

STRESZCZENIE

Amyloidy wytwarzane przez drobnoustroje, podobnie jak toksyczne amyloidy ludzkie, zbudowane są z włókien, które tworzą strukturę tzw. β -harmonijki. W przeciwieństwie do nieprawidłowo pofałdowanych, toksycznych amyloidów powstających w organizmie człowieka, wiele drobnoustrojów wytwarza tzw. funkcjonalne białka amyloidowe, pełniące ważną rolę w ich adaptacji do zajmowanego środowiska np. ułatwiając adhezję. Wśród pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* zdolność produkcji funkcjonalnych amyloidów tj. fimbrii spiralnych opisano m.in. u gatunku *Escherichia coli*. Funkcjonalne amyloidy znalazły się obecnie w centrum zainteresowania badaczy, jako model pozwalający lepiej zrozumieć naturę patogennych amyloidów tworzonych w organizmie człowieka.

Wiedza na temat roli fimbrii spiralnych w chorobotwórczości człowieka jest ograniczona. Stąd, celem badań zaplanowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena *in vitro* wpływu białek amyloidowych, budujących fimbrie spiralne chorobotwórczych i niepatogennych pałeczek *E. coli* na zmieniony zapalnie nabłonek jelita. Wykonane badania skupiły się na analizie cytotoksyczności oraz immunomodulującego wpływu szczepów *E. coli* prezentujących fimbrie spiralne i izolowanych z nich preparatów amyloidowych dla stymulowanych i niestymulowanych cytokinami prozapalnymi komórek nabłonka jelita. W ramach wykonanych badań oceniano również wpływ oczyszczonych preparatów amyloidowych oraz fimbrii spiralnych na powierzchni badanych szczepów *E. coli* na integralność monowarstwy komórek nabłonka jelita oraz zdolność adhezji i inwazji badanych szczepów *E. coli* do ludzkich komórek nabłonka jelita grubego, stymulowanych bądź nietraktowanych cytokinami prozapalnymi.

Do badań wykorzystano szczepy *E. coli* należące do kolekcji zgromadzonej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego: 1) K12_{C600} – niepatogenny, laboratoryjny szczep *E. coli*; 2) K12_{C600} Δ cs_gBA::kan – pozbawiony zdolności syntezy fimbrii spiralnych izogeniczny mutant szczepu *E. coli* K12; 3) E32/2 – patogenny szczep izolowany z błony śluzowej dziecka z nieokreślonym zapaleniem jelita grubego; 4) E32/2 Δ cs_gBA::kan – pozbawiony zdolności syntezy fimbrii spiralnych izogeniczny mutant szczepu *E. coli* E32/2. Badania *in vitro* przeprowadzono na linii komórek nabłonka jelita grubego Caco-2 (ATCC nr kat. HTB-37) hodowanych przez 21 dni na insertach. W celu wzbudzenia stanu zapalnego na dobę przed zakażeniem komórek do podłoża hodowlanego dodawano mieszaninę cytokin prozapalnych. Wpływ białek amyloidowych badano na podstawie: a) aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej do podłoża hodowlanego przez uszkodzone komórki nabłonka; b) oznaczenia stężenia interleukiny-8 (IL-8); c) pomiarów przezbłonowej oporności elektrycznej monowarstwy komórek.

Badanie stopnia adhezji wykazało, że amyloidowe fimbrie spiralne pałeczek *E. coli*, pełnią ważną rolę w kolonizacji nabłonka jelita. Ponadto, bez względu na potencjał wirulencji obu, badanych szczepów *E. coli*, stan zapalny nabłonka jelita znacząco zwiększał ich adhezję a także inwazję szczepu patogennego do komórek nabłonka. Wykonane w niniejszej pracy pionierskie badania wpływu oczyszczonych monomerów amyloidów uzyskanych z fimbrii spiralnych pałeczek *E. coli* na zmieniony i niezmieniony zapalnie nabłonek jelita, reprezentowany przez zróżnicowaną monowarstwę komórek linii Caco-2, wykazały, że choć antygen ten okazał się nietoksyczny dla badanej linii komórkowej, to jednak obniżał sekrecję prozapalnej chemokiny IL-8, a więc atenuował odczyn zapalny, obniżając równocześnie barierę nabłonka jelita. Ta cecha amyloidowych fimbrii spiralnych czyni je ważnym antygenem, umożliwiającym pałeczkom *E. coli* skuteczną kolonizację nabłonka jelit połączoną z ewazją nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza.