

STRESZCZENIE

Gram-ujemne bakterie *Moraxella catarrhalis* uważa się za bezwzględne patogeny dróg oddechowych związane z zaostrzeniami objawów w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP) dorosłych i ostrym zapaleniu ucha środkowego u dzieci. Bakterie te dysponują szeregiem czynników wirulencji zaangażowanych w adhezję do nabłonka i składników macierzy zewnątrzkomórkowej, wiązanie żelaza z białek gospodarza oraz ochronę przed nieswoistą i swoistą odpowiedzią immunologiczną. Ważnym nośnikiem wspomnianych czynników wirulencji są, produkowane przez wszystkie bakterie Gram-ujemne, pęcherzyki błony zewnętrznej (OMVs).

OMVs to uwalniane do otoczenia, sferyczne nanostruktury, które stanowiąc rezerwuuar bakteryjnych, powierzchniowych antygenów pełnią pleiotropowe funkcje, również z dala od komórek rodzicielskich. Funkcje te przekładają się na ich istotną rolę w bakteryjnej inwazji i immunomodulacji, a spektrum oddziaływań OMVs obejmuje zarówno interakcje drobnoustrojów z tkankami gospodarza jak i innymi mikroorganizmami zasiedlającymi tę samą niszę.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka uwalnianych przez bakterie *M. catarrhalis* OMVs jako nośników czynników wirulencji oraz dostarczenie nowych informacji na temat ich interakcji z układem odpornościowym oraz innymi bakteriami współtowarzyszącymi. Wiedza ta pozwoli na lepsze zrozumienie procesów patofizjologicznych leżących u podstaw w zakażeniach związanych z *M. catarrhalis*.

Przed rozpoczęciem badań postawiono trzy hipotezy badawcze:

- (1) OMVs *M. catarrhalis* zawierają w swoich strukturach liczne immunodominujące antygeny o charakterze czynników wirulencji.
- (2) OMVs *M. catarrhalis* w interakcjach wewnątrz- i międzygatunkowych modulują wrażliwość Gram-ujemnych patogenów na działanie dopełniacza i peptydów kationowych.
- (3) OMVs *M. catarrhalis* poprzez immunomodulację nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej zaburzają odpowiedź gospodarza na zakażenie.

W celu weryfikacji pierwszej z hipotez dokonano charakterystyki strukturalnej i biochemicznej badanych OMVs stosując transmisyjną mikroskopię elektronową, pomiary potencjału Zeta oraz rozdziały elektroforetyczne. Z kolei za pomocą metod immunoproteomicznych określono profil immunodominujących białek pęcherzykowych. Wykazano, że charakteryzujące się ujemnym potencjałem elektrokinetycznym i niewielkimi rozmiarami (20 – 220 nm średnicy) OMVs *M. catarrhalis* stanowią źródło konserwatywnych, silnie immunogennych białek wirulencji oraz lipooligosacharydu. W strukturach OMVs zidentyfikowano białka strukturalne, a także odpowiedzialne za adhezję (Hag/MID, OMP CD, UspA1, OMP J), oporność na surowicę (UspA2, OMP CD, OlpA, OMP E, CopB) i pozyskiwanie żelaza (TbpB, CopB). Ponadto w badanych pęcherzykach po raz pierwszy zidentyfikowano takie proteiny jak: Lpd o nieznanej u *M. catarrhalis* funkcji, strukturalne MipA i zaangażowane w pozyskiwanie żelaza z hemoglobiny białko MhuA.

Celem weryfikacji hipotezy drugiej zbadano wpływ OMVs na przeżywalność drobnoustrojów w układach wewnątrz- i międzygatunkowych w obecności czynników permeabilizujących błonę: surowicy ludzkiej (NHS) jako źródła składowych układu dopełniacza oraz polimyksyny B (PB). Doświadczenia te pokazały, że dodatek OMVs *M. catarrhalis* zapewnia pasywną ochronę *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* przed bakteriobójczym działaniem testowanych substancji. Następnie dowiedziono, że obserwowana ochrona jest wynikiem zależnej od oddziaływań elektrostatycznych, sekwestracji NHS i PB przez wolne pęcherzyki, co potwierdzono w funkcjonalnych testach permeabilizacji jak i wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Szkodliwe działanie OMVs, wyrażone wzmaganiem wirulencji bakterii w ich obecności poprzez ochronę przed

działaniem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej pokazano także *in vivo* na modelu *Galleria mellonella* zakażanej *H. influenzae*.

Immunomodulujący charakter OMVs zakładany w hipotezie trzeciej w pierwszej kolejności sprawdzono w testach stymulacji mechanizmów humoralnej swoistej odpowiedzi immunologicznej. W tym celu przeprowadzono immunizację myszy BALB/c z wykorzystaniem OMVs dwóch odmiennych fenotypowo szczepów *M. catarrhalis*. Wykazano, że odpowiedź na antygeny pęcherzykowe charakteryzuje produkcja dużej liczby specyficznych przeciwciał IgG. Stwierdzono, że badane OMVs są rozpoznawane zarówno przez homologiczne jak i krzyżowo-reagujące przeciwciała IgG, powstałe w odpowiedzi na pęcherzykowe antygeny, przy czym najsilniejsza reaktywność nakierowana była wobec białek wirulencji z grupy adhezyn oraz generujących oporność na dopełniacz. Co więcej, pokazano, że uzyskane przeciwciała IgG anty-OMVs pełnią funkcje protekcyjne przed zakażeniami ze strony *M. catarrhalis* w układzie homologicznym, zmniejszając przeżywalność szczepu opornego na dopełniacz w obecności NHS.

Następnie, w panelu doświadczeń dotyczących modulacji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej przetestowano wpływ OMVs na indukcję cytokin prozapalnych, aktywację układu dopełniacza oraz modulację aktywności komórek żernych.

Wykazano, że OMVs, stanowiące rezerwuuar bakteryjnych, powierzchniowych antygenów, za pośrednictwem receptorów TLR, pobudzają produkcję cytokin prozapalnych IL-6, IL-8 i TNF- α przez komórki epitelialne płuc oraz monocyty. Pokazano również, że badane OMVs aktywują formowanie się rozpuszczalnej formy kompleksu atakującego błonę (MAC) układu dopełniacza surowicy ludzkiej, a aktywacja przebiega na szlakach klasycznym i alternatywnym, z przewagą tego pierwszego. Za przyczynę tej przewagi odpowiada prawdopodobnie większa pula naturalnie obecnych w surowicy ludzkiej przeciwciał krzyżowo-reagujących anty-OMVs *M. catarrhalis*.

W kolejnych krokach zbadano wpływ OMVs na modulację aktywności komórek żernych. W tym celu przeprowadzono doświadczenia zależnej od OMVs fagocytozy *M. catarrhalis* przez monocyty. Doświadczenia te pokazały, że OMVs mogą wykazywać potencjał hamujący w procesie internalizacji drobnoustrojów w układach wewnątrz- i międzygatunkowych. Z kolei, ze względu na istotną rolę jaką odgrywają neutrofile w przeciwbakteryjnej ochronie dróg oddechowych, a także wiedząc, że u pacjentów z POChP dochodzi do chronicznego zapalenia o charakterze neutrofilowym przetestowano wpływ OMVs *M. catarrhalis* na te komórki. Badania udowodniły, że OMVs stymulują degranulację wszystkich typów neutrofilowych ziarnistości, mogąc się przyczyniać tym samym do amplifikacji reakcji zapalnej w miejscu zakażenia. Ponieważ jednym z kluczowych enzymów uwalnianych podczas degranulacji jest elastaza neutrofilowa (NE) przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu weryfikację potencjalnego znaczenia tego enzymu w interakcjach patogen-gospodarz. Eksperymenty te pokazały, że NE oddziałuje proteolitycznie na białka OMP CD i McaP stanowiące czynniki wirulencji *M. catarrhalis*, a w przypadku OMP CD potwierdzono związek pomiędzy enzymatycznym trawieniem białka a uwrażliwieniem na działanie NHS. Wykazano także oporność *M. catarrhalis* na bakteriobójcze działanie NE.

Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki dowodzą, że uwalniane do otoczenia OMVs, pełnią funkcję czynników wirulencji *M. catarrhalis* zapewniając ochronę przed mechanizmami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej oraz antybiotyków peptydowych na przykładzie PB. Ponadto, OMVs jako nośniki immunodominujących białek pobudzają generowanie specyficznych przeciwciał IgG i są zdolne do aktywacji reakcji prozapalnej, aktywacji układu dopełniacza oraz mogą modulować internalizację drobnoustrojów w procesie fagocytozy. Zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej badania stanowią ważne poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat wzajemnych relacji gospodarz - *M. catarrhalis*. Ponadto przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat ogólnego znaczenia OMVs w biologii drobnoustrojów.

