno w przypadku wyjściowego szczepu H37Rv, jak i badanych szczepów mutantów *MtbAtpA* $\uparrow$  i *MtbABC* $\uparrow$ , poddawanych wstępnej interakcji z hrA-SAA1, zanotowano istotne różnice związane z nasileniem wzrostu i przeżywania wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych bakterii.

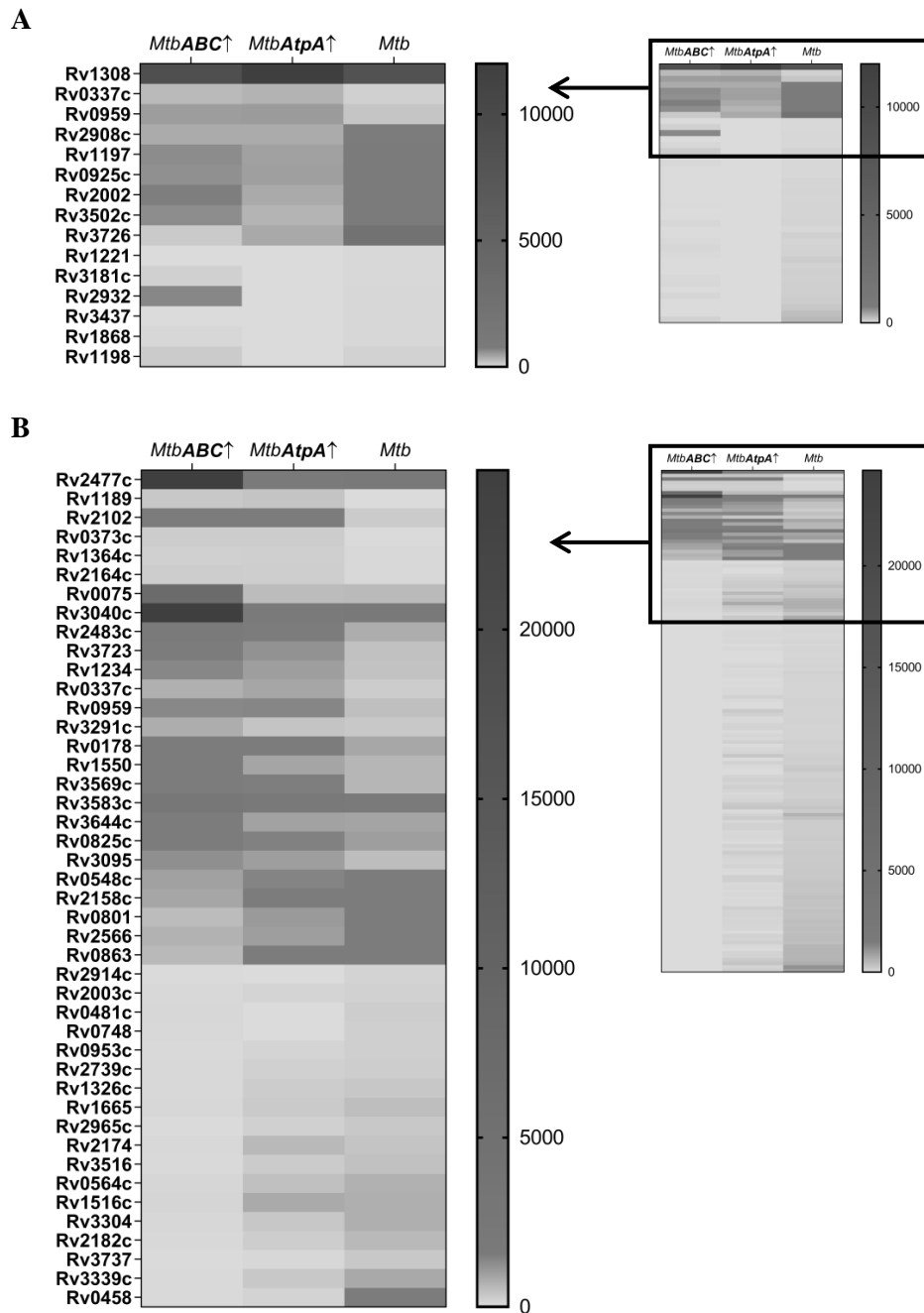
### 5.3.5. Analiza proteomiczna szczepów mutantów *MtbAtpA* $\uparrow$ i *MtbABC* $\uparrow$

Podjmując próbę wyjaśnienia znamienne osłabionego wnikania szczepów mutantów *MtbAtpA* $\uparrow$  i *MtbABC* $\uparrow$  do ludzkich makrofagów oraz mając na uwadze unikatowe zdolności adaptacyjne prątka gruźlicy, postanowiono sprawdzić czy, indukowana doświadczalnie, w komórkach tego patogenu, nadprodukcja białek wiążących ludzki surowiczy amyloid A nie prowadzi do zmian w poziomie syntezy innych komórkowych komponentów białkowych tych bakterii. Analiza porównawcza proteomu rekombinowanych szczepów *MtbAtpA* $\uparrow$  i *MtbABC* $\uparrow$ , nadprodukujących, odpowiednio, białko AtpA (Rv1308c) i ABC (Rv2477c), proteomami wyjściowego szczepu H37Rv i kontrolnego szczepu noszącego replikacyjny plazmid pKW08, użyty do konstrukcji rekombinowanych szczepów prątka gruźlicy, została wykonana komercyjnie w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie z zastosowaniem techniki spektrometrii mas ESI/MS/MS (podrozdział 4.2.9). Uzyskane dane proteomiczne, w postaci intensywności widm masowych, identyfikowanych dla poszczególnych peptydów, potwierdziły zdolność rekombinowanych szczepów prątka gruźlicy do znamiennej nadprodukcji białka Rv1308 (*MtbAtpA* $\uparrow$ ) i Rv2477c (*MtbABC* $\uparrow$ ), których poziom syntezy w poddanych analizie preparatach białkowych był, odpowiednio, 1,46-krotnie ( $p=0,036$ ), (**Ryc. 29A**) oraz 16,73-krotnie ( $p<0,0001$ ), (**Ryc. 29B**) wyższy w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv. Ponadto w przypadku badanych szczepów mutantów prątka gruźlicy zaobserwowano także istotne zmiany

ilościowe w profilu wielu białek, w tym białek powierzchniowych i warunkujących metabolizm komórkowy, w porównaniu do wyjściowego szczepu tego patogenu. Natomiast, ocena bioinformatyczna wyników analizy proteomicznej nie wykazała związku pomiędzy obecnością, w komórkach prątka gruźlicy, replikacyjnego plazmidu pKW08 a zanotowanymi różnicami w proteomie szczepów mutantów, co pozwala stwierdzić, iż obserwowane zmiany w poziomie biosyntezy białek w komórkach rekombinowanych szczepów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ są wynikiem nadprodukcji docelowych białek.

Spośród obu badanych rekombinantów, szczep mutant *MtbABC*↑ odznaczał się największą liczbą zmian w proteomie, obejmującą nadprodukcję 22 oraz zmniejszenie biosyntezy 123 różnych białek (**Ryc. 29B**). Natomiast, rekombinowany szczep *MtbAtpA*↑ wykazywał nadprodukcję 2 oraz obniżenie poziomu biosyntezy 40 białek (**Ryc. 29A**). W przypadku obu szczepów mutantów zanotowano istotne modulacje poziomu ekspresji wielu ważnych i niezbędnych do wzrostu prątka gruźlicy białek, zaangażowanych m.in. w liczne szlaki metaboliczne, regulację transkrypcji genów oraz syntezę aminokwasów. Biologiczne funkcje wybranych białek oraz zmiany w poziomie ich ekspresji w proteomie obu szczepów mutantów, w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv, przedstawiono w **Tabeli 3**. Przykładowymi komponentami komórkowymi szczepu mutantu *MtbAtpA*↑, charakteryzującymi się obniżonym poziomem biosyntezy są, niezbędne do wewnątrzkomórkowego wzrostu prątka gruźlicy białka EsxK (Rv1197) i EsxL (Rv1198) [265]. Jednocześnie, rekombinowany szczep *MtbABC*↑ wykazywał obniżoną ekspresję wielu warunkujących wzrost prątka gruźlicy białek, m.in. białka CarD (Rv3583c), MenB (Rv0548c), MurE (Rv2158c), PknI (Rv2914c) i GlgB (Rv1326c), a ponadto białka MptA (Rv2174) zaangażowanego w szlak biosyntezy rdzenia mannanowego lipomannanu, będącego wiążącym wiele receptorów powierzchniowych makrofagów [17], (**Tabela 3**).





**Ryc. 29.** Zmiany w poziomie biosyntezy komórkowych białek u rekombinowanych szczepów *MtbAtpA*↑ (A) oraz *MtbABC*↑ (B) prątką gruźlicy w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv; intensywności widm masowych identyfikowanych dla poszczególnych peptydów przedstawiono w formie map ciepła (ang. *heat maps*)

Tabela 3. Poziom biosyntezy oraz biologiczna funkcja wybranych białek komórkowych szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ prątku gruźlicy w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv (*Mtb*), (opracowano na podstawie <https://mycobrowser.epfl.ch/>)

BIAŁKO		↑/↓	<i>p</i>	FUNKCJA
<b><i>MtbAtpA</i>↑ / <i>Mtb</i></b>				
<b>Rv0337c</b>	<b>AspC</b>	<b>2,275</b>	0,0027	Synteza aminokwasów (niezbędne do wzrostu)
<b>Rv1197</b>	<b>EsxK</b>	<b>- 1,646</b>	0,001	Funkcja nieznana, delecja genu <i>esxKL</i> upośledza zdolność prątku gruźlicy do kolonizowania ludzkich makrofagów [265]
<b>Rv1198</b>	<b>EsxL</b>	<b>- 26,523</b>	0,001	
<b>Rv2002</b>	<b>FabG3</b>	<b>- 1,826</b>	0,0008	Metabolizm lipidów
<b><i>MtbABC</i>↑ / <i>Mtb</i></b>				
<b>Rv3583c</b>	<b>CarD</b>	<b>1,747</b>	9,9E-05	Czynnik wirulencji, regulacja transkrypcji RNA, zmiany w ekspresji genu <i>carD</i> zakłócają prawidłowy wzrost szczepu H37Rv <i>in vitro</i>
<b>Rv0548c</b>	<b>MenB</b>	<b>- 1,748</b>	0,0009	Biosynteza menachinonu (niezbędne do wzrostu)
<b>Rv2158c</b>	<b>MurE</b>	<b>- 1,761</b>	0,005	Biosynteza peptydoglikanu, stanowiącego składnik ściany komórkowej (niezbędne do wzrostu)
<b>Rv2914c</b>	<b>PknI</b>	<b>- 17,339</b>	0,0098	Transdukcja sygnałów, prawdopodobnie odpowiada za proces podziału/różnicowania komórki bakteryjnej
<b>Rv1326c</b>	<b>GlgB</b>	<b>- 18,274</b>	0,0078	Biosynteza glikogenu, stanowiąca część biosyntezy glikanu (niezbędne do wzrostu)
<b>Rv2174</b>	<b>MptA</b>	<b>- 18,839</b>	0,0077	Biosynteza rdzenia mannanowego lipomannanu (niezbędne do wzrostu)

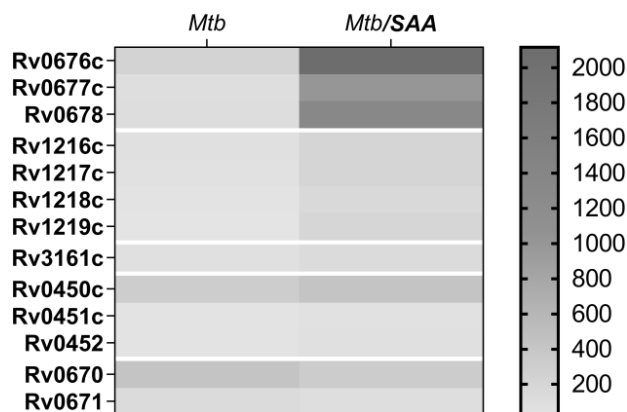
↑ - wzrost biosyntezy białka, ↓ - spadek biosyntezy białka

## 5.4. HIPOTEZA 4

### Interakcja *M. tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A moduluje odpowiedź funkcjonalną tych bakterii

#### 5.4.1. Wpływ wiązania hrA-SAA1 na odpowiedź funkcjonalną prątka gruźlicy na poziomie transkryptomu

W celu określenia wpływu wiązania hrA-SAA1 na odpowiedź funkcjonalną prątka gruźlicy na poziomie transkryptomu wykonano analizę ilościową i jakościową RNA, izolowanego z bakterii niepoddawanych oraz poddawanych interakcji z badanym białkiem ostrej fazy, o końcowym stężeniu 15 µg/ml (podrozdział 4.2.10). Zastosowana metodyka oraz przeprowadzona analiza bioinformatyczna otrzymanych, za pomocą sekwencjonowania w technologii Illumina, odczytów pozwoliła na wyodrębnienie istotnych różnic w ilości transkryptów identyfikowanych u prątka gruźlicy w odpowiedzi na interakcję z ludzkim hrA-SAA1. Wykazano, iż związanie przez prątka gruźlicy badanego ludzkiego białka ostrej fazy o 5-krotnie podwyższonym, w stosunku do fizjologicznego, stężeniu przyczyniła się do znamiennych statystycznie zmian w genomie, wykazanych jako wzrost i spadek ekspresji, odpowiednio, 11 i 2 genów (**Ryc. 30**). Zaobserwowany wzrost ekspresji dotyczył genów zlokalizowanych w obrębie 3 operonów kodujących systemy białek transportowych oraz genu kodującego dioksygenazę. Natomiast, obniżenie poziomu ekspresji zanotowano w przypadku genu kodującego endonukleazę IV oraz lipoproteinę LpqP. Funkcje wybranych genów oraz produktów ich ekspresji, wraz z poziomem zmian w ilości transkryptów uzyskanych dla poszczególnych genów, przedstawiono w **Tabeli 4**.



**Ryc. 30.** Zmiany w ilości transkryptów identyfikowanych w genomie prątka gruźlicy, w odpowiedzi na wiązanie hrA-SAA1 (15 µg/ml); poziom ekspresji poszczególnych genów przedstawiono w formie map ciepła (ang. *heat maps*)

Tabela 4. Zmiany poziomu ekspresji genów w transkryptomie prątku gruźlicy, w odpowiedzi na wiązania hrA-SAA1 oraz biologiczne funkcje produktów ich ekspresji (opracowano na podstawie <https://mycobrowser.epfl.ch/>)

GEN		↑/↓	<i>p</i>	FUNKCJA
<i>rv0450c</i>	<i>mmpL4</i>	<b>0,401</b>	3,98E-06	Transporter przezbłonowy MmpL4
<i>rv0451c</i>	<i>mmpS4</i>	<b>0,781</b>	2,90E-05	Białko błonowe MmpS4
<i>rv0452</i>	-	<b>1,039</b>	2,75E-08	Regulator transkrypcyjny
<i>rv0676c</i>	<i>mmpL5</i>	<b>2,997</b>	1,94E-19	Transporter przezbłonowy MmpL5
<i>rv0676c</i>	<i>mmpS5</i>	<b>3,141</b>	4,91E-18	Białko błonowe MmpS5
<i>rv0678c</i>	-	<b>3,298</b>	1,02E-17	Regulator transkrypcyjny
<i>rv1216c</i>	-	<b>1,621</b>	2,73E-14	Integralne białko błonowe
<i>rv1217c</i>	-	<b>1,891</b>	2,97E-13	Permeaza, białko systemu transportowego typu ABC-2
<i>rv1218c</i>	-	<b>2,573</b>	6,77E-14	Wiążące ATP białko transportowe typu ABC-2
<i>rv1219c</i>	-	<b>2,679</b>	2,36E-13	Regulator transkrypcyjny
<i>rv3161c</i>	-	<b>0,947</b>	6,00E-08	Dioksygenaza
<i>rv0670</i>	<i>end</i>	<b>- 0,354</b>	2,09E-06	Endonukleaza IV
<i>rv0671</i>	<i>lpqP</i>	<b>- 0,331</b>	0,00026	Lipoproteina LpqP

↑ - wzrost ekspresji, ↓ - spadek ekspresji

# **ROZDZIAŁ 6**

***WNIOSKI***

## 6. WNIOSKI

1. *Mycobacterium tuberculosis*, w przeciwieństwie do saprofitycznego *Mycobacterium smegmatis*, swoiście wiąże ludzki surowiczy amyloid A (A-SAA1), a intensywność tego procesu jest wprost proporcjonalna do stężenia ludzkiego białka ostrej fazy.
2. Swoiste wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A (A-SAA1) przez *M. tuberculosis* warunkowane jest m.in. przez membranowe białka AtpA (Rv1308) i ABC (Rv2477c) tego patogenu.
3. Swoistość wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A (A-SAA1) przez białko AtpA *M. tuberculosis* charakteryzuje się wyższym powinowactwem, w porównaniu do powinowactwa analogicznej interakcji białka ABC tego patogenu.
4. Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A (A-SAA1), o stężeniu 5-krotnie wyższym od jego średniej wartości fizjologicznej, przez *M. tuberculosis* moduluje przebieg wczesnych etapów infekcji ludzkich makrofagów poprzez nasilenie wnikania, a także wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania prątka gruźlicy.
5. Nadprodukcja białek AtpA i ABC u szczepów mutantów, odpowiednio, *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑, skutkuje osłabionym wnikaniem rekombinowanych prątków do ludzkich makrofagów z towarzyszącym temu zjawisku znamienym zmniejszeniem liczby wewnątrzkomórkowo namnażających się i przeżywających bakterii, zarówno nie poddawanych, jaki i poddawanych wstępnej interakcji z ludzkim surowiczym amyloidem A (A-SAA1).
6. Interakcja szczepu mutantu *MtbAtpA*↑ prątka gruźlicy z ludzkim surowiczym amyloidem A, o stężeniu 5-krotnie wyższym od jego średniej wartości fizjologicznej, skutkuje wyraźnym zwiększeniem liczby wnikających komórek rekombinowanych bakterii do ludzkich makrofagów, w porównaniu do intensywności wnikania odpowiadającego wyjściowego szczepu H37Rv.

7. Osłabione wnikanie szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ prątka gruźlicy do ludzkich makrofagów jest potencjalnie efektem, indukowanego doświadczalną nadprodukcją docelowego białka, wzrostu i/lub spadku biosyntezy wielu niezbędnych dla patogenności *M. tuberculosis* białek zaangażowanych w procesy metaboliczne, regulację transkrypcji genów i syntezę aminokwasów, a także białek powierzchniowych odpowiedzialnych za interakcje prątka gruźlicy z błonowymi receptorami makrofagów.
8. Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A (A-SAA1) przez *M. tuberculosis* moduluje odpowiedź funkcjonalną tych bakterii na poziomie transkryptomu manifestującą się wzrostem ekspresji genów zlokalizowanych w obrębie 3 operonów, kodujących systemy białek transportowych, oraz genu kodującego dioksygenazę, a także obniżeniem poziomu ekspresji genów kodujących endonukleazę IV oraz lipoproteinę LpqP.

**WNIOSEK OGÓLNY: Swoiste wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A (A-SAA1) przez prątka gruźlicy moduluje wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów oraz odpowiedź funkcjonalną tego patogenu.**

## **ROZDZIAŁ 7**

***DYSKUSJA***



## 7. DYSKUSJA

*Mycobacterium tuberculosis* jest patogenem charakteryzującym się wysokim sukcesem ewolucyjnym, który, poprzez wykształcenie wyjątkowych właściwości adaptacyjnych oraz złożonych mechanizmów patogenności, skutecznie rozprzestrzenił się na całej kuli ziemskiej infekując 1/3 populacji ludzkiej [9]. Powyżej wspomniane mechanizmy patogenności prątka gruźlicy oparte są głównie na zdolności tych bakterii do manipulowania elementami wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, a nawet ich wykorzystywaniu w celu adhezji, wniknięcia oraz skutecznego namnażania się wewnątrz komórek gospodarza. Pierwszym etapem konfrontacji *M. tuberculosis* z mechanizmami odpowiedzi odpornościowej, po przedostaniu się przez naturalne bariery mechaniczne [14-16], jest rozpoznanie patogenu przez komórki nieswoistych mechanizmów odpornościowych, w tym rezydujące w płucach makrofagi pęcherzyków płuc i komórki dendrytyczne [17]. Komórki te uczestniczą w pochłanianiu prątka gruźlicy za pośrednictwem bezpośrednich lub pośrednich interakcji z komórką patogenu przy udziale, odpowiednio, błonowych lub krążących receptorów rozpoznających konserwatywne struktury antygenowe tych bakterii. Interakcje te mają istotne znaczenie nie tylko dla wytworzenia skutecznej odpowiedzi odpornościowej, ale także są kluczowe dla samego patogenu, gdyż determinują adhezję niezbędną w przebiegu procesu wnikania do komórek makroorganizmu. Ponadto wskazuje się, że rodzaj receptora wykorzystywanego przez *M. tuberculosis* podczas inwazji komórek docelowych może determinować różny przebieg tego procesu, manifestujący się jako obniżenie lub wzrost zdolności bakterii do namnażania się w niekorzystnych warunkach mikrośrodowiskowych, panujących wewnątrz fagocytów [26, 33, 35, 43-45].

Przedmiotem badań niniejszej pracy doktorskiej była ocena interakcji *M. tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A, a także poznanie mykobakteryjnych ligandów warunkujących to oddziaływanie, określenie udziału tego zjawiska we wczesnych etapach inwazji ludzkich makrofagów oraz ocena wpływu wiązania surowiczego amyloidu A na odpowiedź funkcjonalną komórek bakterii. Reakcja ostrej fazy jest złożonym procesem wczesnych, nieswoistych mechanizmów obronnych makroorganizmu, który uruchamiany jest, m.in. w wyniku infekcji. Proces ten zaliczany jest do kluczowych elementów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej i warunkowany jest poprzez indukcję lub nasilenie, a także hamowanie syntezy szerokiej grupy

czynników humoralnych, nazywanych białkami ostrej fazy [164-166]. Surowiczy amyloid A jest tzw. pozytywnym białkiem reakcji ostrej fazy, którego stężenie istotnie wzrasta w efekcie aktywowanej reakcji zapalnej. Poprzez zdolność do interakcji z wieloma receptorami eksponowanymi na powierzchni komórek odpornościowych, surowiczy amyloid A posiada wiele immunologicznych funkcji, w tym wykazywanie aktywności chemotaktycznej i indukowanie syntezy wielu cytokin [170, 173, 176, 189]. Wysoki poziom surowiczego amyloidu A obserwowany jest także w surowicach pacjentów chorych na gruźlicę, a stężenie tego białka ostrej fazy zależne jest od postaci tej choroby i, związanego z jej przebiegiem, stopnia uszkodzenia tkanki płuc [240].

Mając na uwadze złożone mechanizmy patogenności prątka gruźlicy, a także funkcjonalną aktywność surowiczego amyloidu A, w prezentowanej pracy doktorskiej przyjęto ogólne założenie, iż, towarzyszące zakażeniu *M. tuberculosis*, wysokie stężenie surowiczego amyloidu A, jest przyczyną nie tylko zmian patologicznych w obrębie układu oddechowego, ale wiązanie tego białka ostrej fazy przez prątki gruźlicy może wpływać na procesy przylegania, wnikania i namnażania się tych bakterii w ludzkich makrofagach oraz może modulować funkcjonalną aktywność samego patogenu. Wiązanie opsonizowanego surowiczym amyloidem A prątka gruźlicy przez, wspólne dla komponentów antygenowych tych bakterii i badanego białka ostrej fazy, receptory TLR2, TLR4 i CD36 wydaje się szczególnie interesujące w kontekście możliwego wpływu interakcji *M. tuberculosis* z A-SAA na wczesne etapy infekcji. Co więcej, surowiczy amyloid A występuje w surowicy krwi głównie w postaci związanej z cholesterolem, który, nie tylko pełni kluczową rolę w efektywnym wnikaniu tego patogenu do ludzkich makrofagów, ale również stanowi niezbędne do wewnątrzkomórkowego wzrostu tych bakterii źródło węgla i czynnik sprzyjający przetrwaniu prątka gruźlicy w niekorzystnych warunkach wewnętrznego środowiska fagosomu [34, 250].

Pierwszym etapem badań doświadczalnych przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej była weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej interakcję pomiędzy prątkiem gruźlicy a surowiczym amyloidem A. Na podstawie wykonanych analiz wykazano, iż żywe komórki prątków, zarówno patogennych *M. tuberculosis*, jak i niepatogennych *M. smegmatis*, wiążą surowiczy amyloid A, jednakże interakcja ta ma charakter swoistych oddziaływań wyłącznie w przypadku prątka gruźlicy i przejawia się

istotnie wyższą intensywnością w porównaniu do *M. smegmatis*. Interakcja bakterii z surowiczym amyloidem A nie jest zjawiskiem całkowicie niespodziewanym. Hari-Dass i wsp. [233] potwierdzili zdolność wiązania tego białka ostrej fazy u wielu bakterii Gram-ujemnych, w tym *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Serratia marcescens*, natomiast zaobserwowane zjawisko nie występowało w przypadku *Burkholderia cepacia* oraz Gram-dodatnich *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. Autorzy ci wykazali również, iż, podobnie do stwierdzonej w prezentowanej pracy zależności intensywności wiązania A-SAA przez *M. tuberculosis*, ale także przez *M. smegmatis*, ilość wiązanego surowiczego amyloidu A przez bakterie Gram-ujemne jest wprost proporcjonalna do stężenia tego białka. Dodatkowo Hari-Dass i wsp. udowodnili, iż występowanie surowiczego amyloidu A w postaci apolipoproteiny związanej z lipidami wysokiej gęstości nie wpływa na zdolność tego białka ostrej fazy do opsonizacji bakterii Gram-ujemnych. Ponadto, analogicznie do zaobserwowanej w badaniach własnych gatunkowo zróżnicowanej swoistości wiązania surowiczego amyloidu A przez prątki *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*, swoistość interakcji bakterii Gram-ujemnych z surowiczym amyloidem A jest także zróżnicowana i zależna od gatunku bakterii, a najwyższą swoistość badanego oddziaływania autorzy wykazali dla *E. coli* oraz *V. cholerae*.

Oprócz interakcji z surowiczym amyloidem A, prątek gruźlicy posiada zdolność wiązania również innych pozytywnych białek ostrej fazy, w tym tych odpowiedzialnych za aktywację układu dopełniacza, mianowicie składowej C3 oraz MBL. Ferguson i wsp. pokazali, że inkubacja komórek *M. tuberculosis* w obecności 25% normalnej surowicy ludzkiej prowadzi do aktywacji dopełniacza na drodze alternatywnej, a następnie, związanej z tym procesem, opsonizacji prątka gruźlicy przez formy C3b i C3bi dopełniacza. Maksymalne wiązanie składowej C3 przez prątka gruźlicy obserwowane było już po 5 minutach inkubacji z normalną ludzką surowicą. Jednakże, obniżenie stężenia surowicy do 2,5% skutkowało, zależnym od składowej C1q, wiązaniem komponentu C3 przez prątka gruźlicy wskazując, iż w warunkach charakteryzujących się niskim stężeniem składowych dopełniacza interakcja ta jest zależna od klasycznej drogi aktywacji tego układu. Odkrycie to wydaje się szczególnie istotne w kontekście potwierdzonej przez autorów obecności składowej C3 dopełniacza w płynach oskrzelowo-pęcherzykowych osób chorych na gruźlicę, w stężeniach około 30-krotnie niższych niż w surowicy, a następnie jej zdolności do wiązania z komórkami

*M. tuberculosis* [49]. Z kolei wiązanie surowiczej lektyny wiążącej mannozę przez patogeniczne prątki *M. tuberculosis* oraz niepatogenne *M. smegmatis*, podobnie jak w przypadku stwierdzonej w tej pracy interakcji mykobakterii z ludzkim A-SAA, charakteryzuje się, odpowiednio, najwyższą i najniższą intensywnością w przypadku komórek *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* [68].

W kolejnym etapie badań, poprzez zastosowanie złożonej metodologii, obejmującej przygotowanie surowego preparatu antygenowego z żywych komórek *M. tuberculosis*, wzbogaconego we frakcję białek membranowych, jedno- i dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny, technikę Western blot, chromatografię powinowactwa oraz tandemową spektrometrię mas ESI/MS/MS, wyselekcjonowano i zidentyfikowano sześć komponentów powierzchniowych komórek prątka gruźlicy potencjalnie zaangażowanych w wiązanie ludzkiego A-SAA1, z których dwa, mianowicie białko Rv1308 (AtpA – probable ATP synthase alpha chain AtpA) i Rv2477c (ABC – probable macrolide-transport ATP binding protein ABC transporter) były przedmiotem dalszych badań w ramach pracy doktorskiej. Oba te białka są komponentami frakcji membranowej komórek *M. tuberculosis* [251], co uczyniło je szczególnie interesującymi na płaszczyźnie ich potencjalnej interakcji z badanym białkiem ostrej fazy.

Gen *rv1308* *M. tuberculosis* koduje łańcuch  $\alpha$  syntazy ATP, o relatywnej masie cząsteczkowej 59,3 kDa, będący podjednostką regulatorową, katalizującą syntezę ATP z ADP z wykorzystaniem błonowego gradientu protonów [Mycobrowser, <https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv1308>]. Prokariotyczna syntaza ATP ( $F_1F_0$ -syntaza ATP) jest konserwatywnym enzymem, odpowiedzialnym za katalizę syntezy cząsteczek ATP, zbudowanym z dwóch regionów – hydrofobowego regionu błonowego ( $F_0$ ), składającego się z podjednostek a, c i b, oraz hydrofilowego regionu cytoplazmatycznego ( $F_1$ ), złożonego z 5 podjednostek, mianowicie  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  i  $\epsilon$ , kodowanych przez pojedynczy operon *rv1303-atpBEFHAGDC-rv1312* [252].

Związany z przebiegiem gruźlicy płuc rozwój granuloma prowadzi do eliminacji większości, znajdujących się w obrębie tych patomorfologicznych zmian, prątków. Jednakże uważa się, iż nieznaczna liczba tych drobnoustrojów, poprzez adaptację do niekorzystnych warunków mikrośrodowiska granuloma, wykazuje zdolność do przetrwania w formie charakteryzującej się spowolnionym metabolizmem i zahamowaniem podziałów komórkowych [253]. Pomimo, iż *M. tuberculosis* należy do

bakterii bezwzględnie tlenowych, drobnoustrój ten posiada możliwość przystosowania się do niesprzyjających warunków środowiskowych, w tym braku dostępu do tlenu, przechodząc w stan uśpienia. W warunkach hipoksji dochodzi do hamowania cyklu komórkowego prętka gruźlicy i w tej formie patogen ten jest zdolny do przetrwania przez długi okres trwania infekcji, bez znacznego spadku żywotności. Obserwowany efekt braku dostępu do tlenu związany jest ponadto z obniżeniem wrażliwości komórek bakterii na dostępne w terapii gruźlicy tuberkulostatyki, co znacznie utrudnia skuteczną eradykację zakażenia *M. tuberculosis* [254]. Rao i wsp. udowodnili, iż konsekwencją, indukowanych niedoborem tlenu, zmian fizjologicznych prętka gruźlicy jest niskie, wewnątrzkomórkowe stężenie ATP, w porównaniu do bakterii rosnących w warunkach tlenowych, które utrzymywane jest przez komórki tego mikroorganizmu na stałym poziomie warunkowanym syntezą ATP *de novo*. Dodatkowo zauważono, iż niereplikujące prętki gruźlicy są szczególnie wrażliwe na dalsze zaburzenia homeostazy ATP, których skutkiem jest spadek ich żywotności nawet o 90%, co skłoniło do wysunięcia hipotezy zakładającej wykorzystanie konieczności utrzymania stałego, wewnątrzkomórkowego poziomu ATP przez *M. tuberculosis* jako potencjalnego mechanizmu docelowego dla nowych leków przeciwprętkowych [255]. Badania naukowe prowadzone na modelach *in vivo*, odzwierciedlających warunki sprzyjające przechodzeniu prętka gruźlicy w stan uśpienia, pozwoliły na zdefiniowanie profilu ekspresji genów patogenu m.in. w warunkach niedoboru tlenu, braku składników odżywczych czy niskiego pH. Karakousis i wsp. stwierdzili, iż latencji prętka gruźlicy towarzyszy obniżenie ekspresji nie tylko genów kodujących rybosomalne białka wiążące RNA, ale także genów kodujących składowe syntazy ATP, w tym podjednostkę  $\alpha$  (*rv1308*), czego rezultatem jest spadek wewnątrzkomórkowo zmagazynowanej energii w postaci cząsteczek ATP. Obserwacje te potwierdziły założoną przez autorów hipotezę wskazującą na zmianę statusu fizjologicznego prętka gruźlicy będącą wynikiem spowolnionej aktywności metabolicznej tych bakterii w stanie latencji i zahamowaniem podziałów komórkowych [256]. Szczególnie interesująco, w kontekście powyższych doniesień naukowych, przedstawiają się wyniki porównawczej analizy proteomicznej klinicznych szczepów *M. tuberculosis*, opornych na amikacynę i kanamycynę, wskazujące na wykorzystanie podjednostki regulatorowej  $\alpha$  syntazy ATP jako potencjalnej tarczy docelowej dla nowych tuberkulostatyków [257].

Zanotowaną w prezentowanej pracy zdolność podjednostki  $\alpha$  syntazy ATP prętka gruźlicy do wiązania białek makroorganizmu potwierdzają badania Huo i wsp., którzy

wykazali potencjał mykobakteryjnych podjednostek regulatorowych syntazy ATP, w tym białka AtpA (Rv1308), AtpG (Rv1309) i AtpD (Rv1310), do interakcji z ligandami ludzkiego gospodarza. Jednocześnie autorzy ci, poprzez zaprojektowanie modelu umożliwiającego prognozowanie oddziaływań patogen – gospodarz, opartego m.in. na sekwencji białka, cechach strukturalnych i genetycznych warunkujących interakcje i funkcjonalne powiązania, a także profilu filogenetycznym, zidentyfikowali 118 potencjalnych par wchodzących ze sobą w interakcje białek, tworzonych przez 43 białka *M. tuberculosis* oraz 48 białek ludzkich [258].

Drugim, stanowiącym przedmiot badań niniejszej pracy doktorskiej, komponentem powierzchniowym prątka gruźlicy potencjalnie wiążącym ludzki A-SAA jest, kodowane przez gen *rv2477c*, białko ABC (Rv2477c), o masie relatywnej 61,9 kDa, zaliczane do grupy, wiążących ATP, transporterów typu ABC zaangażowanych w aktywny transport związków makrolidowych [Mycobrowser, <https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv2477>]. Białka transportowe typu ABC posiadają z reguły właściwości pomp wielolekooporności, których funkcją jest aktywne usuwanie substancji antybakteryjnych z komórki, z wykorzystaniem hydrolizy ATP jako źródła energii [252]. Białko Rv2477c należy do podrodziny transporterów ABC-F, których cechą charakterystyczną jest posiadanie pary domen wiążących nukleotydy (NBD), natomiast w strukturze tego białka nie występuje domena transbłonowa (TDM), determinująca funkcje transportowe. Dlatego też, w przeciwieństwie do wielu innych, błonowych transporterów zależnych od źródła energii w postaci ATP, białka podrodziny ABC-F nie wykazują aktywności pomp wielolekooporności lecz biorą udział w procesach komórkowych, takich jak kontrola procesu translacji oraz warunkowanie oporności prątka gruźlicy na antybiotyki poprzez ochronę rybosomów [259, 260]. Udowodniono, iż poziom biosyntezy białka Rv2477c regulowany jest obecnością antybiotyków, na co wskazuje podwyższony poziom transkrypcji genu *rv2477c* w odpowiedzi na stres wywołany obecnością związków przeciwpłatkowych w środowisku wzrostu [261]. Ponadto Faksri i wsp. dowiedli, że izolowane od pacjentów wielolekooporne szczepy *M. tuberculosis* wykazują niesynonimiczny polimorfizm pojedynczego nukleotydu w obrębie genu kodującego białko Rv2477c, którego efektem jest zmiana w sekwencji aminokwasowej tego, zbudowanego z 558 aminokwasów, białka w pozycji 135 z tryptofanu na glicynę, warunkująca dalsze zróżnicowanie w jego strukturze

drugorzędowej, a także, przypuszczalnie, oporność prątka gruźlicy na stosowane w terapii antybiotyki aminoglikozydowe, w tym na kanamycynę oraz amikacynę [262].

Ze względu na potencjalne, duże znaczenie białka Rv2477c w patogenezie gruźlicy Daniel i wsp. podjęli się określenia biochemicznej charakterystyki tego białka. Wykazali oni, iż białko Rv2477c posiada silną aktywność ATPazy, która ulega osłabieniu w obecności antybiotyków hamujących proces translacji białek, mianowicie tetracykliny i erytromycyny. Stymulacja biologicznej aktywności ATPazy zależna jest, w pierwszej kolejności, od dostępności jonów manganu ( $Mn^{2+}$ ), a następnie kobaltu ( $Co^{2+}$ ) i magnezu ( $Mg^{2+}$ ). Ponieważ najwyższe stężenie jonów  $Mn^{2+}$  obserwuje się u bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu lub wolnorosnących, autorzy sugerują potencjalną rolę jonów tego pierwiastka w regulacji, istotnej na płaszczyźnie patogenności prątka gruźlicy, funkcjonalnej aktywności ATPazy Rv2477c. Mechanizm ten może mieć zasadnicze znaczenie w trakcie konfrontacji patogenu z niekorzystnymi warunkami wewnętrznego środowiska organizmu gospodarza, determinującymi fizjologiczne zmiany komórek prątka. Ponadto Daniel i wsp. zaobserwowali istotny wpływ pH na aktywność enzymatyczną białka Rv2477c, która była najwyższa przy pH 5,2 i ulegała znacznemu osłabieniu w warunkach charakteryzujących się spadkiem lub wzrostem wartości tego parametru w stosunku do pH optymalnego. Zależność ta może być kluczowa w przebiegu infekcji ludzkich makrofagów przez prątka gruźlicy w kontekście styczności bakterii z fizjologicznym, kwaśnym środowiskiem panującym wewnątrz docelowych komórek [263].

Stwierdzone w pracy doktorskiej predyspozycje różnych białek *M. tuberculosis* do oddziaływań z takim samym ludzkim białkiem ostrej fazy nie są zjawiskiem odosobnionym. Świercko i wsp. wykazali bowiem obecność trzech, ważnych pod względem biologicznym, struktur prątka gruźlicy, mianowicie ManLAM oraz antygenów kompleksu 85 – Ag85A oraz Ag85B, warunkujących interakcje tego patogenu z MBL [79]. Zdolność wielu ligandów *M. tuberculosis* do potencjalnych oddziaływań z jednym ludzkim białkiem zaobserwowali również Huo i wsp., którzy dzięki zastosowaniu wspomnianej wcześniej molekularnej metody przewidywania interakcji białko-białko wykazali zdolność czterech różnych białek prątka gruźlicy do oddziaływań z ludzkim białkiem P10809 [258].

Prowadzone przez Hari-Dass i wsp. badania nad interakcją bakterii Gram-ujemnych z ludzkim A-SAA1 wykazały, podobnie jak w przypadku *M. tuberculosis*, obecność we frakcji białek membranowych *E. coli* specyficznego

ligandu, odpowiedzialnego za wiązanie badanego białka ostrej fazy. Zastosowanie spektrometrii mas pozwoliło na zidentyfikowanie tego ligandu jako białka OmpA, stanowiącego komponent bakteryjnej błony zewnętrznej i zaliczanego do konserwatywnej rodziny białek OmpA/OprF. Występowanie białek OmpA/OprF potwierdzono u prawie wszystkich Gram-ujemnych bakterii, a ich funkcjonalna aktywność związana jest z utrzymywaniem strukturalnej integralności błony komórkowej. Ponadto wskazuje się, iż wykazują one właściwości poryn [233].

Zaobserwowaną we własnych badaniach zdolność wiązania ludzkiego A-SAA1 przez białka AtpA i ABC *M. tuberculosis* potwierdzono przy użyciu rekombinowanych form tych ligandów, uzyskanych w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21 (DE3), oraz techniki Western blot. Następnie, w celu precyzyjnego ustalenia swoistości obserwowanych interakcji pomiędzy badanymi bakteryjnymi ligandami a ludzkim A-SAA1 przeprowadzono specjalistyczną analizę z zastosowaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego przy użyciu różnych stężeń badanego białka ostrej fazy. Analiza uzyskanych tą metodą wyników wykazała, iż zidentyfikowane mykobakteryjne ligandy wiążą swoiście ludzki A-SAA1, jednakże interakcja pomiędzy białkiem AtpA a ludzkim A-SAA1 charakteryzuje się silniejszym powinowactwem w porównaniu do powinowactwa analogicznej interakcji białka ABC. Obserwowane przez Hari-Dass i wsp. powinowactwo wiązania ludzkiego rA-SAA1 przez bakterie Gram-ujemne różniło się w zależności od ich gatunku, przy czym najwyższą swoistość tych oddziaływań zanotowano dla *E. coli* oraz *V. cholerae*. Ponadto autorzy stwierdzili również, że stężenie SAA wymagane do zaobserwowania połowy maksymalnego wiązania tego białka ostrej fazy przez Gram-ujemne bakterie mieściło się w granicach jego fizjologicznych wartości [233].

Kolejnym etapem prowadzonych prac doświadczalnych była ocena wpływu interakcji komórek *M. tuberculosis* z ludzkim A-SAA1 na wczesne etapy infekcji ludzkich makrofagów, a także określenie udziału, zidentyfikowanych jako wiążące to białko ostrej fazy, mykobakteryjnych ligandów w badanych etapach zakażenia docelowych fagocytów. W doświadczeniach tych stosowano, odpowiednio, komórki wyjściowego szczepu prątka gruźlicy oraz szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑, nadprodukcujących białko AtpA lub ABC, które poddawano wstępnej interakcji z hrA-SAA1, a następnie infekowano nimi ludzkie makrofagi pochodzenia monocytarnego.



Efektywność prowadzonego przez komórki żerne procesu fagocytozy warunkowana jest, m.in. opsonizacją bakterii przez rozpuszczalne cząsteczki humoralnej odpowiedzi wrodzonej, odgrywającej istotną rolę w ograniczaniu infekcji na jej wczesnym etapie, przed rozwinięciem mechanizmów odporności swoistej. Jednakże, w przypadku drobnoustrojów charakteryzujących się wyjątkowymi właściwościami adaptacyjnymi, związanymi z wykształceniem złożonych mechanizmów patogenności, interakcje z rozpuszczalnymi czynnikami odporności wrodzonej mogą umożliwiać manipulowanie mechanizmami obronnymi gospodarza, a nawet skutkować ich wykorzystywaniem do ułatwionej inwazji docelowych komórek. W kontekście powyższych mechanizmów szczególnie interesujące wydają się badane w pracy oddziaływania *M. tuberculosis* z A-SAA, zwłaszcza, iż interakcje prątka gruźlicy zarówno z błonowymi, jaki i rozpuszczalnymi cząsteczkami pełniącymi funkcje receptorów PRRs mają fundamentalne znaczenie nie tylko dla wytworzenia skutecznej odpowiedzi odpornościowej, ale także są uważane za kluczowe dla samego patogenu, gdyż determinują jego adhezję i wnikanie do docelowych komórek [17, 26]. Ponadto wskazuje się, iż poprzez wpływ na regulację transdukcji sygnału modulującego funkcje makrofagów, rodzaj wykorzystywanego przez prątka gruźlicy receptora PRRs może istotnie wpływać na wnikanie, a także wewnątrzkomórkowy wzrost i przeżywanie tego patogenu w docelowych komórkach [35]. Dodatkowo, indukowane zakażeniem *M. tuberculosis* znamienne podwyższone stężenie A-SAA może stanowić ważny czynnik modulujący nie tylko przebieg i konsekwencje gruźlicy [243-246], ale także, jak udowodniono, odgrywać zasadniczą rolę w rozwoju patologicznych zmian u pacjentów z sarkoidozą [264].