29.06.2023

Justyna Roszkowicz

ABSTRACT

Gram-negative *Moraxella catarrhalis* bacteria are considered as airway pathogens associated with symptom exacerbations in adult chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and acute otitis media in children. These bacteria possess a number of virulence factors involved in adhesion to the epithelium and extracellular matrix components, iron binding to host proteins, and protection against innate and adaptive immune responses. An important carrier of the abovementioned virulence factors are outer membrane vesicles (OMVs) produced by all Gram-negative bacteria.

OMVs are spherical nanostructures released into the environment. OMVs serve as a reservoir of bacterial surface antigens and perform pleiotropic functions away from the parental cells. These functions implicate their important role in bacterial invasion and immunomodulation, and the spectrum of OMVs' interactions includes both microbial interactions with host tissues and other microorganisms inhabiting the same niche.

The aim of this study was to characterize the OMVs released by *M. catarrhalis* bacteria as carriers of virulence factors and to provide new information on their interactions with the immune system and other associated bacteria. Outcoming knowledge will give a better understanding of the underlying pathophysiological processes in *M. catarrhalis*-associated infections.

Prior to the study, three research hypotheses were established:

- (1) *M. catarrhalis* OMVs contain numerous immunodominant antigens as virulence factors in their structures.
- (2) *M. catarrhalis* OMVs modulate the sensitivity of Gram-negative pathogens to complement and cationic peptides in intra- and interspecies interactions.
- (3) *M. catarrhalis* OMVs disrupt the host response to infection through immunomodulation of innate and adaptive immune responses.

To verify the first hypothesis, structural and biochemical characterization of the OMVs was performed using transmission electron microscopy, Zeta potential measurements and electrophoretic separations. Moreover, the profile of immunodominant vesicular proteins was determined using immunoproteomic methods. It was shown that, characterized by a negative electrokinetic potential and small size (20 - 220 nm in diameter), *M. catarrhalis* OMVs are the source of conserved, highly immunogenic virulence proteins and lipooligosaccharide. Structural proteins were identified in the composition of OMVs, as well as those responsible for adhesion (Hag/MID, OMP CD, UspA1, OMP J), serum resistance (UspA2, OMP CD, OmpA, OMP E, CopB) and iron acquisition (TbpB, CopB). In addition, proteins such as Lpd with an unknown function in *M. catarrhalis*, structural MipA and involved in iron acquisition from hemoglobin MhuA protein were identified in the studied vesicles for the first time.

In order to verify the second hypothesis, the effect of OMVs on the survival of microorganisms in intra- and interspecies systems was examined in the presence of membrane permeabilizing agents: human serum (NHS) as a source of components of the complement system and polymyxin B (PB). These experiments showed that the addition of *M. catarrhalis* OMVs provided passive protection of *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* against the bactericidal effect of the test substances. Subsequently, the observed protection was proven to be the result of electrostatic interaction-dependent sequestration of NHS and PB by free vesicles. It was confirmed by functional permeabilization tests as well as high-performance liquid chromatography. The deleterious effect of OMVs, expressed by enhancing bacterial virulence and protection from the innate immune response, was also shown *in vivo* in the *Galleria mellonella* infected with *H. influenzae*.

The immunomodulatory character of OMVs assumed in hypothesis three was firstly analysed in tests related to stimulation of humoral adaptive immune response. BALB/c mice were immunized

with OMVs from two phenotypically distinct strains of *M. catarrhalis*. The response to vesicular antigens was characterized by the production of a large number of specific IgG antibodies. The OMVs were found to be recognized by both homologous and cross-reactive IgG antibodies formed in response to vesicular antigens. The strongest reactivity was directed against adhesins, and proteins related to complement resistance. Moreover, the obtained anti-OMVs IgG antibodies were shown to have protective functions against *M. catarrhalis* infections in the homologous system by reducing the survival of the complement-resistant strain in the presence of NHS.

Next, a panel of experiments on modulation of the innate immune response was performed. OMVs-dependent induction of pro-inflammatory cytokines, activation of the complement system and modulation of the activity of phagocytes was tested.

The OMVs, which are a reservoir of bacterial surface antigens, were shown to stimulate the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF- α by lung epithelial cells and monocytes via TLR receptors. It was also presented that the OMVs activate the formation of the soluble form of the membrane attack complex (MAC) of the human serum complement system. That activation proceeds through classical and alternative pathways, with the classical one predominating. A larger pool of naturally present anti-OMVs *M. catarrhalis* cross-reacting antibodies in human serum is likely responsible for this predominance.