Zastosowanie, we wstępnej interakcji prątka gruźlicy z hrA-SAA1, 5-krotnie podwyższonego, w porównaniu do fizjologicznego, stężenia białka ostrej fazy przyczyniło się do, osobniczo uwarunkowanej, słabo lub umiarkowanie nasilonej tendencji komórek bakterii do adhezji, do ludzkich makrofagów. Co więcej obserwowany efekt nie zawsze miał charakter pozytywnej modulacji, gdyż w przypadku jednego osobnika zaobserwowano prawie 17% spadek liczby przylegających komórek *M. tuberculosis*. Natomiast, mimo niewielkiego wpływu na proces przylegania patogenu do docelowych fagocytów, interakcja prątka gruźlicy z hrA-SAA1 prowadziła do znamiennego nasilenia zdolności tych bakterii do wnikania, a także wewnątrzkomórkowego przeżywania i wzrostu w ludzkich makrofagach, co odnotowano jako znamienne większą liczbę wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych,

opsonizowanych hrA-SAA1 bakterii, w porównaniu do układu kontrolnego, odpowiednio, w dniu 0 oraz po 3 i 6 dniach prowadzenia hodowli. Zanotowane w pracy istotnie nasilone wnikanie opłaszczanego hrA-SAA1 prątka gruźlicy do ludzkich makrofagów, przy braku zasadniczych różnic w liczbie bakterii przylegających, może być wynikiem dwukierunkowych swoistych oddziaływań, mianowicie ligandów powierzchniowych patogenu z białkiem ostrej fazy oraz związanego przez prętka gruźlicy surowiczego amyloidu A ze swoistymi receptorami błonowymi makrofagów. Swoistość tych interakcji warunkuje bowiem wysokie powinowactwo wiązania czynnika zakaźnego z błoną cytoplazmatyczną docelowych fagocytów istotnie nasilając efektywność pochłaniania rozpoznawanych komórek patogenu. Otrzymane wyniki sugerują, iż wiązanie ludzkiego A-SAA1 przez *M. tuberculosis* moduluje przebieg wczesnych etapów infekcji ludzkich makrofagów przez ten drobnoustrój, a badane białko ostrej fazy można potencjalnie rozpatrywać jako pełniące funkcję krążącego receptora PRR rozpoznającego konserwatywne wzorce molekularne prątka gruźlicy. Jednakże dokładne znaczenie, w przebiegu gruźlicy, nasilonego wnikania opłaszczanego A-SAA1 *M. tuberculosis* do makrofagów wymaga dalszych badań, gdyż, z jednej strony, mechanizm ten może mieć strategiczny charakter w eliminacji patogenu, natomiast z drugiej, może ułatwiać prątkowi osiągnięcie wewnątrzkomórkowej niszy niezbędnej w procesach wzrostu i rozprzestrzeniania się. Analogiczne badania powiązań interakcji mikroorganizmów z ludzkim surowiczym amyloidem A przeprowadzili Shah i wsp., którzy udowodnili, iż wiązany przez Gram-ujemne bakterie ludzki A-SAA może modulować zarówno proces infekcji, jaki i stymulować odpowiedź komórek żernych, mianowicie makrofagów i neutrofilów. Badacze wykazali, iż opsonizacja *E. coli* przez ludzki A-SAA zwiększa liczbę bakterii pochłoniętych na drodze fagocytozy przez oba typy badanych komórek odpornościowych. Ponadto obecność badanego białka ostrej fazy prowadziła do zwiększenia syntezy reaktywnych form tlenu przez neutrofile jedynie w obecności bakterii Gram-ujemnych zdolnych do wiązania ludzkiego A-SAA, co sugerowane jest jako mechanizm ułatwiający skuteczną eliminację czynnika zakaźnego. Pochłanianiu opsonizowanych badanych białkiem ostrej fazy komórek *E. coli*, towarzyszyła także zwiększona zdolność makrofagów do syntezy TNF- $\alpha$  oraz IL-10, a zjawiska tego ponownie nie zanotowano u fagocytów z wewnątrzkomórkowo zlokalizowanymi bakteriami nie wiążącymi ludzkiego A-SAA. Dodatkowo, istotnym efektem zależnego od A-SAA pochłaniania bakterii było również znamienne skrócenie czasu odpowiedzi fagocytarnej zarówno makrofagów, jak i neutrofilów. Wyniki uzyskane przez Shah i wsp.

mogą zatem sugerować, iż odpowiedź odpornościowa na zakażenie bakteryjne może być modulowana i zależna od obecności ludzkiego A-SAA, a także zdolności mikroorganizmu do wiązania tego białka ostrej fazy. Mimo to, dokładny mechanizm interakcji osponizowanych ludzkim A-SAA bakterii z komórkami fagocytarnymi nie został dotąd wyjaśniony. Obserwowana aktywacja makrofagów i neutrofilów może być, z jednej strony, spowodowana bezpośrednią aktywacją, swoistych dla A-SAA, błonowych receptorów fagocytów lub, z drugiej, wiązanie A-SAA przez bakterie może jedynie stymulować ich fagocytozę, natomiast pobudzona odpowiedź makrofagów i neutrofilów warunkowana jest nasileniem procesu rozpoznawania różnych bakteryjnych PAMPs [234]. Interesującym mechanizmem, w kontekście korzystnych dla bakterii efektów obecności A-SAA, jest zaobserwowana przez Quist i wsp. zdolność surowiczego amyloidu A do formowania w membranie komórek makroorganizmu kanałów jonowych oraz, związane z tym zjawiskiem, zaburzenie homeostazy jonowej [236]. Proces ten mógłby zatem przekładać się na zwiększony dostęp drobnoustrojów do niezbędnych dla utrzymania ich patogenego potencjału jonów różnych pierwiastków, jednakże zjawisko to nie zostało dotąd doświadczalnie potwierdzone.

Surowiczy amyloid A nie jest jedynym pozytywnym białkiem reakcji ostrej fazy, które pośredniczy w fagocytozie prątka gruźlicy poprzez promowanie przylegania do i wewnątrzkomórkowego przeżywania opsonizowanych bakterii w docelowych komórkach. Wiązanie składowej C3 dopełniacza przez *M. tuberculosis* również nasila przyleganie tego patogenu do ludzkich makrofagów pęcherzyków płucnych i monocytów [47, 48], a obserwowany efektywny wewnątrzkomórkowy wzrost i przeżywanie są wynikiem hamowania fuzji fagosomu z lizosomem poprzez interferencję ze szlakami transdukcji sygnałów, zależnych od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , pobudzanych przy udziale receptorów CR [57]. Ponadto Manivannam i wsp. zaobserwowali również wzrost przeżywalności prątka gruźlicy wewnątrz makrofagów w obecności przeciwciał przeciwprątkowych i składowej C3 dopełniacza [52]. Kolejnym pozytywnym białkiem reakcji ostrej fazy, w obecności którego obserwuje się wzmożone przyleganie prątka gruźlicy do błony cytoplazmatycznej fagocytów jest lektyna wiążąca mannozę. Bonar i wsp. zademonstrowali, iż obecność MBL warunkuje wzrost liczby komórek patogenu przylegających do powierzchni neutrofilów, co może być bezpośrednim efektem interakcji prątka gruźlicy z tą lektyną bądź rezultatem aktywacji komplementu i opsonizacji komórek *M. tuberculosis* przez składową C3 dopełniacza [71]. Jak można

zaobserwować interakcja prątka gruźlicy z komórką docelową jest procesem złożonym, który zależny jest od wielu rozpuszczalnych komponentów odpowiedzi odpornościowej, w tym pozytywnych białek reakcji ostrej fazy, do których zaliczany jest surowiczny amyloid A. Interakcje tych bakterii z białkami ostrej fazy mogą przyczyniać się do ułatwienia inwazji ludzkich makrofagów, gdyż, jak pokazują doniesienia naukowe oraz wyniki przedstawione w prezentowanej pracy doktorskiej, nie tylko modulują one przyleganie patogenu do docelowych komórek, ale również mają istotne znaczenie dla wnikania oraz wewnątrzkomórkowego przeżywania tego patogenu.

Ocena udziału dwóch mykobakteryjnych ligandów wiążących ludzki A-SAA1, mianowicie białka AtpA i ABC, we wczesnych etapach infekcji ludzkich makrofagów przez prątka gruźlicy oraz wpływu ich interakcji z badanym białkiem ostrej fazy na ten proces wykazała niespodziewane, znamienne osłabione wnikanie komórek szczepów mutantów do docelowych fagocytów, w porównaniu do wyjściowego szczepu prątka gruźlicy. Zmniejszenie liczby wnikających komórek rekombinowanych prątków przyczyniło się zapewne do istotnego obniżenia liczby wewnątrzkomórkowo namnażających się i przeżywających komórek bakterii obu szczepów. Zauważono jednak, iż, w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv, wstępna interakcja szczepu mutantu *MtbAtpA*↑ z hrA-SAA1, nasila o 23,4% jego wnikanie do badanych fagocytów, natomiast efekt ten był nieznaczny w przypadku szczepu *MtbABC*↑. Pomimo zanotowanej powyższej tendencji, obserwowane różnice nie wykazywały jednak istotności statystycznej. Ponadto, analogicznie do szczepów mutantów niepoddawanych interakcji z hrA-SAA1, stwierdzono istotnie osłabione wnikanie do ludzkich makrofagów, opłaszczonych białkiem ostrej fazy, komórek zarówno mutantu *MtbAtpA*↑, jak i *MtbAtpA*↑, w porównaniu do poziomu infekcji docelowych fagocytów przez, poddawany wstępnej interakcji z hrA-SAA1, wyjściowy szczep prątka gruźlicy. Konsekwencją istotnie mniejszej liczby wnikających, opłaszczonych surowiczym amyloidem A, komórek szczepów mutantów był także znamienne niższy poziom ich wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania. Wyższa efektywność wnikania do ludzkich makrofagów, poddanego interakcji z hrA-SAA1, szczepu mutantu *MtbAtpA*↑, w porównaniu do opłaszczonego tym białkiem ostrej fazy rekombinowanego szczepu *MtbABC*↑ może być wynikiem wykazanej w pracy, większej siły powinowactwa (swoistości) wiązania surowiczego amyloidu A przez mykobakteryjne białko AtpA, w porównaniu do białka ABC. Podejmując próbę wyjaśnienia niespodziewanego,

osłabionego wnikania szczepów mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ do badanych fagocytów wysunięto hipotezę zakładającą, iż doświadczalnie indukowana nadprodukcja badanych mykobakteryjnych białek AtpA i ABC prowadzi do zmian w poziomie ekspresji innych genów rekombinowanych prątków, co przekłada się na zmiany ilościowe w ich proteomie, dotyczące także ligandów uczestniczących w interakcjach *M. tuberculosis* z ludzkimi makrofagami oraz/lub innych odpowiedzialnych za mechanizmy patogenności tego drobnoustroju. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadzono, z zastosowaniem spektrometrii mas, globalną analizę proteomiczną preparatów białkowych uzyskanych ze szczepów mutantów w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv oraz kontrolnego szczepu noszącego wyjściowy plazmid replikacyjny pKW08. Analiza bioinformatyczna otrzymanych wyników potwierdziła, zarówno zdolność szczepów mutantów do nadprodukcji poszczególnych ligandów wiążących ludzki A-SAA1, jak i zasadność założonej hipotezy. Wykazano bowiem istotne zmiany w proteomach obu rekombinowanych szczepów prątka gruźlicy, w porównaniu do szczepu wyjściowego i kontrolnego, dotyczące poziomu syntezy wielu powierzchniowych białek zaangażowanych w procesy wzrostu prątka gruźlicy oraz inwazji ludzkich makrofagów. Nie stwierdzono natomiast zmian w proteomie szczepu kontrolnego w porównaniu do wyjściowego szczepu H37Rv.

Spośród wielu białek, których wzrost lub spadek biosyntezy odnotowano w przypadku szczepu mutantu *MtbAtpA*↑, najbardziej interesujący w kontekście inwazji ludzkich makrofagów jest znaczący spadek ekspresji białek EsxK (Rv1197) i EsxL (Rv1198), należących do podrodziny Esat-6 małych białek wydzielniczych. W badaniach mających na celu określenie mechanizmów adaptacji *M. tuberculosis* do wzrostu w różnych warunkach środowiskowych Bukka i wsp. wykazali kluczowe znaczenie rozpuszczalnych czynników wydzielanych przez te bakterie w patogenezie gruźlicy. Dzięki analizie transkryptomicznej bakterii izolowanych z płwocin chorujących na gruźlicę pacjentów, odkryli oni, iż jednym z transkryptów, którego zmiany w ekspresji uzależnione były od warunków wzrostu *M. tuberculosis*, jest *esxKL*. Genom prątka gruźlicy szczepu H37Rv zawiera pięć niemalże identycznych par genów *esx* (*esxKL*, *esxJI*, *esxMN*, *esxPO* i *esxWV*), które w swojej strukturze zawierają regiony kodujące konserwatywny, centralny motyw „WXG100”. Uważa się, że geny te kodują efekторы niescharakteryzowanego jeszcze systemu transportowego ESX-5. Delecja genu *esxKL* upośledza zdolność prątka gruźlicy do kolonizowania makrofagów, a komplementacja szczepu mutantu genem *esxL* przywraca zdolność tych bakterii do

wewnątrzkomórkowego wzrostu. Brak ekspresji genu *esxL* jest odpowiedzialny nie tylko za osłabienie wzrostu prątki gruźlicy wewnątrz docelowych komórek, ale również negatywnie wpływa na szybkości replikacji patogenu podczas wzrostu w podłożu hodowlanym, co obserwowano również podczas prowadzenia hodowli szczepu mutanta *MtbAtpA*↑. Ponadto, wydzielane przez komórki wyjściowego szczepu H37Rv, białko EsxL przywracało zdolność wewnątrzkomórkowego wzrostu bakteriom z delecją genu *esxKL* w niezależnie skolonizowanych makrofagach [265]. Mechanizm warunkujący promujący efekt wydzielanego przez szczep wyjściowy białka EsxL na wzrost defektywnego mutanta nie jest obecnie poznany. Dostępne doniesienia naukowe zakładają udział w tym procesie trzech alternatywnych strategii. Z jednej strony, wskazuje się na kluczową rolę egzosomów zawierających i transportujących czynniki wydzielane przez komórki prątki gruźlicy. Powstawanie i wydzielanie egzosomów udowodniono dla mysich makrofagów zakażonych *M. tuberculosis*, a także zauważono, iż są one wychwytywane przez inne makrofagi, co w przypadku niezakażonych fagocytów przyczynia się do nasilenia ich wrażliwości na zakażenie tym patogenem [266]. Z drugiej strony, zakłada się, iż podczas prowadzenia hodowli komórek zainfekowanych *M. tuberculosis*, część z nich może podlegać rozpadowi na skutek intensywnych podziałów komórek bakterii, uwalniając do środowiska pozakomórkowego, zarówno bakterie, jak i czynniki przez nie wydzielane. W takim przypadku wychwytywanie białka EsxL może być konsekwencją przeprowadzanej przez makrofagi pinocytozy [265]. Trzecia strategia opiera się, natomiast, na interakcji wydzielniczych białek prątki gruźlicy z receptorami docelowych komórek, która warunkuje hamowanie prozapalnych szlaków sygnałowych w komórce makroorganizmu i ułatwienie patogenowi procesu infekcji [267]. Należy zaznaczyć, iż dostępne dane literaturowe podkreślają potencjalną, istotną rolę białek wydzielniczych prątki gruźlicy jako czynników warunkujących jego wewnątrzkomórkowy wzrost, a zdolność *M. tuberculosis* do modulowania tego procesu podczas aktywnej infekcji jest niewątpliwie kluczowym czynnikiem umożliwiającym unikanie eliminującego działania odpowiedzi odpornościowej gospodarza [265].

W trakcie infekcji prątki gruźlicy, podobnie jak inne wewnątrzkomórkowe patogeny, narażone są na działanie szeregu mutagennych czynników, produkowanych przez komórki odpornościowe gospodarza, których skutkiem działania są pęknięcia nici DNA, mutacje punktowe czy delecje chromosomalne [268-271]. Ponadto wpływ na genom tych drobnoustrojów ma również ograniczony dostęp do składników odżywczych

oraz tlenu [272]. Pomimo tych niesprzyjających warunków, *M. tuberculosis* jest zdolny do przetrwania w organizmie gospodarza przez całe jego życie, co niewątpliwie wskazuje, iż patogen ten wyposażony jest w szereg mechanizmów chroniących go przed odpowiedzią odpornościową makroorganizmu. Jednym z takich mechanizmów, aktywowanych w odpowiedzi na szeroki zakres czynników stresowych, jest, opisana przez Stallings i wsp., nadekspresja genu *carD* u *M. smegmatis* (MSMEG\_6077), pojawiająca się w odpowiedzi na stres oksydacyjny, uszkodzenie dwuniciowego DNA bakterii oraz brak dostępu do składników odżywczych. Wykazano, iż konserwatywne u mykobakterii białko CarD jest niezbędne do wzrostu, zarówno niepatogennych prątków *M. smegmatis*, jak i patogennych *M. tuberculosis* [273]. Analiza proteomu szczepu mutanta *MtbABC*↑ pozwoliła stwierdzić, iż doświadczalnie indukowanej nadprodukcji białka ABC towarzyszy nadprodukcja białka CarD (Rv3583c). Funkcjonalna aktywność białka CarD związana jest z kontrolowaniem procesu transkrypcji rRNA u prątka gruźlicy, na drodze bezpośredniej interakcji CarD z podjednostką  $\beta$  polimerazy RNA. Stallings i wsp. udowodnili kluczowe znaczenie tego białka w patogenezie gruźlicy, pokazując na modelu mysim zahamowanie replikacji *M. smegmatis* w przypadku supresji ekspresji białka CarD, zarówno w przypadku aktywnej, jak i latentnej postaci tej choroby [273]. Ponieważ optymalny poziom ekspresji tego białka może mieć fundamentalne znaczenie na płaszczyźnie patogenności prątka gruźlicy, nie można wykluczyć, iż warunkowana indukowaną nadprodukcją białka ABC stale utrzymująca się nadprodukcja białka CarD może prowadzić do zaburzeń procesu transkrypcji rRNA patogenu skutkujących zakłóceniem efektywnego wnikania i wewnątrzkomórkowego wzrostu.

Obserwowane w przypadku szczepu mutanta *MtbABC*↑ osłabione wnikanie i wewnątrzkomórkowy wzrost mogą mieć również związek z odnotowanym spadkiem biosyntezy wielu białek biorących udział w szlakach syntezy różnych komponentów ściany komórkowej prątka gruźlicy, której strukturalne elementy pełnią istotną rolę w interakcji tego patogenu z docelowymi komórkami. Istotne obniżenie poziomu syntezy dotyczyło, m.in., enzymatycznego białka GlgB (Rv1326c), biorącego prawdopodobnie udział w syntezie  $\alpha$ -D-glukanu lub/oraz glikogenu, stanowiących główne składniki zewnętrznej warstwy ściany komórkowej *M. tuberculosis*. Enzym ten katalizuje tworzenie rozgałęzionej formy glikogenu poprzez odłączanie oraz przenoszenie reszt oligoglukozylowych z utworzeniem wiązania typu  $\alpha$ -1,6 [274]. Dane literaturowe wskazują istotny wpływ polisacharydów zewnętrznej warstwy ściany komórkowej *M. tuberculosis* na proces fagocytozy tego patogenu oraz uruchamianie mechanizmów

odpowiedzi odpornościowej gospodarza. Cywes i wsp. zauważyli, iż polisacharydowe komponenty zewnętrznej warstwy ściany komórkowej prątki gruźlicy, w tym  $\alpha$ -glukan, pośredniczą w niezależnym od opsonizacji składowymi dopełniacza wiązaniu *M. tuberculosis* do, jednego z głównych w aspekcie pochłaniania tych bakterii przez fagocyty, receptora CR3 [275]. Biorąc pod uwagę fakt, iż warunkowana interakcją prątki gruźlicy z receptorem CR3 fagocytoza prowadzi do hamowania wybuchu tlenowego oraz supresji wydzielania IL-12 przez monocyty i neutrofile postuluje się, że przebiegająca z udziałem  $\alpha$ -glukanu droga wnikania *M. tuberculosis* do docelowych komórek może być korzystnym mechanizmem, zapewniającym wewnątrzkomórkowy wzrost i przetrwanie tych bakterii [276, 277]. Prowadzone przez Sambou i wsp. badania nad znaczeniem glukanu w fizjologii i wirulencji *M. tuberculosis* pokazały, że enzym GlgB jest kluczowy w procesie wzrostu tych bakterii. Ponadto destabilizacja ekspresji genu *glgB* prowadzi do osłabionej syntezy glukanu i glikogenu w komórkach prątki gruźlicy oraz do zmian w strukturze tych polisacharydów, w porównaniu do wyjściowego szczepu tego patogenu. Efektem niedoboru biosyntezy enzymu GlgB może być akumulacja, słabo rozpuszczalnych w środowisku wodnym, liniowych polimerów  $\alpha$ -glukozyli w cytoplazmie i przestrzeni peryplazmatycznej komórki prątki gruźlicy, determinująca śmierć bakterii [278].

Kolejnymi białkami, których poziom biosyntezy uległ obniżeniu u szczepu mutanta *MtbABC*<sup>↑</sup> są białka MurE (Rv2158c) oraz MptA (Rv2174). Białka te zaangażowane są w syntezę strukturalnych składowych ściany komórkowej prątki gruźlicy, odpowiednio, peptydoglikanu (PG) oraz lipomannanu (LM) i lipoarabinomannanu (LAM). Peptydoglikan ściany komórkowej prątki gruźlicy stabilizuje kształt i turgor komórki bakteryjnej [279]. Podczas biosyntezy peptydoglikanu w cytoplazmie syntetyzowane są rozpuszczalne muropeptydy, które transportowane są przez błonę cytoplazmatyczną do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie podlegają transglikozylacji i transpeptydacji, zależnym od biologicznej aktywności białek wiążących penicylinę (PBPs, *penicillin binding proteins*) [280]. Głównymi enzymami prątki gruźlicy, odpowiedzialnymi za przebiegające w cytoplazmie etapy biosyntezy PG, są syntetazy Mur (ligazy Mur). Syntetaza MurC inicjuje formowanie rdzenia peptydowego UDP-MurNAc (kwas urydyno-difosfo-N-acetylo-muraminowy), poprzez dołączenie L-Alaniny (L-Ala), natomiast syntetazy MurD, MurE i MurF odpowiedzialne są za przyłączanie do peptydu kolejno D-glutaminianu (D-Glu), *mezo*-diaminopimelatu (*m*-DAP) oraz D-alaniny-D-alaniny (D-Ala-D-Ala) tworząc pentapeptydowy rdzeń UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-



*m*-DAP-D-Ala-D-Ala [281]. Geny kodujące syntetazy Mur sąsiadują ze sobą i znajdują się w obrębie zespołu genów *dcw* *M. tuberculosis*, których produkty warunkują także podziały komórkowe. Ponieważ mechanizmy warunkujące podziały komórek prętka gruźlicy wymagają zaangażowania zarówno białek warunkujących biosyntezę PG, jak i podziały komórkowe [279], wskazuje się na istotne znaczenie ich wspólnej transkrypcji w procesie wzrostu mykobakterii. Munshi i wsp. przeprowadzając analizę operonu *dcw* wskazali obecność promotora kierującego jednoczesną transkrypcją genów *mur* syntetaz oraz m.in. sąsiadujących genów kodujących białka podziału komórkowego, takich jak *ftsW* (*rv2154c*), *ftsQ* (*rv2151c*), i *ftsZ* (*rv2150c*). Ponadto zauważono wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami podziału komórkowego a wszystkimi syntetazami Mur, co może stanowić mechanizm ścisłej kontroli delikatnej równowagi pomiędzy procesami tworzenia międzykomórkowej przegrody i wydłużania peptydoglikanu podczas tworzenia komórek potomnych [282].

Ważnym elementem struktury komórek *M. tuberculosis*, umożliwiającym temu patogenowi unikanie odpowiedzi odpornościowej gospodarza, jest jego hydrofobowa, złożona ściana komórkowa, której jednymi z głównych składników są, zawierające mannozę, glikolipidy, mianowicie lipomannan (LM), lipoarabinomannan (LAM) oraz mannozyd fosfatydyloinozytolu (PIM). Komponenty te są zakotwiczone w błonie komórkowej za pośrednictwem fosfatydyloinozytolu (PI) [283]. Ponadto struktura LM i LAM obejmuje szczególnie długi łańcuch, tworzony przez cząsteczki mannozy połączone wiązaniami  $\alpha$ -1-6, który podlega dalszej modyfikacji poprzez dołączanie rozgałęziających go cząsteczek  $\alpha$ -1-2-monomannozy [284]. W przypadku LAM do łańcucha mannozowego dołączane są również cząsteczki arabinianu, który złożony jest z łańcuchów arabinozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,5. Synteza LM i LAM u *M. tuberculosis* jest procesem, w którym za etap wydłużania łańcucha mannozowego odpowiedzialne są  $\alpha$ -1-6-mannozylotransferaza MptA (Rv2174) oraz  $\alpha$ -1-2-mannozylotransferaza (Rv2181) [285, 286]. Badania Fukudy i wsp. wykazały, iż zahamowanie u *M. smegmatis* ekspresji genu *msmeg\_4241*, będącego ortologiem genu *rv2174* *M. tuberculosis*, prowadzi do zaniku dojrzałych form, zarówno LM, jak i LAM oraz akumulacji pośrednich produktów syntezy tych cząsteczek. Ponadto zaobserwowali oni również, iż strukturalne zmiany w obrębie LM i LAM wywołane są zahamowaniem ekspresji  $\alpha$ -1-6-mannozylotransferazy, czego następstwem jest zaburzenie integralności i przepuszczalności ściany komórkowej mykobakterii. Efektem tych zmian u *M. tuberculosis* jest wzrost wrażliwości na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe [287]. Wyniki te

mogą stanowić istotną przesłankę wyjaśniającą osłabione wnikanie komórek szczepu mutanta *MtbABC*↑ do ludzkich makrofagów, która mogłaby być związana ze zmianą w strukturze mannozylowanego lipoarabinomannanu (ManLAM), zaangażowanego w interakcje patogenu z docelową komórką. Jako składowa ściany komórkowej, ManLAM warunkuje bowiem zarówno proces pochłaniania prątka gruźlicy przez fagocyty, przy udziale receptora mannozowego, jak i, m.in., odpowiada za hamowanie dojrzewania fagosomu, ułatwiając wewnątrzkomórkowy wzrost tych bakterii [80].

Przeprowadzona w prezentowanej pracy doktorskiej analiza odpowiedzi transkrypcyjnej *M. tuberculosis* w odpowiedzi na wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A pozwoliła zaobserwować istotne zmiany w transkryptomie tego patogenu. Różnice te dotyczyły, m.in., wzrostu ekspresji genów zlokalizowanych w obrębie 3 operonów, kodujących systemy białek transportowych, mianowicie MmpL5/MmpS5 (Rv0676c-Rv0678), MmpL4/MmpS4 (Rv0450c-Rv0452) oraz białka typu ABC-2 (Rv1217c-Rv1219) odpowiedzialnego za transport antybiotyków.

Jednym z mechanizmów oporności na antybiotyki, wykształconych przez bakterie, jest ograniczenie akumulacji tych substancji wewnątrz komórki poprzez wzrost przepuszczalności ściany komórkowej oraz/lub zwiększenie aktywności pomp wielolekooporności [288, 289]. Białka bakteryjnych pomp wielolekooporności zaklasyfikowano do pięciu grup, wyodrębnionych na podstawie ich strukturalnej morfologii i podobieństwa, źródła energii oraz swoistości substratowej. Obejmują one transportery: nadrodziny ABC zawierające kasetę wiążącą ATP (*ATP-binding cassette*), nadrodziny RND (*resistance-nodulation-cell division*), nadrodziny MFS (*major facilitator superfamily*), rodziny SMR (*small multidrug resistance*) oraz rodziny MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) [290-292]. Do białek transportowych rodziny RND, obecnych u *M. tuberculosis*, zaliczane są białka MmpL (*mycobacterial membrane protein large*), a w genomie tego patogenu zidentyfikowano 14 genów *mmpL* [293, 294]. W strukturze monomerów RND występuje 12 domen przezbłonowych (TDM, *transmembrane domain*) oraz dwie peryplazmatyczne pętle, a transport substratów zachodzi z wykorzystaniem gradientu protonów na drodze antyportu jonów wodorowych H<sup>+</sup> [295, 296]. Niektóre z genów *mmpL* zlokalizowane są w pobliżu sekwencji kodujących białka zaangażowane w metabolizm lipidów oraz biosyntezę poliketydów, co może wskazywać na potencjalny związek białek MmpL z transportem kwasów tłuszczowych [297]. Ponadto niektóre z genów *mmpL*, mianowicie *mmpL1*, *mmpL2*,

*mmpL4* oraz *mmpL5*, wydają się być zorganizowane w postaci operonu regulowanego przez małe białka regulatorowe MmpS, zawierające jedną domenę TDM, zlokalizowaną w części N-końcowej [298]. Wells i wsp. w swoich badaniach nad kompleksami białek MmpL4/MmpS4 i MmpL5/MmpS5 dowiedli, iż ich główna aktywność funkcjonalna związana jest z udziałem w transporcie mykobaktyny (MBT) i karboksymykobaktyny (cMBT) [299]. Mykobaktyna i karboksymykobaktyna należą do grupy mykobakteryjnych związków będących chelatorami jonów żelazowych Fe<sup>3+</sup>, określanymi terminem siderofory, których biosynteza u *M. tuberculosis* jest skutkiem spadku dostępności do jonów żelaza w środowisku wzrostu. Jednym z mechanizmów makrofagów, mającym na celu eliminację zakażenia prątkiem gruźlicy, jest ograniczenie patogenowi dostępu do, niezbędnych dla jego wzrostu, jonów żelaza, poprzez utrzymywanie stałego niskiego poziomu tego pierwiastka wewnątrz fagosomu. Mechanizm ten warunkowany jest przede wszystkim, indukowaną przez INF- $\gamma$ , biologiczną aktywnością białka Nramp1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) makrofagów, zaliczanego do czynników związanych z naturalną odpornością [300, 301]. Synteza MBT i cMBT przez prątka gruźlicy stanowi jego istotny mechanizm patogenności, gdyż zwiększa 20-krotnie poziom biologicznie dostępnych jonów żelaza w środowisku pęcherzyka fagosomalnego, co wskazuje, iż mykobakteryjne siderofory umożliwiają *M. tuberculosis* unikanie powyżej opisanej strategii obronnej komórek gospodarza [302]. Oprócz ustalenia funkcji białek MmpS4 i MmpS5 *M. tuberculosis*, Wells i wsp. ocenili również ich rolę w przebiegu infekcji. Udowodnili, iż delecja genów kodujących oba białka transportujące mykobakteryjne siderofory przyczynia się do osłabienia zdolności prątka gruźlicy do przetrwania w płucach zainfekowanych myszy szczepu BALB/c, na co wskazywała 100-krotnie mniejsza liczba żywych komórek szczepu mutanta w porównaniu do liczby bakterii wyjściowego szczepu prątka gruźlicy. Ponadto osłabieniu podlegał również proces wewnątrzkomórkowego wzrostu *M. tuberculosis* zarówno w tkankach płuc, jak i śledziony. Postuluje się, iż obserwowany efekt spadku wirulencji mutanta *M. tuberculosis*, z delecją genów *mmpS4* i *mmpS5*, związany jest z brakiem zdolności komórek bakterii do pozyskania niezbędnej do wzrostu ilości jonów żelaza, co spowodowane jest zaburzeniem transportu sideroforów [299]. Kompleksy białek MmpL4/MmpS4 i MmpL5/MmpS5 prątka gruźlicy determinują, jednakże, nie tylko transport MBT i cMBT, ale również uczestniczą w recyklingu tych sideroforów. Umożliwia to *M. tuberculosis*, podczas infekcji makroorganizmu, pozyskiwanie jonów żelaza z wykorzystaniem niskiego zapotrzebowania metabolicznego

[303]. W kontekście przedstawionych powyżej danych literaturowych, zanotowany w pracy podwyższony poziom ekspresji genów *mmpL4/mmpS4* i *mmpL5/mmpS5* u *M. tuberculosis*, w odpowiedzi na interakcję z ludzkim surowiczym amyloidem A, może potencjalnie wyjaśniać obserwowaną zwiększoną zdolność osponizowanych badanym białkiem ostrej fazy bakterii do wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania w ludzkich makrofagach. Jednym z mechanizmów wspomagających, bowiem, wzrost prątką gruźlicy w niekorzystnych warunkach wewnątrzkomórkowego mikrośrodowiska fagocytów może być, zależny od kompleksów MmpL4/MmpS4 i MmpL5/MmpS5, efektywny transport i recykling sideroforów warunkujący optymalne pozyskiwanie niezbędnych do wzrostu jonów  $Fe^{3+}$ .

Transportery typu ABC stanowią dużą nadrodzinę wielopodjednostkowych permeaz, odpowiedzialnych za transport różnych cząsteczek przez błony biologiczne, z zachowaniem względnej specyficzności dla danego substratu. W zależności od kierunku transportu substratu, białka te klasyfikowane są jako eksportery lub importery. Białka ABC eksportowe, występujące zarówno u eukariota i prokariota, odpowiedzialne są za transport substratów z cytoplazmy na zewnątrz komórki, co w przypadku prokariota związane jest, m.in. z usuwaniem leków i antybiotyków. Struktura prokariotycznych białek ABC obejmuje cztery domeny: dwie hydrofobowe domeny przezbłonowe MSDs (*membrane spinning domains*) oraz dwie hydrofilowe domeny cytoplazmatyczne NBDs (*nucleotide binding domains*) wiążące i hydrolizujące ATP. Z kolei importery ABC występują wyłącznie u prokariota i zaangażowane są w pobieranie zewnątrzkomórkowych substratów. Ich funkcjonalna aktywność zależna jest od kooperacji ze zlokalizowanym w peryplazmie, wiążącym substrat, białkiem SBP (*substrate binding protein*). W oparciu o szeroką analizę genów kodujących transportery ABC i ich stopień homologii, Braibant i wsp. zaproponowali podział tych białek ze względu na różnice w sekwencji aminokwasowej konserwatywnej domeny NBDs. Na podstawie tych nowych kryteriów autorzy wykazali, iż cechą charakterystyczną prątką gruźlicy jest obecność 9. różnych podrodzin transporterów ABC [304], spośród których, w prezentowanej pracy, podwyższoną ekspresję, po związaniu przez *M. tuberculosis* ludzkiego A-SAA1, zaobserwowano w przypadku genów *rv1217c* i *rv1218c*. Produkty tych dwóch genów należą do podrodziny białek ABC odpowiedzialnej za transport wielu związków chemicznych i antybiotyków, w tym nowobiocyny, arylpiperazyny, pirydyny, bis-anilinopirymidyny, pirolu i pirazolonów [305]. Analiza profilu ekspresji genów *rv1217c-rv1218c*, kodujących transporter ABC Rv1217c-Rv1218c, u klinicznych

izolatów *M. tuberculosis* MDR opornych na leki przeciwprątkowe, wykazała znaczący wzrost poziomu ekspresji obu badanych genów w porównaniu do referencyjnego szczepu H37Rv. Ponadto, po raz pierwszy, zanotowana została korelacja pomiędzy nadekspresją genów *rv1217c* i *rv1218c* a wzrostem minimalnego stężenia (MIC, *minimal inhibitory concentration*) rifampicyny, hamującego wzrost drobnoustrojów. Natomiast, w przypadku izoniazydu wzrost stężenia MIC powiązany był jedynie z nasileniem poziomu ekspresji genu *rv1218c* [306]. Nadekspresja białek pomp wielolekooporności, w tym transporterów typu ABC, była niejednokrotnie opisywana w przypadku występowania oporności na różne dostępne w leczeniu gruźlicy antybiotyki. Mechanizm ten opisali m.in. Choudhuri i wsp., którzy badając ekspresję pompy DrrAB, kodowanej przez geny *drrA* i *drrB*, wykazali udział tego transportera w nabywaniu oporności przez mykobakterie na wiele niepowiązanych ze sobą strukturalnie antybiotyków, takich jak tetracyklina, erytromycyna, etambutol, norfloksacyna, streptomycyna i chloramfenikol [307]. Prowadząca zatem do nadekspresji genów *rv1217c* i *rv1218c* interakcja *M. tuberculosis* z surowiczym amyloidem A może być rozpatrywana jako potencjalny, prominentny mechanizm zmniejszający wrażliwość tego patogenu na związki o aktywności przeciwprątkowej.

Przeprowadzona w prezentowanej pracy analiza odpowiedzi transkrypcyjnej prątko gruźlicy na wiązanie surowiczego amyloidu A, z jednej strony, wskazuje, iż interakcja ta pobudza u tego patogenu mechanizmy sprzyjające jego przetrwaniu w niekorzystnych warunkach środowiskowych, jednakże, z drugiej strony, stwierdzono także obniżenie poziomu ekspresji, m.in. odpowiedzialnego za naprawę DNA genu *end* (*rv0670*) kodującego endonukleazę IV. W wewnątrzkomórkowym mikrośrodowisku ludzkich makrofagów prątek gruźlicy stale narażony jest na działanie mutagennych reaktywnych form tlenu i azotu. Aby przetrwać w warunkach stresu oksydacyjnego patogen ten posiada szereg mechanizmów naprawy uszkodzonego DNA [308, 309]. Jednym z nich jest naprawa poprzez wycinanie zasad azotowych (BER, *base excision repair*) [308, 309], w której dochodzi do powstania miejsc apurynowych/apirymidynowych (miejsce AP), gdzie utrata uszkodzonej zasady w nici DNA pojawia się spontanicznie lub pod wpływem działania enzymu glikozylazy DNA [310-312]. Miejsca AP mogą wpływać na stabilność genomu poprzez blokowanie replikacji lub prowadzić do powstawania mutacji [313, 314]. Puri i wsp. wykazali obecność dwóch enzymów u *M. tuberculosis* odpowiedzialnych za usuwanie miejsc AP, mianowicie endonukleazy III (XthA) oraz endonukleazy IV (End), kodowanych,

odpowiednio, przez geny *end* (rv0670) oraz *xthA* (rv0427c). Badacze wykazali, iż u *M. tuberculosis* endonukleaza End jest główną endonukleazą AP oraz charakteryzuje się ona wyższą aktywnością enzymatyczną w porównaniu do endonukleazy XthA, co może sugerować, że pełni ona istotną rolę w ochronie tego patogenu przed uszkodzeniami DNA wywołanymi stresem oksydacyjnym [315]. Obniżony poziom ekspresji endonukleazy IV End u *M. tuberculosis*, w następstwie interakcji tego patogenu z ludzkim surowiczym amyloidem A, może potencjalnie prowadzić do zaburzeń procesu naprawy uszkodzeń DNA u pochłoniętych przez makrofagi bakterii, pojawiających się wskutek obecności w środowisku wzrostu reaktywnych form tlenu i azotu. Indukowane poprzez interakcję z białkami gospodarza osłabienie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces naprawy DNA u prątka gruźlicy jest potencjalnie korzystnym mechanizmem na płaszczyźnie uruchamianej odpowiedzi odpornościowej i eliminacji czynnika zakaźnego. Jednak należy brać pod uwagę, że podwyższona częstość mutacji może prowadzić do łatwiejszego nabywania lekooporności przez prątka gruźlicy i przeżywania szczepów mutantów podczas terapii.

Przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań doświadczalnych posiadają niewątpliwie unikatowy charakter, gdyż po raz pierwszy: a) opisują zdolność *M. tuberculosis* do wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A, b) potwierdzają istotny udział mykobakteryjnych, powierzchniowych białek AtpA i ABC w obserwowanej interakcji oraz c) pioniersko opisują wpływ tego zjawiska na zarówno wczesne etapy inwazji ludzkich makrofagów, jak i zmiany w transkryptomie prątka gruźlicy. Uzyskane wyniki wskazują, iż surowiczy amyloid A ostrej fazy jest istotnym, w patogenezie gruźlicy, potencjalnym krążącym receptorem rozpoznającym konserwatywne wzorce molekularne *M. tuberculosis*, natomiast wiązanie A-SAA1 może prowadzić do uruchomienia i hamowania mechanizmów korzystnych, odpowiednio, zarówno dla samego patogenu, jaki i dla zakażonego makroorganizmu. Badania te są kluczowe nie tylko ze względu na ich poznawczy aspekt, prowadzący do wyjaśnienia nie poznanych dotąd interakcji prątka gruźlicy z elementami wrodzonej odpowiedzi odpornościowej gospodarza, ale także stanowią niezbędny nurt w odkrywaniu nowych miejsc docelowych dla nowoczesnych i efektywnych leków przeciwprątkowych oraz opracowania skutecznych narzędzi immunoprofilaktyki gruźlicy.

## **ROZDZIAŁ 8**

***STRESZCZENIE***

## 8. STRESZCZENIE

Gruźlica jest jedną z najgroźniejszych chorób człowieka i drugą wiodącą przyczyną śmiertelności ludzi na świecie z powodu chorób zakaźnych. Czynnikiem etiologicznym gruźlicy jest wewnątrzkomórkowy patogen *Mycobacterium tuberculosis*, który rozprzestrzenił się na całej kuli ziemskiej infekując 1/3 populacji ludzkiej. Jako drobnoustrój prątek gruźlicy charakteryzuje się wysokim sukcesem ewolucyjnym, przejawiającym się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi związanymi z wykształceniem złożonych mechanizmów patogenności determinowanych m.in. przez interakcje z elementami wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Konsekwencją tych oddziaływań może być nie tylko efektywne manipulowanie mechanizmami obronnymi gospodarza, ale również ich wykorzystywanie w celu ułatwienia inwazji komórek docelowych. Po przedostaniu się przez naturalne bariery mechaniczne oraz górne drogi oddechowe i dotarciu do pęcherzyków płucnych prątek gruźlicy indukuje mechanizmy obronne makroorganizmu, których wstępnym etapem jest rozpoznanie konserwatywnych struktur antygenowych tych bakterii (PAMPs) przez krążące lub błonowe receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów (PRRs), stanowiące istotny element wrodzonej odpowiedzi odpornościowej.