In the next steps, the effect of OMVs on modulating the activity of phagocytes was investigated. Experiments of OMVs-dependent phagocytosis of *M. catarrhalis* by monocytes were carried out. These experiments showed that OMVs can exhibit inhibitory potential in the process of internalization of microorganisms in intra- and interspecies systems. In turn, due to the important role played by neutrophils in the antimicrobial protection of the airways and knowing that COPD patients develop chronic inflammation of a neutrophilic nature, the effect of *M. catarrhalis* OMVs on these cells was tested. The study proved that OMVs stimulate degranulation all types of neutrophilic granules, thus possibly contributing to the amplification of the inflammatory response at the site of infection. Since the neutrophil elastase (NE) is one of the key enzymes released during degranulation, a series of experiments were conducted to verify the role of this enzyme in pathogen-host interactions. It was shown that NE interacts proteolytically with OMP CD and McaP proteins, which are virulence factors of *M. catarrhalis*. Moreover, in the case of OMP CD, a link between enzymatic digestion of the protein and sensitization to NE was confirmed. *M. catarrhalis* was also resistant to the bactericidal action of NE.

The results presented in the dissertation demonstrate that OMVs, released into the environment, act as virulence factors of *M. catarrhalis* providing protection against innate immune response mechanisms and peptide antibiotics on the example of PB. Additionally, OMVs as carriers of immunodominant proteins stimulate the generation of specific IgG antibodies and can activate the proinflammatory response, the complement system, and can modulate the internalization of microorganisms in phagocytosis. The research presented in this dissertation represent an important expansion of previous knowledge of the host-*M. catarrhalis* interactions. In addition, the presented results are an important contribution to expand the general knowledge of OMVs' role in microbial biology.

antigens was characterized by the production of a large number of specific IgG antibodies. The OMVs were found to be recognized by both homologous and cross-reactive IgG antibodies formed in response to vesicular antigens. The strongest reactivity was directed against adhesins, and proteins related to complement resistance. Moreover, the obtained anti-OMVs IgG antibodies were shown to have protective functions against *M. catarrhalis* infections in the homologous system by reducing the survival of the complement-resistant strain in the presence of NHS.

Next, a panel of experiments on modulation of the innate immune response was performed. OMVs-dependent induction of pro-inflammatory cytokines, activation of the complement system and modulation of the activity of phagocytes was tested.

The OMVs, which are a reservoir of bacterial surface antigens, were shown to stimulate the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF- α by lung epithelial cells and monocytes via TLR receptors. It was also presented that the OMVs activate the formation of the soluble form of the membrane attack complex (MAC) of the human serum complement system. That activation proceeds through classical and alternative pathways, with the classical one predominating. A larger pool of naturally present anti-OMVs *M. catarrhalis* cross-reacting antibodies in human serum is likely responsible for this predominance.

In the next steps, the effect of OMVs on modulating the activity of phagocytes was investigated. Experiments of OMVs-dependent phagocytosis of *M. catarrhalis* by monocytes were carried out. These experiments showed that OMVs can exhibit inhibitory potential in the process of internalization of microorganisms in intra- and interspecies systems. In turn, due to the important role played by neutrophils in the antimicrobial protection of the airways and knowing that COPD patients develop chronic inflammation of a neutrophilic nature, the effect of *M. catarrhalis* OMVs on these cells was tested. The study proved that OMVs stimulate degranulation all types of neutrophilic granules, thus possibly contributing to the amplification of the inflammatory response at the site of infection. Since the neutrophil elastase (NE) is one of the key enzymes released during degranulation, a series of experiments were conducted to verify the role of this enzyme in pathogen-host interactions. It was shown that NE interacts proteolytically with OMP CD and McaP proteins, which are virulence factors of *M. catarrhalis*. Moreover, in the case of OMP CD, a link between enzymatic digestion of the protein and sensitization to NE was confirmed. *M. catarrhalis* was also resistant to the bactericidal action of NE.

The results presented in the dissertation demonstrate that OMVs, released into the environment, act as virulence factors of *M. catarrhalis* providing protection against innate immune response mechanisms and peptide antibiotics on the example of PB. Additionally, OMVs as carriers of immunodominant proteins stimulate the generation of specific IgG antibodies and can activate the pro-inflammatory response, the complement system, and can modulate the internalization of microorganisms in phagocytosis. The research presented in this dissertation represent an important expansion of previous knowledge of the host-*M. catarrhalis* interactions. In addition, the presented results are an important contribution to expand the general knowledge of OMVs' role in microbial biology.

29.06.2023

Justyna Lonkiewicz