W obrębie mikrośrodowiska pęcherzyków płucnych dochodzi do interakcji prątka gruźlicy z różnymi błonowymi – receptor TLR, receptory dla składowych dopełniacza (CR), receptory mannozowe (MR), oraz krążącymi – składowe dopełniacza, lektyna wiążąca mannozę (MBL), fikoliny, białka surfaktantu płuc A i D, kolektyna 11 (CL-11), receptorami PRRs, ale także z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, mianowicie fibronektyną, lamininą i heparyną. Te złożone oddziaływania mają strategiczne znaczenie zarówno na płaszczyźnie rozpoznawania patogenu i aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, determinujących rozwój efektywnej odpowiedzi odpornościowej, jak i są kluczowe dla samego czynnika zakaźnego umożliwiając przyleganie oraz dalsze wnikanie, wewnątrzkomórkowe przeżywanie i namnażanie prątka gruźlicy w komórkach docelowych.

Przedmiotem badań prezentowanej pracy doktorskiej była ocena interakcji *M. tuberculosis* z ludzkim surowicznym amyloidem A (A-SAA1), zaliczanym do głównych, pozytywnych białek reakcji ostrej fazy. Białko to jest czynnikiem o plejotropowej aktywności, która związana jest z jego wysokim immunomodulacyjnym



potencjałem, warunkowanym prozapalnymi jak i przeciwzapalnymi właściwościami A-SAA1, wynikającymi ze zdolności pobudzania mechanizmów nasilających i hamujących procesy zapalne, takich jak syntezy wielu cytokin i chemokin przez komórki uczestniczące w odpowiedzi odpornościowej. Ponadto surowiczy amyloid A charakteryzuje się aktywnością opsonizacyjną w stosunku do wielu bakterii Gram-ujemnych nasilając proces ich fagocytozy przez makrofagi i neutrofile.

Otrzymane w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań po raz pierwszy wykazują zdolność *M. tuberculosis* do swoistego wiązania A-SAA1 oraz zaangażowanie w tym procesie powierzchniowych ligandów tych bakterii, mianowicie białek AtpA (Rv1308) i ABC (Rv2477c). Ponadto przeprowadzone prace doświadczalne sugerują, iż surowiczy amyloid A ostrej fazy jest istotnym, w patogenezie gruźlicy, potencjalnym krążącym receptorem rozpoznającym konserwatywne wzorce molekularne *M. tuberculosis*, a wiązanie A-SAA1 przez prętka gruźlicy może stanowić istotny mechanizm warunkujący patogenowi osiągnięcie wewnątrzkomórkowej niszy. Dodatkowo, interakcja *M. tuberculosis* z A-SAA1, prowadząca do istotnych zmiany w odpowiedzi funkcjonalnej tych bakterii na poziomie transkryptomu, może także odgrywać zasadniczą rolę na płaszczyźnie potencjału adaptacyjnego tego patogenu.

Nurt doświadczalny, w który wpisują się badania przeprowadzone w prezentowanej pracy doktorskiej, rozpatrywany jest jako kluczowy, nie tylko ze względu na jego poznawczy aspekt, prowadzący do wyjaśnienia niepoznanych dotąd interakcji prętka gruźlicy z elementami wrodzonej odpowiedzi odpornościowej gospodarza, ale także ze względu na jego fundamentalne znaczenie w opracowaniu nowoczesnych terapii przeciwprątkowych oraz opracowania skutecznych narzędzi immunoprofilaktyki gruźlicy.

# **ROZDZIAŁ 9**

## ***SUMMARY***

## 9. SUMMARY

Tuberculosis is still one of the most threatening human infectious disease and the second leading cause of mortality worldwide. *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is a species of pathogenic intracellular bacteria which has spread intensively across the globe infecting a third of humanity. As a pathogen, *M. tuberculosis* is characterized by high evolutionary success, manifested by outstanding adaptive properties related to the development of a plethora of sophisticated mechanisms, including interactions with elements of the host innate immunity. A consequence of such interactions may not only be the effective manipulations of host innate immunity mechanisms, but also their use to ensure the invasion of the host phagocytes succeeds. After crossing the natural mechanical barriers and upper respiratory tract, and reaching the pulmonary alveoli the invading *M. tuberculosis* initiates the host innate defenses. These begin with pattern recognition of the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and are performed by a conserved group of the host membrane-bound and soluble molecules (PRRs), which are an important element of the innate immune response.

Within the alveolar microenvironment *M. tuberculosis* interacts with the host membrane-bound PRRs receptors, such as Toll-like receptors, complement receptors (CR) and mannose binding receptors (MBL), and soluble PRRs receptors including complement components, mannose binding lectin (MBL), ficolins, collectin 11 (CL-11) and surfactant proteins A and D, as well as extracellular matrix proteins, namely fibronectin, laminin and heparin. These complex interactions are of strategic importance both in the pathogen recognition and activation of intracellular signaling pathways, which determine the development of an effective immune response, and are also crucial for the pathogen itself, allowing for adherence, intracellular multiplication and survival of *M. tuberculosis* in target cells.

The subject of the research in the presented dissertation was the evaluation of the interaction of *M. tuberculosis* with human serum amyloid A (A-SAA1), which is a major positive acute phase protein. Acute phase A-SAA1 is a factor with pleiotropic activity related to its high immunomodulatory potential. This is determined by the pro- and anti-inflammatory properties of A-SAA1 resulting from its ability to stimulate the

mechanisms that intensify and inhibit inflammatory processes, namely cytokine and chemokine synthesis by cells participating in immune response. Furthermore, serum amyloid A functions as an innate immune opsonin for many Gram-negative bacteria, resulting in an increased number of bacterial cells being engulfed by macrophages and neutrophils.

The results obtained during realization of the doctoral dissertation revealed, for the first time, the ability of *M. tuberculosis* to specifically bind A-SAA1, and the involvement of the surface ligands of these bacteria, more specifically the AtpA (Rv1308) and ABC (Rv2477c) proteins, in this interplay. Moreover, the conducted experimental studies suggest that serum amyloid A is an important, in the pathogenesis of tuberculosis, potential soluble pattern recognition receptor that recognizes the pathogen-associated molecular patterns of *M. tuberculosis*, and that the binding of A-SAA1 may be an important mechanism for the pathogen to reach an intracellular niche. In addition, the interaction of *M. tuberculosis* with A-SAA1 significantly affects the functional response of these bacteria at the transcriptional level which may play an essential role in the adaptive potential of this pathogen.

The experimental trend, of which the conducted studies are part, is considered as crucial not only because of the explanation of unresolved aspects of interaction of pathogenic mycobacteria with elements of the innate immunity of the human host, but also because of its fundamental importance in the development of modern antituberculosis therapies as well as the development of effective tools for the immunoprophylaxis of tuberculosis.

# **ROZDZIAŁ 10**

***DOROBEK NAUKOWY***

## 10.DOROBEK NAUKOWY

### 10.1. Wykaz publikacji

1. *Two-Year Follow-up Study of Mycobacterium tuberculosis Antigen-Driven IFN- $\gamma$  Responses and Macrophage sCD14 Levels After Tuberculosis Contact*, M. Druszczyńska, M. Włodarczyk, G. Kielnierowski, **M. Kawka**, W. Rudnicka, Indian Journal of Microbiology, 2016, 56(2): 205-213. IF<sub>2016</sub>=0,899, MNiSW<sub>2016</sub>=15 (40)
2. *Evaluation of the Mycobactericidal Effect of Thio-functionalized Carbohydrate Derivatives*, M. Korycka-Machała, A. Brzostek, B. Dziadek, **M. Kawka**, T. Popławski, Z. J. Witczak, J. Dziadek, Molecules, 2017, 22, 812. IF<sub>2017</sub>=2,465, MNiSW=30 (100)
3. *1H-benzo[d]imidazole derivatives affect MmpL3 in Mycobacterium tuberculosis*, M. Korycka-Machała, A. Viljoen, J. Pawełczyk, P. Borówka, B. Dziadek, K. Gobis, A. Brzostek, **M. Kawka**, M. Blaise, D. Strapagiel, L. Kremer, J. Dziadek, Antimicrob Agents Chemother, 2019, pii:AAC.00441-19. IF<sub>2019</sub>=4,904, MNiSW=140
4. *The Impact of the Antigenic Composition of Chimeric Proteins on Their Immunoprotective Activity against Chronic Toxoplasmosis in Mice*, J. Gatkowska, K. Dzitko, B. T. Ferrá, L. Holec-Gąsior, **M. Kawka**, B. Dziadek, Vaccines, 2019, 7, 154. IF<sub>2019</sub>=4,760, MNiSW=140
5. *PPE51 Is Involved in the Uptake of Disaccharides by Mycobacterium tuberculosis*, M. Korycka-Machała, J. Pawełczyk, P. Borówka, B. Dziadek, A. Brzostek, **M. Kawka**, A. Bekier, S. Rykowski, A. B. Olejniczak, D. Strapagiel, Z. Witczak, J. Dziadek, Cells, 2020, 9, 603. IF<sub>2020</sub>=4,366, MNiSW=140

6. *The immunogenic and immunoprotective activities of recombinant chimeric T. gondii proteins containing AMA1 antigen fragments*, J. Gatkowska, K. Dzitko, B. T. Ferra, L. Holec-Gąsior, M. Kawka, B. Dziadek, *Vaccines*, 2020, 8(4), 724. IF<sub>2020</sub>=4,086, MNiSW=140

**Łączny Impact Factor (IF) = 21,48**

**Punkty MNiSW = 700**

**h-index = 2**

## 10.2. Publikacje popularno-naukowe

1. *Antybiotykooporność drobnoustrojów w kontekście aktualnego raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO)*. E. Ograczyk, S. Wawrocki, A. Gajewski, **M. Kawka**, W. Gonciarz, K. Rudnicka, B. Sadowska, M. Chmiela, LAB Laboratorium Aparatura Badania, 2017, nr 4

## 10.3. Doniesienia konferencyjne

### 10.3.1. Konferencje zagraniczne

1. *Towards anti-Toxoplasma vaccine: the immunogenic and protective activity of recombinant chimeric Toxoplasma gondii proteins*, J. Gatkowska, B. Ferra, K. Dzitko, **M. Kawka**, H. Długońska, L. Holec-Gąsior, B. Dziadek, Toxo-14, Tomar, Portugalia, 31.05 – 04.06, 2017 (plakat)
2. *Mycobacterium tuberculosis ABC, AtpA, ThiC, EspB, TB 18.6 proteins function as the human SAA-binding effectors*, **M. Kawka**, K. Dzitko, A. Brzostek, J. Kryczka, J. Dziadek, B. Dziadek, Young Researchers in Life Sciences 2018, Paryż, Francja 02.05 – 04.05, 2018 (plakat)
3. *Proteome analysis of recombinant M. tuberculosis strains relative to “wild type” strain in the context of their participation in phagocytosis*, **M. Kawka**, A. Brzostek, J. Dziadek, B. Dziadek, 10<sup>th</sup> Yung Researchers in Life Sciences, Paryż, 04.06 – 06.06, 2019 (plakat)

4. *Tiosemicarbazide derivatives as potent anti-Mykobacterium tuberculosis compounds in vitro*, A. Bekier, **M. Kawka**, L. Węglińska, A. Paneth, B. Dziadek, K. Dzitko, 10<sup>th</sup> Yung Researchers in Life Sciences, Paryż, 04.06 – 06.06, 2019 (wystąpienie ustne)

### 10.3.2. Konferencje krajowe

1. *Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez Mykobacterium tuberculosis*, **M. Kawka**, B. Dziadek, K. Dzitko, J. Dziadek, II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, Łódź, 12.05 – 14.05, 2016 (plakat)
2. *Interakcja patogennych i niepatogennych prątków z ludzkim surowiczym amyloidem A (SAA) oraz identyfikacja ligandów M. tuberculosis wiążących ludzki SAA*, **M. Kawka**, B. Dziadek, K. Dzitko, J. Dziadek, XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego, Bydgoszcz, 25.10 – 27.10, 2016 (plakat)
3. *Identyfikacja białek Mykobacterium tuberculosis wiążących ludzki surowiczy amyloid A (SAA)*, **M. Kawka**, K. Dzitko, J. Dziadek, B. Dziadek, III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, Łódź, 11.05 – 12.05, 2017 (plakat)
4. *Interactions of Mykobacterium tuberculosis proteins with human serum amyloid A*, **M. Kawka**, K. Dzitko, J. Dziadek, B. Dziadek, XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa, 08.06 – 10.06, 2017 (prezentacja ustna)
5. *Interaction of pathogenic and non-pathogenic mycobacteria with human serum amyloid A (SAA)*, **M. Kawka**, K. Dzitko, J. Dziadek, B. Dziadek, MIKROBIOT 2017, Łódź, 19.10 – 21.10, 2017 (prezentacja ustna)
6. *Immunogenic and protective activity of recombinant chimeric Toxoplasma gondii proteins*, J. Gatkowska, B. Ferra, K. Dzitko, **M. Kawka**, H. Długońska,



- L. Holec-Gąsior, B. Dziadek XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa, 08.06 – 10.06, 2017 (plakat)
7. *Ocena aktywności immunogennej i ochronnej rekombinowanych białek fuzyjnych *Toxoplasma gondii**, J. Gatkowska, B. Ferra, K. Dzitko, **M. Kawka**, H. Długońska, L. Holec-Gąsior, B. Dziadek, Ogólnopolska Konferencja Mikrobiologów i Biotechnologów, Gdańsk, 06.10 – 09.10, 2017 (plakat)
8. *Pochodne tiazolu z cyklopropylowym fragmentem o aktywności przeciw-*Toxoplasma gondii* w badaniach in vitro*, A. Bekier, K. Łączkowski, J. Gatkowska, **M. Kawka**, B. Dziadek, K. Dzitko, II Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź, 08.06, 2018 (plakat)
9. *Pochodne tiosemikarbazydów o aktywności przeciw-*Mycobacterium tuberculosis* w badaniach in vitro*, **M. Kawka**, A. Bekier, A. Paneth, L. Węglińska, J. Gatkowska, K. Dzitko, B. Dziadek, II Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź, 08.06, 2018 (plakat)
10. **Mycobacterium tuberculosis*-human serum amyloid A interplay and its consequences for both pathogen and host*, **M. Kawka**, A. Brzostek, R. Płocińska, P. Płociński, J. Kryczka, K. Dzitko, J. Dziadek, B. Dziadek, 8<sup>th</sup> International Weigl Conference, Łódź, 26.06 – 28.06, 2019 (plakat)
11. *Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych tiosemikarbazydu in vitro*, A. Bekier, **M. Kawka**, A. Paneth, L. Węglińska, B. Dziadek, K. Dzitko, V Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, Łódź, 30.05 – 31.05, 2019 (wystąpienie ustne)
12. *Profil lekowrażliwości szczepów *Toxoplasma gondii* w badaniach in vitro oraz in vivo*, A. Bekier, J. Gatkowska, **M. Kawka**, B. Dziadek, K. Dzitko, XXII Sympozjum Naukowe „Postępy w Medycynie Zakażeń”, Warszawa, 07.12 - 08.12, 2018 (prezentacja ustna)

- 13. *Vaccine potential of recombinant Toxoplasma gondii chimeric proteins*,  
J. Gatkowska, K. Dzitko, B. Ferra, L. Holec-Gąsior, **M. Kawka**, B. Dziadek, 8<sup>th</sup>  
International Weigl Conference, Łódź, 26.06 – 28.06, 2019 (plakat)**

#### **10.4. Staże naukowe**

- 1. University of Texas Health Science Center at Tyler, Tyler, Texas, USA,  
Visiting Scientist, kwiecień – październik, 2014**
- 2. Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Pracownia Genetyki i  
Fizjologii Mycobacterium, Łódź, Polska, kwiecień – październik, 2015**

#### **10.5. Projekty naukowe**

- 1. *Identyfikacja ligandów Mycobacterium tuberculosis wiążących ludzki surowiczy amyloid A (SAA) oraz określenie biologicznej roli interakcji prątków gruźlicy z SAA*, OPUS 12, 2016/23/B/NZ7/01204 – współwykonawca**
- 2. *Analiza porównawcza proteomu rekombinowanych szczepów Mycobacterium tuberculosis z nadprodukcją białka Rv2477c i Rv1308 do proteomu kontrolnego szczepu typu dzikiego H37Rv*, dofinansowanie zadania badawczego dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, 2018**
- 3. *Ocena aktywności immunogennej i immunoprotekcyjnej szczepionek DNA kodujących wieloantigenowe białka chimeryczne i fuzyjne Toxoplasma gondii*, SONATA 14, 2018/31/D/NZ6/02839 – współwykonawca**

# **ROZDZIAŁ 11**

## ***BIBLIOGRAFIA***

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1):3-66. Epub 2012/10/17. doi: 10.4161/viru.22329. PubMed PMID: 23076359; PubMed Central PMCID: PMC3544749.
2. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg*. 2017;58(1):E9-E12. PubMed PMID: 28515626; PubMed Central PMCID: PMC5432783.
3. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):359-67. doi: 10.1128/jcm.41.1.359-367.2003. PubMed PMID: 12517873; PubMed Central PMCID: PMC149558.
4. Gradmann C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Med Hist*. 2001;45(1):1-32. doi: 10.1017/s0025727300000028. PubMed PMID: 11235050; PubMed Central PMCID: PMC1044696.
5. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(3):196-201. doi: 10.1111/1469-0691.12555. PubMed PMID: 24450600.
6. Chakraborty S, Rhee KY. Tuberculosis Drug Development: History and Evolution of the Mechanism-Based Paradigm. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(8):a021147. Epub 2015/04/15. doi: 10.1101/cshperspect.a021147. PubMed PMID: 25877396; PubMed Central PMCID: PMC4526730.
7. Murray JF, Schraufnagel DE, Hopewell PC. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(12):1749-59. doi: 10.1513/AnnalsATS.201509-632PS. PubMed PMID: 26653188.
8. Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica (Bucur)*. 2013;8(1):53-8. PubMed PMID: 24023600; PubMed Central PMCID: PMC3749764.
9. Global tuberculosis report 2019. 2019.
10. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2019 - 2017 data: World Health Organization Regional Office in Europe/European Centre for Disease Prevention and Control; 2019.
11. Gruzlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2018 roku: Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc; 2019.
12. Treatment of tuberculosis: guidelines 4th edition: World Health Organization.
13. Migliori GB, De Iaco G, Besozzi G, Centis R, Cirillo DM. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill*. 2007;12(5):E070517.1. Epub 2007/05/17. doi: 10.2807/esw.12.20.03194-en. PubMed PMID: 17868596.
14. Lugton I. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(4):364-72. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00836.x. PubMed PMID: 10457205.
15. Ryu JH, Kim CH, Yoon JH. Innate immune responses of the airway epithelium. *Mol Cells*. 2010;30(3):173-83. Epub 2010/09/17. doi: 10.1007/s10059-010-0146-4. PubMed PMID: 20878312.

16. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol.* 2015;16(1):27-35. doi: 10.1038/ni.3045. PubMed PMID: 25521682; PubMed Central PMCID: PMC4318521.
17. Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword? *Biomed Res Int.* 2013;2013:179174. Epub 2013/11/12. doi: 10.1155/2013/179174. PubMed PMID: 24350246; PubMed Central PMCID: PMC43844256.
18. Rajaram MV, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol.* 2014;26(6):471-85. Epub 2014/10/30. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.010. PubMed PMID: 25453226; PubMed Central PMCID: PMC4314327.
19. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003;73(2):209-12. doi: 10.1189/jlb.0602325. PubMed PMID: 12554797.
20. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(2):81-93. Epub 2014/01/21. doi: 10.1038/nri3600. PubMed PMID: 24445666.
21. Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity.* 2006;24(4):366-8. doi: 10.1016/j.immuni.2006.03.008. PubMed PMID: 16618595.
22. Rajaram MV, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol.* 2010;185(2):929-42. Epub 2010/06/16. doi: 10.4049/jimmunol.1000866. PubMed PMID: 20554962; PubMed Central PMCID: PMC3014549.
23. Hoidal JR, Schmeling D, Peterson PK. Phagocytosis, bacterial killing, and metabolism by purified human lung phagocytes. *J Infect Dis.* 1981;144(1):61-71. doi: 10.1093/infdis/144.1.61. PubMed PMID: 7021701.
24. Greening AP, Lowrie DB. Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infections. *Clin Sci (Lond).* 1983;65(6):661-4. doi: 10.1042/cs0650661. PubMed PMID: 6627851.
25. Lyons CR, Ball EJ, Toews GB, Weissler JC, Stastny P, Lipscomb MF. Inability of human alveolar macrophages to stimulate resting T cells correlates with decreased antigen-specific T cell-macrophage binding. *J Immunol.* 1986;137(4):1173-80. PubMed PMID: 2426354.
26. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:405310. Epub 2011/04/07. doi: 10.1155/2011/405310. PubMed PMID: 21603213; PubMed Central PMCID: PMC3095423.
27. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G, et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med.* 1993;177(2):397-407. doi: 10.1084/jem.177.2.397. PubMed PMID: 8426110; PubMed Central PMCID: PMC2190916.
28. Roth MD, Golub SH. Human pulmonary macrophages utilize prostaglandins and transforming growth factor beta 1 to suppress lymphocyte activation. *J Leukoc Biol.* 1993;53(4):366-71. doi: 10.1002/jlb.53.4.366. PubMed PMID: 8482916.
29. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev.* 2015;264(1):182-203. doi: 10.1111/imr.12266. PubMed PMID: 25703560; PubMed Central PMCID: PMC4368383.

30. Khan A, Singh VK, Hunter RL, Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J Leukoc Biol.* 2019;106(2):275-82. Epub 2019/04/02. doi: 10.1002/JLB.MR0318-095RR. PubMed PMID: 30938876.
31. Monin L, Khader SA. Chemokines in tuberculosis: the good, the bad and the ugly. *Semin Immunol.* 2014;26(6):552-8. Epub 2014/10/22. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.004. PubMed PMID: 25444549; PubMed Central PMCID: PMC4314384.
32. Algood HM, Lin PL, Yankura D, Jones A, Chan J, Flynn JL. TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b+ cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2004;172(11):6846-57. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.6846. PubMed PMID: 15153503.
33. Schäfer G, Jacobs M, Wilkinson RJ, Brown GD. Non-opsonic recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by phagocytes. *J Innate Immun.* 2009;1(3):231-43. Epub 2008/11/12. doi: 10.1159/000173703. PubMed PMID: 20375581; PubMed Central PMCID: PMC4312845.
34. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 2000;288(5471):1647-50. doi: 10.1126/science.288.5471.1647. PubMed PMID: 10834844.
35. Espitia C, Rodríguez E, Ramón-Luing L, Echeverría-Valencia G, Vallecillo AJ. Host-Pathogen Interactions in Tuberculosis, Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of *Mycobacterium Tuberculosis* Pathogenicity. InTech. 2012.
36. Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature.* 2014;505(7482):218-22. Epub 2013/12/15. doi: 10.1038/nature12799. PubMed PMID: 24336213; PubMed Central PMCID: PMC43961847.
37. Mottola G. The complexity of Rab5 to Rab7 transition guarantees specificity of pathogen subversion mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:180. Epub 2014/12/22. doi: 10.3389/fcimb.2014.00180. PubMed PMID: 25566515; PubMed Central PMCID: PMC4273659.
38. Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, et al. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell.* 2007;130(1):37-50. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.043. PubMed PMID: 17632055.
39. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999;97(4):435-47. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80754-0. PubMed PMID: 10338208.
40. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, et al. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002507. Epub 2012/02/02. doi: 10.1371/journal.ppat.1002507. PubMed PMID: 22319448; PubMed Central PMCID: PMC3271072.
41. Chen Z, Wang T, Liu Z, Zhang G, Wang J, Feng S, et al. Inhibition of Autophagy by MiR-30A Induced by *Mycobacteria tuberculosis* as a Possible Mechanism of Immune Escape in Human Macrophages. *Jpn J Infect Dis.* 2015;68(5):420-4. Epub 2015/04/10. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.466. PubMed PMID: 25866116.
42. Ryndak MB, Laal S. Primary Infection and Dissemination: A Critical Role for Alveolar Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:299. Epub 2019/08/21. doi: 10.3389/fcimb.2019.00299. PubMed PMID: 31497538; PubMed Central PMCID: PMC6712944.

43. Nguyen L, Pieters J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 2005;15(5):269-76. doi: 10.1016/j.tcb.2005.03.009. PubMed PMID: 15866031.
44. Schorey JS, Schlesinger LS. Innate Immune Responses to Tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2016;4(6). doi: 10.1128/microbiolspec.TB2-0010-2016. PubMed PMID: 28087945.
45. de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: a narrative review. *Front Pediatr.* 2019;7:350. Epub 2019/08/27. doi: 10.3389/fped.2019.00350. PubMed PMID: 31508399; PubMed Central PMCID: PMC6718705.
46. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11(9):785-97. Epub 2010/08/19. doi: 10.1038/ni.1923. PubMed PMID: 20720586; PubMed Central PMCID: PMC2924908.
47. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol.* 1994;152(2):743-53. PubMed PMID: 8283049.
48. Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990;144(7):2771-80. PubMed PMID: 2108212.
49. Ferguson JS, Weis JJ, Martin JL, Schlesinger LS. Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun.* 2004;72(5):2564-73. doi: 10.1128/iai.72.5.2564-2573.2004. PubMed PMID: 15102764; PubMed Central PMCID: PMC387845.
50. Slavica Dodig, Daniela Galez, Ivka Zoričić-Letoja, Branka Kristić-Kirin, Kornelija Kovač, Boro Nogalo, et al. C-reactive protein and complement components C3 and C4 in children with latent tuberculosis infection. *Biochemia Medica.* 2008;18(1). doi: 10.11613/BM.2008.007.
51. Dubaniewicz A, Sztaba-Kania M, Hoppe A. Analysis of some immunological parameters in pulmonary tuberculosis. *Pol Merkur Lekarski.* 2004;16(92):123-7. PubMed PMID: 15176294.
52. Manivannan S, Rao NV, Ramanathan VD. Role of complement activation and antibody in the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages. *Indian J Exp Biol.* 2012;50(8):542-50. PubMed PMID: 23016491.
53. Mueller-Ortiz SL, Wanger AR, Norris SJ. Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infect Immun.* 2001;69(12):7501-11. doi: 10.1128/IAI.69.12.7501-7511.2001. PubMed PMID: 11705926; PubMed Central PMCID: PMC98840.
54. Delogu G, Brennan MJ. Functional domains present in the mycobacterial hemagglutinin, HBHA. *J Bacteriol.* 1999;181(24):7464-9. doi: 10.1128/JB.181.24.7464-7469.1999. PubMed PMID: 10601202; PubMed Central PMCID: PMC94202.
55. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science.* 1997;277(5329):1091-3. doi: 10.1126/science.277.5329.1091. PubMed PMID: 9262476.
56. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998;66(4):1277-81. doi: 10.1128/IAI.66.4.1277-1281.1998. PubMed PMID: 9529042; PubMed Central PMCID: PMC108049.
57. Malik ZA, Denning GM, Kusner DJ. Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival

- within human macrophages. *J Exp Med.* 2000;191(2):287-302. doi: 10.1084/jem.191.2.287. PubMed PMID: 10637273; PubMed Central PMCID: PMCPMC2195750.
58. Denlinger LC, Fiset PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem.* 1996;271(1):337-42. doi: 10.1074/jbc.271.1.337. PubMed PMID: 8550583.
  59. Chen BC, Chou CF, Lin WW. Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric-oxide synthase induction in J774 macrophages. Role of intracellular calcium. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29754-63. doi: 10.1074/jbc.273.45.29754. PubMed PMID: 9792689.
  60. Cisowska A., Tichaczek-Goska D., Goska W. Aktywność przeciwważakazna ludzkiej lektyny wiążącej mannozę (MBL). *Post Mikrobiol.* 2007;46(3):249-61.
  61. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003;40(7):423-9. doi: 10.1016/s0161-5890(03)00155-x. PubMed PMID: 14568388.
  62. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun.* 2000;68(2):688-93. doi: 10.1128/iai.68.2.688-693.2000. PubMed PMID: 10639434; PubMed Central PMCID: PMCPMC97193.
  63. Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature.* 1992;360(6400):127-34. doi: 10.1038/360127a0. PubMed PMID: 1436090.
  64. Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature.* 1992;360(6400):183-6. doi: 10.1038/360183a0. PubMed PMID: 1279438.
  65. Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol.* 1992;90(1):31-5. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05827.x. PubMed PMID: 1395098; PubMed Central PMCID: PMCPMC1554537.
  66. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol.* 2000;165(5):2637-42. doi: 10.4049/jimmunol.165.5.2637. PubMed PMID: 10946292.
  67. Beltrame MH, Boldt AB, Catarino SJ, Mendes HC, Boschmann SE, Goeldner I, et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. *Mol Immunol.* 2015;67(1):85-100. Epub 2015/04/08. doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.245. PubMed PMID: 25862418; PubMed Central PMCID: PMCPMC7112674.
  68. Bartłomieczyk MA, Swierczko AS, Brzostek A, Dziadek J, Cedzynski M. Interaction of lectin pathway of complement-activating pattern recognition molecules with mycobacteria. *Clin Exp Immunol.* 2014;178(2):310-9. doi: 10.1111/cei.12416. PubMed PMID: 25041480; PubMed Central PMCID: PMCPMC4233380.
  69. Ahmadi F, Ghadiri A, Nashibi R, Roozbeh F, Alizadeh-Navaei R. Serum mannan-binding lectin in patients with pulmonary tuberculosis: Its lack of a relationship to the disease and response to treatment. *Med J Islam Repub Iran.* 2017;31:66. Epub 2017/09/30. doi: 10.14196/mjiri.31.66. PubMed PMID: 29445695; PubMed Central PMCID: PMCPMC5804467.
  70. Bonar A, Chmiela M, Rózsalska B. Level of mannose-binding lectin (MBL) in patients with tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol.* 2004;72(5-6):201-5. PubMed PMID: 15757259.
  71. Bonar A, Chmiela M, Rudnicka W, Rózsalska B. Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005;53(5):437-41. PubMed PMID: 16314827.



72. Søborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, Kok-Jensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis.* 2003;188(5):777-82. Epub 2003/08/08. doi: 10.1086/377183. PubMed PMID: 12934195.
73. Nisihara R, Skare T, Maestri V, Alegretti JS, Campos APB, Messias-Reason I. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency and tuberculosis infection in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2018;37(2):555-8. Epub 2017/09/06. doi: 10.1007/s10067-017-3813-4. PubMed PMID: 28879439.
74. Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India. *Tuber Lung Dis.* 1999;79(4):221-7. doi: 10.1054/tuld.1999.0204. PubMed PMID: 10692990.
75. Liu C, He T, Rong Y, Du F, Ma D, Wei Y, et al. Association of Mannose-binding Lectin Polymorphisms with Tuberculosis Susceptibility among Chinese. *Sci Rep.* 2016;6:36488. Epub 2016/11/04. doi: 10.1038/srep36488. PubMed PMID: 27812036; PubMed Central PMCID: PMC5095599.
76. Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Thursz M, Sumiya M, Summerfield J, et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *QJM.* 1998;91(1):13-8. doi: 10.1093/qjmed/91.1.13. PubMed PMID: 9519208.
77. Søborg C, Andersen AB, Range N, Malenganisho W, Friis H, Magnussen P, et al. Influence of candidate susceptibility genes on tuberculosis in a high endemic region. *Mol Immunol.* 2007;44(9):2213-20. Epub 2006/12/06. doi: 10.1016/j.molimm.2006.11.002. PubMed PMID: 17157384.
78. Denholm JT, McBryde ES, Eisen DP. Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1):84-90. Epub 2010/08/19. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04221.x. PubMed PMID: 20636396; PubMed Central PMCID: PMC2990933.
79. Świerzko AS, Bartłomiejczyk MA, Brzostek A, Łukasiewicz J, Michalski M, Dziadek J, et al. Mycobacterial antigen 85 complex (Ag85) as a target for ficolins and mannose-binding lectin. *Int J Med Microbiol.* 2016;306(4):212-21. Epub 2016/04/26. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.04.004. PubMed PMID: 27141819.
80. Turner J, Torrelles JB. Mannose-capped lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathog Dis.* 2018;76(4). doi: 10.1093/femspd/fty026. PubMed PMID: 29722821; PubMed Central PMCID: PMC5930247.
81. Sada E, Aguilar D, Torres M, Herrera T. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1992;30(9):2415-8. doi: 10.1128/JCM.30.9.2415-2418.1992. PubMed PMID: 1401008; PubMed Central PMCID: PMC265515.
82. Pereira Arias-Bouda LM, Nguyen LN, Ho LM, Kuijper S, Jansen HM, Kolk AH. Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2278-83. PubMed PMID: 10834989; PubMed Central PMCID: PMC86781.
83. Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, Pawlowski A, Bjorvatn B, Källenius G, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J Microbiol Methods.* 2001;45(1):41-52. doi: 10.1016/s0167-7012(01)00239-1. PubMed PMID: 11295196.
84. Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J, Rook GA. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1988;56(12):3046-51. doi:

- 10.1128/IAI.56.12.3046-3051.1988. PubMed PMID: 3141278; PubMed Central PMCID: PMCPMC259698.
85. Kuo CJ, Bell H, Hsieh CL, Ptak CP, Chang YF. Novel mycobacteria antigen 85 complex binding motif on fibronectin. *J Biol Chem.* 2012;287(3):1892-902. Epub 2011/11/29. doi: 10.1074/jbc.M111.298687. PubMed PMID: 22128161; PubMed Central PMCID: PMCPMC3265870.
  86. Kuo CJ, Ptak CP, Hsieh CL, Akey BL, Chang YF. Elastin, a novel extracellular matrix protein adhering to mycobacterial antigen 85 complex. *J Biol Chem.* 2013;288(6):3886-96. Epub 2012/12/17. doi: 10.1074/jbc.M112.415679. PubMed PMID: 23250738; PubMed Central PMCID: PMCPMC3567642.
  87. Hetland G, Wiker HG. Antigen 85C on *Mycobacterium bovis*, BCG and *M. tuberculosis* promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products. *Immunology.* 1994;82(3):445-9. PubMed PMID: 7959881; PubMed Central PMCID: PMCPMC1414871.
  88. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science.* 1997;276(5317):1420-2. doi: 10.1126/science.276.5317.1420. PubMed PMID: 9162010.
  89. Jackson M, Raynaud C, Lan elle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, et al. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol.* 1999;31(5):1573-87. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01310.x. PubMed PMID: 10200974.
  90. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun.* 2000;68(2):767-78. doi: 10.1128/iai.68.2.767-778.2000. PubMed PMID: 10639445; PubMed Central PMCID: PMCPMC97204.
  91. Ren Y, Ding Q, Zhang X. Ficolins and infectious diseases. *Virol Sin.* 2014;29(1):25-32. Epub 2014/01/21. doi: 10.1007/s12250-014-3421-2. PubMed PMID: 24452543.
  92. Cedzyński M, Świerzko SA. Factors of the lectin pathway of complement activation in cancer. *Journal of Health Study and Medicine.* 2017;1:7-36.
  93. Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen HO, Fujita T, Matsushita M, Garred P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum Mol Genet.* 2005;14(12):1651-8. Epub 2005/05/06. doi: 10.1093/hmg/ddi173. PubMed PMID: 15879437.
  94. Atkinson AP, Cedzynski M, Szemraj J, St Swierzko A, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, et al. L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(3):517-20. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02634.x. PubMed PMID: 15544630; PubMed Central PMCID: PMCPMC1809226.
  95. Luo F, Sun X, Wang Y, Wang Q, Wu Y, Pan Q, et al. Ficolin-2 defends against virulent *Mycobacteria tuberculosis* infection in vivo, and its insufficiency is associated with infection in humans. *PLoS One.* 2013;8(9):e73859. Epub 2013/09/09. doi: 10.1371/journal.pone.0073859. PubMed PMID: 24040095; PubMed Central PMCID: PMCPMC3767610.
  96. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang SJ, et al. Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol.* 2006;50(12):1001-13. doi: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03868.x. PubMed PMID: 17179669.
  97. Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K, Okumura T, Fukuda M, Fukuzawa J, et al. Immunolocalization of a novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J Histochem Cytochem.*

- 2008;56(3):243-52. Epub 2007/11/26. doi: 10.1369/jhc.7A7312.2007. PubMed PMID: 18040075; PubMed Central PMCID: PMCPMC2324184.
98. Henriksen ML, Brandt J, Andrieu JP, Nielsen C, Jensen PH, Holmskov U, et al. Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin liver 1 are found in the circulation with MASPs and activate the complement system. *J Immunol.* 2013;191(12):6117-27. Epub 2013/10/30. doi: 10.4049/jimmunol.1302121. PubMed PMID: 24174618.
  99. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, et al. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol.* 2010;185(10):6096-104. Epub 2010/10/18. doi: 10.4049/jimmunol.1002185. PubMed PMID: 20956340.
  100. Troegeler A, Lugo-Villarino G, Hansen S, Rasolofo V, Henriksen ML, Mori K, et al. Collectin CL-LK Is a Novel Soluble Pattern Recognition Receptor for Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132692. Epub 2015/07/14. doi: 10.1371/journal.pone.0132692. PubMed PMID: 26173080; PubMed Central PMCID: PMCPMC4501752.
  101. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev.* 1997;77(4):931-62. doi: 10.1152/physrev.1997.77.4.931. PubMed PMID: 9354809.
  102. Mulugeta S, Beers MF. Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2317-23. Epub 2006/05/30. doi: 10.1016/j.micinf.2006.04.009. PubMed PMID: 16782390.
  103. Blanco O, Pérez-Gil J. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. *Eur J Pharmacol.* 2007;568(1-3):1-15. Epub 2007/04/30. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.04.035. PubMed PMID: 17543939.
  104. Perez-Gil J, Weaver TE. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda).* 2010;25(3):132-41. doi: 10.1152/physiol.00006.2010. PubMed PMID: 20551227.
  105. Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(5):765-74. doi: 10.1513/AnnalsATS.201411-507FR. PubMed PMID: 25742123; PubMed Central PMCID: PMCPMC4418337.
  106. Wong CJ, Akiyama J, Allen L, Hawgood S. Localization and developmental expression of surfactant proteins D and A in the respiratory tract of the mouse. *Pediatr Res.* 1996;39(6):930-7. doi: 10.1203/00006450-199606000-00002. PubMed PMID: 8725251.
  107. Shweta S. Lung surfactant: the indispensable component of respiratory mechanics. *Resonance.* 2005;10(8):91-6. doi: 10.1007/BF02866749.
  108. Walski M, Grytner-Zięcina B, Frontczak-Baniewicz M. Morfologiczne wykładniki procesów powstawania surfaktantu płucnego. Zmiany w jego budowie podczas zaburzenia syntezy białek i starzenia płuc. *Gerontologia Polska.* 2005;13(3):181-7.
  109. Tino MJ, Wright JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 1):L677-88. doi: 10.1152/ajplung.1996.270.4.L677. PubMed PMID: 8928829.
  110. Lim BL, Wang JY, Holmskov U, Hoppe HJ, Reid KB. Expression of the carbohydrate recognition domain of lung surfactant protein D and demonstration of its binding to lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;202(3):1674-80. doi: 10.1006/bbrc.1994.2127. PubMed PMID: 8060356.

111. Wright JR, Youmans DC. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am J Physiol.* 1993;264(4 Pt 1):L338-44. doi: 10.1152/ajplung.1993.264.4.L338. PubMed PMID: 8476070.
112. Crouch EC, Persson A, Griffin GL, Chang D, Senior RM. Interactions of pulmonary surfactant protein D (SP-D) with human blood leukocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(4):410-5. doi: 10.1165/ajrcmb.12.4.7695920. PubMed PMID: 7695920.
113. Weissbach S, Neuendank A, Pettersson M, Schaberg T, Pison U. Surfactant protein A modulates release of reactive oxygen species from alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 1):L660-6. doi: 10.1152/ajplung.1994.267.6.L660. PubMed PMID: 7810671.
114. Van Iwaarden JF, Shimizu H, Van Golde PH, Voelker DR, Van Golde LM. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages. *Biochem J.* 1992;286 ( Pt 1):5-8. doi: 10.1042/bj2860005. PubMed PMID: 1325783; PubMed Central PMCID: PMCPMC1133009.
115. Crowther JE, Kutala VK, Kuppusamy P, Ferguson JS, Beharka AA, Zweier JL, et al. Pulmonary surfactant protein a inhibits macrophage reactive oxygen intermediate production in response to stimuli by reducing NADPH oxidase activity. *J Immunol.* 2004;172(11):6866-74. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.6866. PubMed PMID: 15153505.
116. Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol.* 1995;155(11):5343-51. PubMed PMID: 7594549.
117. Pasula R, Downing JF, Wright JR, Kachel DL, Davis TE, Martin WJ. Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(2):209-17. doi: 10.1165/ajrcmb.17.2.2469. PubMed PMID: 9271309.
118. Pasula R, Wright JR, Kachel DL, Martin WJ. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 1999;103(4):483-90. doi: 10.1172/JCI2991. PubMed PMID: 10021456; PubMed Central PMCID: PMCPMC408094.
119. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, et al. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med.* 2005;202(7):987-99. doi: 10.1084/jem.20051239. PubMed PMID: 16203868; PubMed Central PMCID: PMCPMC2213176.
120. Phelps DS, Rose RM. Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(5 Pt 1):1072-5. doi: 10.1164/ajrccm/143.5\_Pt\_1.1072. PubMed PMID: 2024816.
121. Downing JF, Pasula R, Wright JR, Twigg HL, Martin WJ. Surfactant protein a promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):4848-52. doi: 10.1073/pnas.92.11.4848. PubMed PMID: 7761411; PubMed Central PMCID: PMCPMC41804.
122. Lesur O, Veldhuizen RA, Whitsett JA, Hull WM, Possmayer F, Cantin A, et al. Surfactant-associated proteins (SP-A, SP-B) are increased proportionally to alveolar phospholipids in sheep silicosis. *Lung.* 1993;171(2):63-74. doi: 10.1007/BF00542334. PubMed PMID: 8426464.
123. Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin

- interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol.* 1999;163(1):312-21. PubMed PMID: 10384130.
124. Ferguson JS, Martin JL, Azad AK, McCarthy TR, Kang PB, Voelker DR, et al. Surfactant protein D increases fusion of *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes with lysosomes in human macrophages. *Infect Immun.* 2006;74(12):7005-9. Epub 2006/10/09. doi: 10.1128/IAI.01402-06. PubMed PMID: 17030585; PubMed Central PMCID: PMCPMC1698096.
  125. Hall-Stoodley L, Watts G, Crowther JE, Balagopal A, Torrelles JB, Robison-Cox J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* binding to human surfactant proteins A and D, fibronectin, and small airway epithelial cells under shear conditions. *Infect Immun.* 2006;74(6):3587-96. doi: 10.1128/IAI.01644-05. PubMed PMID: 16714591; PubMed Central PMCID: PMCPMC1479241.
  126. Sidobre S, Nigou J, Puzo G, Rivière M. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2415-22. doi: 10.1074/jbc.275.4.2415. PubMed PMID: 10644694.
  127. de Souza GA, Leversen NA, Målen H, Wiker HG. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *J Proteomics.* 2011;75(2):502-10. Epub 2011/09/05. doi: 10.1016/j.jprot.2011.08.016. PubMed PMID: 21920479.
  128. Ragas A, Roussel L, Puzo G, Rivière M. The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5133-42. Epub 2006/12/08. doi: 10.1074/jbc.M610183200. PubMed PMID: 17158455.
  129. Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infect Immun.* 2003;71(4):1929-37. doi: 10.1128/iai.71.4.1929-1937.2003. PubMed PMID: 12654810; PubMed Central PMCID: PMCPMC152084.
  130. Satchidanandam V, Kumar N, Biswas S, Jumani RS, Jain C, Rani R, et al. The Secreted Protein Rv1860 of *Mycobacterium tuberculosis* Stimulates Human Polyfunctional CD8+ T Cells. *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23(4):282-93. Epub 2016/04/04. doi: 10.1128/CVI.00554-15. PubMed PMID: 26843486; PubMed Central PMCID: PMCPMC4820513.
  131. Satchidanandam V, Kumar N, Jumani RS, Challu V, Elangovan S, Khan NA. The glycosylated Rv1860 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits dendritic cell mediated TH1 and TH17 polarization of T cells and abrogates protective immunity conferred by BCG. *PLoS Pathog.* 2014;10(6):e1004176. Epub 2014/06/12. doi: 10.1371/journal.ppat.1004176. PubMed PMID: 24945624; PubMed Central PMCID: PMCPMC4055742.
  132. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma.* 2014;23(8 Suppl 1):S20-3. doi: 10.1097/IJG.000000000000108. PubMed PMID: 25275899; PubMed Central PMCID: PMCPMC4185430.
  133. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801. doi: 10.1038/nrm3904. PubMed PMID: 25415508; PubMed Central PMCID: PMCPMC4316204.
  134. O'Dwyer DN, Gurczynski SJ, Moore BB. Pulmonary immunity and extracellular matrix interactions. *Matrix Biol.* 2018;73:122-34. Epub 2018/04/09. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.003. PubMed PMID: 29649546; PubMed Central PMCID: PMCPMC6177325.

135. Al Shammari B, Shiomi T, Tezera L, Bielecka MK, Workman V, Sathyamoorthy T, et al. The Extracellular Matrix Regulates Granuloma Necrosis in Tuberculosis. *J Infect Dis*. 2015;212(3):463-73. Epub 2015/02/12. doi: 10.1093/infdis/jiv076. PubMed PMID: 25676469; PubMed Central PMCID: PMC4539912.
136. Brilha S, Wysoczanski R, Whittington AM, Friedland JS, Porter JC. Monocyte Adhesion, Migration, and Extracellular Matrix Breakdown Are Regulated by Integrin  $\alpha V\beta 3$  in. *J Immunol*. 2017;199(3):982-91. Epub 2017/06/23. doi: 10.4049/jimmunol.1700128. PubMed PMID: 28646039; PubMed Central PMCID: PMC5523580.
137. Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, et al. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory mucosa. *Tuberculosis (Edinb)*. 2002;82(2-3):69-78. doi: 10.1054/tube.2002.0324. PubMed PMID: 12356457.
138. Kinhikar AG, Vargas D, Li H, Mahaffey SB, Hinds L, Belisle JT, et al. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Mol Microbiol*. 2006;60(4):999-1013. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05151.x. PubMed PMID: 16677310.
139. Pasula R, Wisniowski P, Martin WJ. Fibronectin facilitates *Mycobacterium tuberculosis* attachment to murine alveolar macrophages. *Infect Immun*. 2002;70(3):1287-92. doi: 10.1128/iai.70.3.1287-1292.2002. PubMed PMID: 11854212; PubMed Central PMCID: PMC127808.
140. Kuo CJ, Gao J, Huang JW, Ko TP, Zhai C, Ma L, et al. Functional and structural investigations of fibronectin-binding protein Apa from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;1863(9):1351-9. Epub 2019/06/05. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.06.003. PubMed PMID: 31175911.
141. Puckett S, Trujillo C, Wang Z, Eoh H, Ioerger TR, Krieger I, et al. Glyoxylate detoxification is an essential function of malate synthase required for carbon assimilation in. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(11):E2225-E32. Epub 2017/03/06. doi: 10.1073/pnas.1617655114. PubMed PMID: 28265055; PubMed Central PMCID: PMC5358392.
142. Singh KS, Sharma R, Keshari D, Singh N, Singh SK. Down-regulation of malate synthase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra leads to reduced stress tolerance, persistence and survival in macrophages. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017;106:73-81. Epub 2017/07/18. doi: 10.1016/j.tube.2017.07.006. PubMed PMID: 28802408.
143. Kinhikar AG, Verma I, Chandra D, Singh KK, Weldingh K, Andersen P, et al. Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2010;75(1):92-106. Epub 2009/11/10. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06959.x. PubMed PMID: 19906174; PubMed Central PMCID: PMC2846543.
144. Peng X, Sun J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicon*. 2016;116:29-34. Epub 2015/10/09. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.10.003. PubMed PMID: 26456678; PubMed Central PMCID: PMC4973572.
145. Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infect Immun*. 2002;70(8):4501-9. doi: 10.1128/iai.70.8.4501-4509.2002. PubMed PMID: 12117962; PubMed Central PMCID: PMC128141.
146. McMurray DN. Hematogenous reseeding of the lung in low-dose, aerosol-infected guinea pigs: unique features of the host-pathogen interface in secondary tubercles. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):131-4. doi: 10.1016/s1472-9792(02)00079-3. PubMed PMID: 12758202.
147. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium*

- tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol.* 2007;8(6):610-8. Epub 2007/05/07. doi: 10.1038/ni1468. PubMed PMID: 17486091.
148. Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, Jha V, Valluri VL, Ghosh S, et al. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. *PLoS Pathog.* 2014;10(10):e1004446. Epub 2014/10/30. doi: 10.1371/journal.ppat.1004446. PubMed PMID: 25356553; PubMed Central PMCID: PMC4214792.
  149. Conrad HE. Heparin-binding proteins. Academic Press. 1997.
  150. Killeen R, Wait R, Begum S, Gray E, Mulloy B. Identification of major heparin-binding proteins in plasma using electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Exp Pathol.* 2004;85(4):A69.
  151. Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, et al. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature.* 1999;400(6746):773-6. doi: 10.1038/23488. PubMed PMID: 10466727.
  152. Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, et al. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature.* 1999;400(6746):769-72. doi: 10.1038/23481. PubMed PMID: 10466726.
  153. Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Stevens RL. 14 heparin-null transgenic mice are unable to store certain granule proteases in their mast cells. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(12):1645D-6. PubMed PMID: 10567461.
  154. Cornet AD, Smit EG, Beishuizen A, Groeneveld AB. The role of heparin and allied compounds in the treatment of sepsis. *Thromb Haemost.* 2007;98(3):579-86. PubMed PMID: 17849046.
  155. Attanasio M, Gori AM, Giusti B, Pepe G, Comeglio P, Brunelli T, et al. Cytokine gene expression in human LPS- and IFN $\gamma$ -stimulated mononuclear cells is inhibited by heparin. *Thromb Haemost.* 1998;79(5):959-62. PubMed PMID: 9609229.
  156. Mu E, Ding R, An X, Li X, Chen S, Ma X. Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Thromb Res.* 2012;129(4):479-85. Epub 2011/10/26. doi: 10.1016/j.thromres.2011.10.003. PubMed PMID: 22035631.
  157. Xu D, Olson J, Cole JN, van Wijk XM, Brinkmann V, Zychlinsky A, et al. Heparan Sulfate Modulates Neutrophil and Endothelial Function in Antibacterial Innate Immunity. *Infect Immun.* 2015;83(9):3648-56. Epub 2015/07/06. doi: 10.1128/IAI.00545-15. PubMed PMID: 26150541; PubMed Central PMCID: PMC4534644.
  158. Mitsi M, Forsten-Williams K, Gopalakrishnan M, Nugent MA. A catalytic role of heparin within the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2008;283(50):34796-807. Epub 2008/10/09. doi: 10.1074/jbc.M806692200. PubMed PMID: 18845539; PubMed Central PMCID: PMC2596404.
  159. Abreu R, Essler L, Loy A, Quinn F, Giri P. Heparin inhibits intracellular *Mycobacterium tuberculosis* bacterial replication by reducing iron levels in human macrophages. *Sci Rep.* 2018;8(1):7296. Epub 2018/05/08. doi: 10.1038/s41598-018-25480-y. PubMed PMID: 29740038; PubMed Central PMCID: PMC5940867.
  160. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med.* 1996;184(3):993-1001. doi: 10.1084/jem.184.3.993. PubMed PMID: 9064359; PubMed Central PMCID: PMC2192777.
  161. Locht C, Hougardy JM, Rouanet C, Place S, Mascart F. Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective

- antigen against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006;86(3-4):303-9. Epub 2006/02/28. doi: 10.1016/j.tube.2006.01.016. PubMed PMID: 16510310.
162. Delogu G, Sanguinetti M, Posteraro B, Rocca S, Zanetti S, Fadda G. The hbhA gene of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically upregulated in the lungs but not in the spleens of aerogenically infected mice. *Infect Immun*. 2006;74(5):3006-11. doi: 10.1128/IAI.74.5.3006-3011.2006. PubMed PMID: 16622240; PubMed Central PMCID: PMC1459695.
  163. Raze D, Verwaerde C, Deloison G, Werkmeister E, Coupin B, Loyens M, et al. Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin (HBHA) Is Involved in Intracytosolic Lipid Inclusions Formation in *Mycobacteria*. *Front Microbiol*. 2018;9:2258. Epub 2018/09/24. doi: 10.3389/fmicb.2018.02258. PubMed PMID: 30333800; PubMed Central PMCID: PMC6176652.
  164. Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med*. 2009;59(6):517-26. PubMed PMID: 20034426; PubMed Central PMCID: PMC2798837.
  165. Janciauskiene S, Welte T, Mahadeva R. Acute phase proteins: structure and function relationship, Acute phase proteins - regulation and functions of acute phase proteins. *InTech*. 2011.
  166. Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6(11):1045-56. doi: 10.1631/jzus.2005.B1045. PubMed PMID: 16252337; PubMed Central PMCID: PMC1390650.
  167. Korczowska I, Hrycaj P, Łacki JK. Białka ostrej fazy we współczesnej diagnostyce medycznej. *Postępy Nauk Medycznych*. 2011;2.
  168. Kasprzyk M, Dyszkiewicz W, Zwaruń D, Leśniewska K, Wiktorowicz K. The assessment of acute phase proteins as prognostic factors in patients surgically treated for non-small cell lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol*. 2008;76(5):321-6. PubMed PMID: 19003761.
  169. Sharma M, Khan S, Rahman S, Singh LR. The Extracellular Protein, Transthyretin Is an Oxidative Stress Biomarker. *Front Physiol*. 2019;10:5. Epub 2019/01/24. doi: 10.3389/fphys.2019.00005. PubMed PMID: 30733681; PubMed Central PMCID: PMC6353848.
  170. De Buck M, Gouwy M, Wang JM, Van Snick J, Opdenakker G, Struyf S, et al. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Curr Med Chem*. 2016;23(17):1725-55. doi: 10.2174/0929867323666160418114600. PubMed PMID: 27087246; PubMed Central PMCID: PMC5405626.
  171. Larson MA, Wei SH, Weber A, Weber AT, McDonald TL. Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(4):1030-7. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00045-7. PubMed PMID: 12589816.
  172. Tomita T, Ieguchi K, Sawamura T, Maru Y. Human serum amyloid A3 (SAA3) protein, expressed as a fusion protein with SAA2, binds the oxidized low density lipoprotein receptor. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118835. Epub 2015/03/04. doi: 10.1371/journal.pone.0118835. PubMed PMID: 25738827; PubMed Central PMCID: PMC4349446.
  173. Eklund KK, Niemi K, Kovanen PT. Immune functions of serum amyloid A. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(4):335-48. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i4.40. PubMed PMID: 23237509.
  174. Sellar GC, Jordan SA, Bickmore WA, Fantes JA, van Heyningen V, Whitehead AS. The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: mapping to chromosome



- 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis. *Genomics*. 1994;19(2):221-7. doi: 10.1006/geno.1994.1051. PubMed PMID: 8188252.
175. Frame NM, Gursky O. Structure of serum amyloid A suggests a mechanism for selective lipoprotein binding and functions: SAA as a hub in macromolecular interaction networks. *Amyloid*. 2017;24(sup1):13-4. Epub 2016/12/31. doi: 10.1080/13506129.2016.1270930. PubMed PMID: 28042712; PubMed Central PMCID: PMC5567814.
  176. Sack Jr GH. Serum amyloid A - a review. *Mol Med*. 2018;24(1):46.
  177. Lu J, Yu Y, Zhu I, Cheng Y, Sun PD. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5189-94. Epub 2014/03/24. doi: 10.1073/pnas.1322357111. PubMed PMID: 24706838; PubMed Central PMCID: PMC3986191.
  178. Westermark GT, Fändrich M, Westermark P. AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:321-44. Epub 2014/10/29. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163913. PubMed PMID: 25387054.
  179. Cohen AS, Calkins E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*. 1959;183(4669):1202-3. doi: 10.1038/1831202a0. PubMed PMID: 13657054.
  180. Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem*. 1993;39(2):293-7. PubMed PMID: 8381732.
  181. Rosenthal CJ, Franklin EC. Variation with age and disease of an amyloid A protein-related serum component. *J Clin Invest*. 1975;55(4):746-53. doi: 10.1172/JCI107985. PubMed PMID: 47333; PubMed Central PMCID: PMC301811.
  182. Ostensen M, Marhaug G, Husby G. Amyloid-related serum protein (SAA) during and after pregnancy in healthy women and women with rheumatic disease. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*. 1985;93(1):1-5. doi: 10.1111/j.1699-0463.1985.tb02913.x. PubMed PMID: 3984747.
  183. Marhaug G, Sletten K, Husby G. Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoproteins (apoSAA). *Clin Exp Immunol*. 1982;50(2):382-9. PubMed PMID: 7151331; PubMed Central PMCID: PMC301811.
  184. Coetzee GA, Strachan AF, van der Westhuyzen DR, Hoppe HC, Jeenah MS, de Beer FC. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J Biol Chem*. 1986;261(21):9644-51. PubMed PMID: 3525531.
  185. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2758-67. doi: 10.1172/JCI118345. PubMed PMID: 8675645; PubMed Central PMCID: PMC185985.
  186. Upragarin N, Landman WJ, Gaastra W, Gruys E. Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A. *Histol Histopathol*. 2005;20(4):1295-307. doi: 10.14670/HH-20.1295. PubMed PMID: 16136510.
  187. Ganapathi MK, Rzewnicki D, Samols D, Jiang SL, Kushner I. Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in Hep 3B cells. *J Immunol*. 1991;147(4):1261-5. PubMed PMID: 1651357.
  188. Migita K, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yoshida Y, Yokoyama T, et al. Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human

- hepatocytes in vitro. *FEBS Lett.* 2004;569(1-3):235-9. doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.072. PubMed PMID: 15225640.
189. Ye RD, Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):923-9. Epub 2015/06/30. doi: 10.1189/jlb.3VMR0315-080R. PubMed PMID: 26130702; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  190. Chen M, Zhou H, Cheng N, Qian F, Ye RD. Serum amyloid A1 isoforms display different efficacy at Toll-like receptor 2 and formyl peptide receptor 2. *Immunobiology.* 2014;219(12):916-23. Epub 2014/08/10. doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.002. PubMed PMID: 25154907; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  191. Sasai M, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int Rev Immunol.* 2013;32(2):116-33. doi: 10.3109/08830185.2013.774391. PubMed PMID: 23570313.
  192. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med.* 2010;14(11):2592-603. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x. PubMed PMID: 20629986; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  193. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol.* 2008;181(1):22-6. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.22. PubMed PMID: 18566366; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  194. Sun L, Zhou H, Zhu Z, Yan Q, Wang L, Liang Q, et al. Ex vivo and in vitro effect of serum amyloid a in the induction of macrophage M2 markers and efferocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol.* 2015;194(10):4891-900. Epub 2015/04/13. doi: 10.4049/jimmunol.1402164. PubMed PMID: 25870242; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  195. He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N, Ye RD. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood.* 2009;113(2):429-37. Epub 2008/10/24. doi: 10.1182/blood-2008-03-139923. PubMed PMID: 18952897; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  196. Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro HP, Russo M, Campa A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol.* 2008;83(5):1174-80. Epub 2008/02/05. doi: 10.1189/jlb.0407203. PubMed PMID: 18252871.
  197. He HQ, Ye RD. The Formyl Peptide Receptors: Diversity of Ligands and Mechanism for Recognition. *Molecules.* 2017;22(3). Epub 2017/03/13. doi: 10.3390/molecules22030455. PubMed PMID: 28335409; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  198. Raabe CA, Gröper J, Rescher U. Biased perspectives on formyl peptide receptors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(2):305-16. Epub 2018/12/04. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.11.015. PubMed PMID: 30521870.
  199. Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(6):501-19. Epub 2006/11/02. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.009. PubMed PMID: 17084101.
  200. Su SB, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ, et al. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med.* 1999;189(2):395-402. doi: 10.1084/jem.189.2.395. PubMed PMID: 9892621; PubMed Central PMCID: PMC6608020.
  201. Lee HY, Kim SD, Shim JW, Lee SY, Lee H, Cho KH, et al. Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human

- monocytes. *J Immunol.* 2008;181(6):4332-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4332. PubMed PMID: 18768891.
202. Anthony D, McQualter JL, Bishara M, Lim EX, Yatmaz S, Seow HJ, et al. SAA drives proinflammatory heterotypic macrophage differentiation in the lung via CSF-1R-dependent signaling. *FASEB J.* 2014;28(9):3867-77. Epub 2014/05/20. doi: 10.1096/fj.14-250332. PubMed PMID: 24846388; PubMed Central PMCID: PMCPMC5395724.
  203. He R, Sang H, Ye RD. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood.* 2003;101(4):1572-81. Epub 2002/09/26. doi: 10.1182/blood-2002-05-1431. PubMed PMID: 12393391.
  204. Sodin-Semrl S, Spagnolo A, Mikus R, Barbaro B, Varga J, Fiore S. Opposing regulation of interleukin-8 and NF-kappaB responses by lipoxin A4 and serum amyloid A via the common lipoxin A receptor. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004;17(2):145-56. doi: 10.1177/039463200401700206. PubMed PMID: 15171815.
  205. Lee HY, Kim MK, Park KS, Bae YH, Yun J, Park JI, et al. Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(3):989-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.069. PubMed PMID: 15809093.
  206. O'Hara R, Murphy EP, Whitehead AS, FitzGerald O, Bresnihan B. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1788-99. doi: 10.1002/art.20301. PubMed PMID: 15188355.
  207. Lee HY, Kim MK, Park KS, Shin EH, Jo SH, Kim SD, et al. Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes. *Mol Pharmacol.* 2006;70(1):241-8. Epub 2006/03/28. doi: 10.1124/mol.105.022103. PubMed PMID: 16569709.
  208. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(9):621-34. Epub 2013/08/09. doi: 10.1038/nri3515. PubMed PMID: 23928573.
  209. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, et al. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol.* 2017;198(10):3775-89. doi: 10.4049/jimmunol.1700373. PubMed PMID: 28483986; PubMed Central PMCID: PMCPMC5671342.
  210. Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17551-7. doi: 10.1074/jbc.272.28.17551. PubMed PMID: 9211901.
  211. Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Kurlander R, Chen Z, Fu D, et al. CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells. *J Biol Chem.* 2010;285(11):8492-506. Epub 2010/01/14. doi: 10.1074/jbc.M109.007526. PubMed PMID: 20075072; PubMed Central PMCID: PMCPMC2832998.
  212. Cai L, de Beer MC, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* 2005;280(4):2954-61. Epub 2004/11/23. doi: 10.1074/jbc.M411555200. PubMed PMID: 15561721.
  213. Connolly M, Mullan RH, McCormick J, Matthews C, Sullivan O, Kennedy A, et al. Acute-phase serum amyloid A regulates tumor necrosis factor  $\alpha$  and matrix turnover and predicts disease progression in patients with inflammatory arthritis before and after biologic

- therapy. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1035-45. Epub 2011/11/10. doi: 10.1002/art.33455. PubMed PMID: 22076945.
214. Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, Kurlander R, Chen Z, Kimelman ML, et al. Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8031-40. Epub 2004/12/02. doi: 10.1074/jbc.M405009200. PubMed PMID: 15576377.
  215. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med.* 2009;7:17. Epub 2009/03/17. doi: 10.1186/1479-5876-7-17. PubMed PMID: 19292913; PubMed Central PMCID: PMCPMC2666642.
  216. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(12):625-32. Epub 2011/10/19. doi: 10.1016/j.tibs.2011.08.008. PubMed PMID: 22019011.
  217. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001;108(7):949-55. doi: 10.1172/JCI14002. PubMed PMID: 11581294; PubMed Central PMCID: PMCPMC200958.
  218. Pietkiewicz J, Seweryn E, Bartyś A, Gamian A. Receptors for advanced glycation end products and their physiological and clinical significance. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008;62:511-23. Epub 2008/10/10. PubMed PMID: 18936727.
  219. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect.* 2004;6(13):1219-25. doi: 10.1016/j.micinf.2004.08.004. PubMed PMID: 15488742.
  220. Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, et al. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med.* 2000;6(6):643-51. doi: 10.1038/76216. PubMed PMID: 10835680.
  221. Okamoto H, Katagiri Y, Kiire A, Momohara S, Kamatani N. Serum amyloid A activates nuclear factor-kappaB in rheumatoid synovial fibroblasts through binding to receptor of advanced glycation end-products. *J Rheumatol.* 2008;35(5):752-6. Epub 2008/03/01. PubMed PMID: 18322992.
  222. Li W, Zhu S, Li J, D'Amore J, D'Angelo J, Yang H, et al. Serum Amyloid A Stimulates PKR Expression and HMGB1 Release Possibly through TLR4/RAGE Receptors. *Mol Med.* 2015;21:515-25. Epub 2015/06/02. doi: 10.2119/molmed.2015.00109. PubMed PMID: 26052716; PubMed Central PMCID: PMCPMC4607615.
  223. Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci.* 2017;130(23):3955-63. doi: 10.1242/jcs.207365. PubMed PMID: 29196474; PubMed Central PMCID: PMCPMC5769591.
  224. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13). Epub 2019/07/06. doi: 10.3390/ijms20133328. PubMed PMID: 31284572; PubMed Central PMCID: PMCPMC6651423.
  225. Ciężyńska M, Bednarski IA, Wódz K, Narbutt J, Lesiak A. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes as a new approach to skin carcinogenesis. *Oncol Lett.* 2020;19(3):1649-56. Epub 2020/01/09. doi: 10.3892/ol.2020.11284. PubMed PMID: 32194656; PubMed Central PMCID: PMCPMC7039172.
  226. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012;481(7381):278-86. Epub 2012/01/18. doi: 10.1038/nature10759. PubMed PMID: 22258606.

227. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 2015;25(5):308-15. Epub 2015/01/29. doi: 10.1016/j.tcb.2014.12.009. PubMed PMID: 25639489; PubMed Central PMCID: PMC4409512.
228. Niemi K, Teirilä L, Lappalainen J, Rajamäki K, Baumann MH, Öörni K, et al. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol.* 2011;186(11):6119-28. Epub 2011/04/20. doi: 10.4049/jimmunol.1002843. PubMed PMID: 21508263.
229. Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Nakamura M, et al. Serum amyloid A induces NLRP-3-mediated IL-1 $\beta$  secretion in neutrophils. *PLoS One.* 2014;9(5):e96703. Epub 2014/05/20. doi: 10.1371/journal.pone.0096703. PubMed PMID: 24846290; PubMed Central PMCID: PMC4028190.
230. Miwata H, Yamada T, Okada M, Kudo T, Kimura H, Morishima T. Serum amyloid A protein in acute viral infections. *Arch Dis Child.* 1993;68(2):210-4. doi: 10.1136/adc.68.2.210. PubMed PMID: 8481043; PubMed Central PMCID: PMC4028190.
231. Cai Z, Cai L, Jiang J, Chang KS, van der Westhuyzen DR, Luo G. Human serum amyloid A protein inhibits hepatitis C virus entry into cells. *J Virol.* 2007;81(11):6128-33. Epub 2007/02/28. doi: 10.1128/JVI.02627-06. PubMed PMID: 17329325; PubMed Central PMCID: PMC1900255.
232. Lavie M, Voisset C, Vu-Dac N, Zurawski V, Duverlie G, Wychowski C, et al. Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology.* 2006;44(6):1626-34. doi: 10.1002/hep.21406. PubMed PMID: 17133472.
233. Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J Biol Chem.* 2005;280(19):18562-7. Epub 2005/02/10. doi: 10.1074/jbc.M500490200. PubMed PMID: 15705572.
234. Shah C, Hari-Dass R, Raynes JG. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood.* 2006;108(5):1751-7. Epub 2006/05/30. doi: 10.1182/blood-2005-11-011932. PubMed PMID: 16735604.
235. Hirakura Y, Carreras I, Sipe JD, Kagan BL. Channel formation by serum amyloid A: a potential mechanism for amyloid pathogenesis and host defense. *Amyloid.* 2002;9(1):13-23. doi: 10.3109/13506120209072440. PubMed PMID: 12000193.
236. Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, et al. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10427-32. Epub 2005/07/14. doi: 10.1073/pnas.0502066102. PubMed PMID: 16020533; PubMed Central PMCID: PMC1180768.
237. Derebe MG, Zlatkov CM, Gattu S, Ruhn KA, Vaishnava S, Diehl GE, et al. Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection. *Elife.* 2014;3:e03206. Epub 2014/07/29. doi: 10.7554/eLife.03206. PubMed PMID: 25073702; PubMed Central PMCID: PMC4129439.
238. Renckens R, Roelofs JJ, Knapp S, de Vos AF, Florquin S, van der Poll T. The acute-phase response and serum amyloid A inhibit the inflammatory response to *Acinetobacter baumannii* Pneumonia. *J Infect Dis.* 2006;193(2):187-95. Epub 2005/12/07. doi: 10.1086/498876. PubMed PMID: 16362882.
239. Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, Tateda K, Kyasapura BL, Standiford TJ. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J Immunol.* 2000;165(11):6496-503. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6496. PubMed PMID: 11086090.

240. de Beer FC, Nel AE, Gie RP, Donald PR, Strachan AF. Serum amyloid A protein and C-reactive protein levels in pulmonary tuberculosis: relationship to amyloidosis. *Thorax*. 1984;39(3):196-200. doi: 10.1136/thx.39.3.196. PubMed PMID: 6710428; PubMed Central PMCID: PMCPMC459761.
241. Jacobs R, Tshehla E, Malherbe S, Kriel M, Loxton AG, Stanley K, et al. Host biomarkers detected in saliva show promise as markers for the diagnosis of pulmonary tuberculosis disease and monitoring of the response to tuberculosis treatment. *Cytokine*. 2016;81:50-6. Epub 2016/02/13. doi: 10.1016/j.cyto.2016.02.004. PubMed PMID: 26878648.
242. Jiang TT, Shi LY, Wei LL, Li X, Yang S, Wang C, et al. Serum amyloid A, protein Z, and C4b-binding protein  $\beta$  chain as new potential biomarkers for pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173304. Epub 2017/03/09. doi: 10.1371/journal.pone.0173304. PubMed PMID: 28278182; PubMed Central PMCID: PMCPMC5344400.
243. Dixit R, Gupta R, Dave L, Prasad N, Sharma S. Clinical profile of patients having pulmonary tuberculosis and renal amyloidosis. *Lung India*. 2009;26(2):41-5. doi: 10.4103/0970-2113.48896. PubMed PMID: 20440393; PubMed Central PMCID: PMCPMC2860413.
244. Malik R, Pathak N, Sharma S. Secondary renal amyloidosis in pulmonary tuberculosis - a classic revisited. *J Case Rep Stud*. 2017;5(4):404.
245. Erk O, Turfanda T, Uysal V. Frequency of renal amyloidosis secondary to tuberculosis. *Nephron*. 1995;71(3):367. doi: 10.1159/000188751. PubMed PMID: 8569994.
246. Malhotra P, Agarwal R, Awasthi A, Jindal SK, Srinivasan R. How long does it take for tuberculosis to cause secondary amyloidosis? *Eur J Intern Med*. 2005;16(6):437-9. doi: 10.1016/j.ejim.2005.02.018. PubMed PMID: 16198905.
247. Heinz C, Roth E, Niederweis M. Purification of porins from *Mycobacterium smegmatis*. *Methods Mol Biol*. 2003;228:139-50. doi: 10.1385/1-59259-400-X:139. PubMed PMID: 12824550.
248. Sheffield P, Garrard S, Derewenda Z. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr Purif*. 1999;15(1):34-9. doi: 10.1006/prep.1998.1003. PubMed PMID: 10024467.
249. Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods*. 2004;288(1-2):123-34. doi: 10.1016/j.jim.2004.03.003. PubMed PMID: 15183091.
250. Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J Bacteriol*. 2009;191(21):6584-91. Epub 2009/08/28. doi: 10.1128/JB.00488-09. PubMed PMID: 19717592; PubMed Central PMCID: PMCPMC2795286.
251. Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005;4(3):855-61. doi: 10.1021/pr0500049. PubMed PMID: 15952732.
252. Black PA, Warren RM, Louw GE, van Helden PD, Victor TC, Kana BD. Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2491-503. Epub 2014/03/10. doi: 10.1128/AAC.02293-13. PubMed PMID: 24614376; PubMed Central PMCID: PMCPMC3993223.
253. Grosset J. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):833-6. doi:

- 10.1128/aac.47.3.833-836.2003. PubMed PMID: 12604509; PubMed Central PMCID: PMCPMC149338.
254. Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shift-down of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*. 1996;64(6):2062-9. doi: 10.1128/IAI.64.6.2062-2069.1996. PubMed PMID: 8675308; PubMed Central PMCID: PMCPMC174037.
255. Rao SP, Alonso S, Rand L, Dick T, Pethe K. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11945-50. Epub 2008/08/12. doi: 10.1073/pnas.0711697105. PubMed PMID: 18697942; PubMed Central PMCID: PMCPMC2575262.
256. Karakousis PC, Yoshimatsu T, Lamichhane G, Woolwine SC, Nuermberger EL, Grosset J, et al. Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. *J Exp Med*. 2004;200(5):647-57. doi: 10.1084/jem.20040646. PubMed PMID: 15353557; PubMed Central PMCID: PMCPMC2212740.
257. Sharma D, Kumar B, Lata M, Joshi B, Venkatesan K, Shukla S, et al. Comparative Proteomic Analysis of Aminoglycosides Resistant and Susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates for Exploring Potential Drug Targets. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139414. Epub 2015/10/05. doi: 10.1371/journal.pone.0139414. PubMed PMID: 26436944; PubMed Central PMCID: PMCPMC4593609.
258. Huo T, Liu W, Guo Y, Yang C, Lin J, Rao Z. Prediction of host - pathogen protein interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Homo sapiens using sequence motifs. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:100. Epub 2015/03/26. doi: 10.1186/s12859-015-0535-y. PubMed PMID: 25887594; PubMed Central PMCID: PMCPMC4456996.
259. Fuellen G, Spitzer M, Cullen P, Lorkowski S. Correspondence of function and phylogeny of ABC proteins based on an automated analysis of 20 model protein data sets. *Proteins*. 2005;61(4):888-99. doi: 10.1002/prot.20616. PubMed PMID: 16254912.
260. Kerr ID. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(1):166-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.044. PubMed PMID: 15013441.
261. Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, et al. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb Drug Resist*. 2010;16(1):21-8. doi: 10.1089/mdr.2009.0054. PubMed PMID: 20001742.
262. Faksri K, Tan JH, Disratthakit A, Xia E, Prammananan T, Suriyaphol P, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis of Serially Isolated Multi-Drug and Extensively Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Thai Patients. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160992. Epub 2016/08/12. doi: 10.1371/journal.pone.0160992. PubMed PMID: 27518818; PubMed Central PMCID: PMCPMC4982626.
263. Daniel J, Abraham L, Martin A, Pablo X, Reyes S. Rv2477c is an antibiotic-sensitive manganese-dependent ABC-F ATPase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):35-40. Epub 2017/10/31. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.168. PubMed PMID: 29101040.
264. Chen ES, Song Z, Willett MH, Heine S, Yung RC, Liu MC, et al. Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor-2. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):360-73. Epub 2009/11/12. doi: 10.1164/rccm.200905-0696OC. PubMed PMID: 19910611; PubMed Central PMCID: PMCPMC2822973.

265. Bukka A, Price CT, Kernodle DS, Graham JE. *Mycobacterium tuberculosis* RNA Expression Patterns in Sputum Bacteria Indicate Secreted Esx Factors Contributing to Growth are Highly Expressed in Active Disease. *Front Microbiol.* 2011;2:266. Epub 2012/01/10. doi: 10.3389/fmicb.2011.00266. PubMed PMID: 22291682; PubMed Central PMCID: PMC3254194.
266. Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, Schorey JS. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics.* 2010;10(17):3190-202. doi: 10.1002/pmic.200900840. PubMed PMID: 20662102; PubMed Central PMCID: PMC3664454.
267. Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, Williamson RA, et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6\*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21598-603. Epub 2002/04/08. doi: 10.1074/jbc.M201625200. PubMed PMID: 11940590.
268. Boshoff HI, Myers TG, Copp BR, McNeil MR, Wilson MA, Barry CE. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem.* 2004;279(38):40174-84. Epub 2004/07/09. doi: 10.1074/jbc.M406796200. PubMed PMID: 15247240.
269. Buchmeier NA, Libby SJ, Xu Y, Loewen PC, Switala J, Guiney DG, et al. DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *J Clin Invest.* 1995;95(3):1047-53. doi: 10.1172/JCI117750. PubMed PMID: 7883952; PubMed Central PMCID: PMC3441439.
270. Darwin KH, Nathan CF. Role for nucleotide excision repair in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2005;73(8):4581-7. doi: 10.1128/IAI.73.8.4581-4587.2005. PubMed PMID: 16040969; PubMed Central PMCID: PMC1201236.
271. Hassett DJ, Cohen MS. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J.* 1989;3(14):2574-82. doi: 10.1096/fasebj.3.14.2556311. PubMed PMID: 2556311.
272. Taverna P, Sedgwick B. Generation of an endogenous DNA-methylating agent by nitrosation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996;178(17):5105-11. doi: 10.1128/jb.178.17.5105-5111.1996. PubMed PMID: 8752326; PubMed Central PMCID: PMC178305.
273. Stallings CL, Stephanou NC, Chu L, Hochschild A, Nickels BE, Glickman MS. CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell.* 2009;138(1):146-59. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.041. PubMed PMID: 19596241; PubMed Central PMCID: PMC2756155.
274. Garg SK, Alam MS, Kishan KV, Agrawal P. Expression and characterization of alpha-(1,4)-glucan branching enzyme Rv1326c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expr Purif.* 2007;51(2):198-208. Epub 2006/08/22. doi: 10.1016/j.pep.2006.08.005. PubMed PMID: 17005418.
275. Cywes C, Hoppe HC, Daffé M, Ehlers MR. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun.* 1997;65(10):4258-66. doi: 10.1128/IAI.65.10.4258-4266.1997. PubMed PMID: 9317035; PubMed Central PMCID: PMC175611.
276. Ehlers MR, Daffé M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 1998;6(8):328-35. doi: 10.1016/s0966-842x(98)01301-8. PubMed PMID: 9746944.



277. Fenton MJ, Riley LW, Schlesinger LS. Receptor mediated recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by host cells, Tuberculosis and the tubercle bacillus. ASM Press. 2005:405-26.
278. Sambou T, Dinadayala P, Stadthagen G, Barilone N, Bordat Y, Constant P, et al. Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis and impact on the persistence in mice. Mol Microbiol. 2008;70(3):762-74. Epub 2008/09/18. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06445.x. PubMed PMID: 18808383; PubMed Central PMCID: PMCPMC2581643.
279. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol Mol Biol Rev. 2008;72(1):126-56, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.00028-07. PubMed PMID: 18322037; PubMed Central PMCID: PMCPMC2268284.
280. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol Mol Biol Rev. 2005;69(4):585-607. doi: 10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005. PubMed PMID: 16339737; PubMed Central PMCID: PMCPMC1306805.
281. van Heijenoort J. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. Nat Prod Rep. 2001;18(5):503-19. doi: 10.1039/a804532a. PubMed PMID: 11699883.
282. Munshi T, Gupta A, Evangelopoulos D, Guzman JD, Gibbons S, Keep NH, et al. Characterisation of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2013;8(3):e60143. Epub 2013/03/21. doi: 10.1371/journal.pone.0060143. PubMed PMID: 23555903; PubMed Central PMCID: PMCPMC3605390.
283. Pitarque S, Larrouy-Maumus G, Payré B, Jackson M, Puzo G, Nigou J. The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. Tuberculosis (Edinb). 2008;88(6):560-5. Epub 2008/06/09. doi: 10.1016/j.tube.2008.04.002. PubMed PMID: 18539533; PubMed Central PMCID: PMCPMC2613510.
284. Chatterjee D, Hunter SW, McNeil M, Brennan PJ. Lipoarabinomannan. Multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. J Biol Chem. 1992;267(9):6228-33. PubMed PMID: 1556131.
285. Kaur D, McNeil MR, Khoo KH, Chatterjee D, Crick DC, Jackson M, et al. New insights into the biosynthesis of mycobacterial lipomannan arising from deletion of a conserved gene. J Biol Chem. 2007;282(37):27133-40. Epub 2007/07/02. doi: 10.1074/jbc.M703389200. PubMed PMID: 17606615.
286. Kaur D, Berg S, Dinadayala P, Gicquel B, Chatterjee D, McNeil MR, et al. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: role of a branching mannosyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(37):13664-9. Epub 2006/08/31. doi: 10.1073/pnas.0603049103. PubMed PMID: 16945913; PubMed Central PMCID: PMCPMC1557798.
287. Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y, Murakami Y, et al. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. mBio. 2013;4(1):e00472-12. Epub 2013/02/19. doi: 10.1128/mBio.00472-12. PubMed PMID: 23422411; PubMed Central PMCID: PMCPMC3573661.
288. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2005;56(1):20-51. Epub 2005/05/24. doi: 10.1093/jac/dki171. PubMed PMID: 15914491.
289. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. Future Microbiol. 2014;9(10):1165-77. doi: 10.2217/fmb.14.66. PubMed PMID: 25405886.

290. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*. 2009;69(12):1555-623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000. PubMed PMID: 19678712; PubMed Central PMCID: PMCPMC2847397.
291. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med*. 2007;39(3):162-76. doi: 10.1080/07853890701195262. PubMed PMID: 17457715.
292. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(2):254-67. Epub 2014/05/27. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090. PubMed PMID: 24878531.
293. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44. doi: 10.1038/31159. PubMed PMID: 9634230.
294. Sandhu P, Akhter Y. The internal gene duplication and interrupted coding sequences in the MmpL genes of *Mycobacterium tuberculosis*: Towards understanding the multidrug transport in an evolutionary perspective. *Int J Med Microbiol*. 2015;305(3):413-23. Epub 2015/03/18. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.03.005. PubMed PMID: 25841626.
295. Kim EH, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol*. 2011;193(10):2381-7. Epub 2011/03/11. doi: 10.1128/JB.01323-10. PubMed PMID: 21398536; PubMed Central PMCID: PMCPMC3133179.
296. Daury L, Orange F, Taveau JC, Verchère A, Monlezun L, Gounou C, et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun*. 2016;7:10731. Epub 2016/02/12. doi: 10.1038/ncomms10731. PubMed PMID: 26867482; PubMed Central PMCID: PMCPMC4754349.
297. Tekaiia F, Gordon SV, Garnier T, Brosch R, Barrell BG, Cole ST. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber Lung Dis*. 1999;79(6):329-42. doi: 10.1054/tuld.1999.0220. PubMed PMID: 10694977.
298. Domenech P, Reed MB, Barry CE. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect Immun*. 2005;73(6):3492-501. doi: 10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005. PubMed PMID: 15908378; PubMed Central PMCID: PMCPMC1111821.
299. Wells RM, Jones CM, Xi Z, Speer A, Danilchanka O, Doornbos KS, et al. Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003120. Epub 2013/01/31. doi: 10.1371/journal.ppat.1003120. PubMed PMID: 23431276; PubMed Central PMCID: PMCPMC3561183.
300. Searle S, Bright NA, Roach TI, Atkinson PG, Barton CH, Meloen RH, et al. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *J Cell Sci*. 1998;111 ( Pt 19):2855-66. PubMed PMID: 9730978.
301. Cellier MF, Courville P, Champion C. Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes Infect*. 2007;9(14-15):1662-70. Epub 2007/09/15. doi: 10.1016/j.micinf.2007.09.006. PubMed PMID: 18024118.
302. Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, Höner Zu Bentrup K, et al. Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol*. 2005;174(3):1491-500. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1491. PubMed PMID: 15661908.
303. Jones CM, Wells RM, Madduri AV, Renfrow MB, Ratledge C, Moody DB, et al. Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by interrupting siderophore recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(5):1945-50. Epub 2014/01/13. doi: 10.1073/pnas.1311402111. PubMed PMID: 24497493; PubMed Central PMCID: PMCPMC3918798.

304. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev. 2000;24(4):449-67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00550.x. PubMed PMID: 10978546.
305. Balganesch M, Kuruppath S, Marcel N, Sharma S, Nair A, Sharma U. Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(12):5167-72. Epub 2010/10/04. doi: 10.1128/AAC.00610-10. PubMed PMID: 20921309; PubMed Central PMCID: PMC2981279.
306. Wang K, Pei H, Huang B, Zhu X, Zhang J, Zhou B, et al. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China. Curr Microbiol. 2013;66(3):222-6. Epub 2012/11/11. doi: 10.1007/s00284-012-0215-3. PubMed PMID: 23143285.
307. Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drxA* and *drxB* of *Mycobacterium tuberculosis*. Biochem J. 2002;367(Pt 1):279-85. doi: 10.1042/BJ20020615. PubMed PMID: 12057006; PubMed Central PMCID: PMC222852.
308. Seeberg E, Eide L, Bjørås M. The base excision repair pathway. Trends Biochem Sci. 1995;20(10):391-7. doi: 10.1016/s0968-0004(00)89086-6. PubMed PMID: 8533150.
309. Lindahl T. Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;68:xvii-xxx. doi: 10.1016/s0079-6603(01)68084-x. PubMed PMID: 11554316.
310. Krokan HE, Standal R, Slupphaug G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. Biochem J. 1997;325 ( Pt 1):1-16. doi: 10.1042/bj3250001. PubMed PMID: 9224623; PubMed Central PMCID: PMC218522.
311. Jacobs AL, Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. Chromosoma. 2012;121(1):1-20. Epub 2011/11/03. doi: 10.1007/s00412-011-0347-4. PubMed PMID: 22048164; PubMed Central PMCID: PMC3260424.
312. Kurthkoti K, Varshney U. Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria. Tuberculosis (Edinb). 2011;91(6):533-43. Epub 2011/07/18. doi: 10.1016/j.tube.2011.06.005. PubMed PMID: 21764637.
313. Loeb LA. Apurinic sites as mutagenic intermediates. Cell. 1985;40(3):483-4. doi: 10.1016/0092-8674(85)90191-6. PubMed PMID: 2982494.
314. Loeb LA, Preston BD. Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. Annu Rev Genet. 1986;20:201-30. doi: 10.1146/annurev.ge.20.120186.001221. PubMed PMID: 3545059.
315. Puri RV, Singh N, Gupta RK, Tyagi AK. Endonuclease IV Is the major apurinic/aprimidinic endonuclease in *Mycobacterium tuberculosis* and is important for protection against oxidative damage. PLoS One. 2013;8(8):e71535. Epub 2013/08/01. doi: 10.1371/journal.pone.0071535. PubMed PMID: 23936515; PubMed Central PMCID: PMC3731287.