

# Badanie funkcji biologicznych białek ogonka bakteriofagów *Yersinia enterocolitica*

## Streszczenie

Bakteriofagi są obiektem badań głównie w kontekście użycia ich w terapii przeciwko zakażeniom bakteryjnym. Pomimo korzyści jakie posiada terapia fagowa, istnieją także ograniczenia używania cząstek fagowych takie jak np. horyzontalny transfer genów (HTG). Najpoważniejszym skutkiem HTG może być nabywanie czynników wirulencji przez bakterie, stąd terapia fagowa pozostaje terapią wysokiego ryzyka. W związku z powyższym wiele badań naukowych koncentruje się na charakterystyce poszczególnych elementów wirionów fagowych, a mianowicie białkach, które mogą mieć funkcje enzymatyczne lub mogą być wykorzystane w diagnostyce patogenów. Początkowo bardzo intensywnie badano enzymy fagowe takie jak depolimerazy czy endolizyny powodujące lizę bakterii od wewnątrz komórki. Jednak obecnie uwaga naukowców została skierowana na białka ogonka. Białka ogonka bakteriofagów, do których zaliczamy białka tubularne oraz włókienkowe oprócz funkcji strukturalnej czyli budulcowej mogą pełnić funkcje enzymatyczne względem zewnętrznych struktur na powierzchni bakterii. Białka włókienkowe pełnią funkcję rozpoznającą i wiążącą receptor na komórkach bakteryjnych, czyli są białkami adhezyjnymi. Wśród białek ogonkowych występuje duża różnorodność, wynikająca z procesów adaptacyjnych, które w dużej mierze są wynikiem koewolucji fagów oraz ich gospodarzy. Z tego też względu na podstawie analizy porównawczej sekwencji nukleotydowych nie jest możliwe określenie przewidywanej funkcji tych białek. Dopiero badania eksperymentalne dają możliwość poznania ich właściwości.

Do badań będących tematem niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano fagi ogonkowe *Yersinia enterocolitica*  $\phi$ 80-18 oraz  $\phi$ YeO3-12 należące do rodziny *Podoviridae*. Gospodarzem dla tych fagów jest *Yersinia enterocolitica*, patogen jelitowy, który powoduje chorobę u ludzi i niektórych zwierząt. Zakażenie tym patogenem wiąże się z wystąpieniem głównego objawu, którym jest wodnista biegunka, wynikająca ze stanu zapalnego toczącego się w jelitach. Jest to choroba odzwierzęca, którą możemy się głównie zarazić poprzez spożycie wieprzowiny. Według ECDC (Europejskie Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób) w 2019 zanotowano 7048 przypadków jersiniozy w 29 europejskich krajach. Ze względu na charakter choroby liczba ta wydaje się niedoszacowana i faktyczny odsetek chorujących prawdopodobnie jest większy. Szersza diagnostyka tego schorzenia jest przeprowadzana dopiero w momencie występowania większego ogniska zakażeń, bądź kiedy infekcja prowadzi do hospitalizacji. Diagnostyka *Yersinia enterocolitica* jest oparta głównie o metody hodowlane, które w dużej mierze są czasochłonne, oraz dodatkowo wymagają potwierdzenia w metodach molekularnych czy z wykorzystaniem spektrometrii mas. Gatunek *Yersinia enterocolitica* stanowi heterogenna grupa szczepów, które są wyróżniane na podstawie biotypowania oraz serotypowania. Wyróżniamy odpowiednio 6 biotypów oraz 57 O serotypów, co dodatkowo komplikuje identyfikację w obrębie gatunku. Znanym w literaturze podejściem, jest możliwość użycia białek ogonkowych do diagnostyki patogenów. Białka te często posiadają w swojej sekwencji regiony, które specyficznym rozpoznają dany patogen, może się to przyczyniać do szybszego stawiania diagnozy już w momencie zaistnienia infekcji.

Celem rozprawy doktorskiej była charakterystyka białek ogonka fagów pod kątem właściwości enzymatycznych oraz adhezyjnych i ocena możliwości praktycznego ich wykorzystania zarówno w zwalczaniu jak i detekcji *Yersinia enterocolitica*.

Badania prowadzące do osiągnięcia powyższego celu zostały ujęte w opublikowanym cyklu czterech prac oryginalnych. Są one poszerzone także o badania właściwości biologicznych bakteriofaga  $\phi$ 80-18. W pierwszej pracy badano funkcje oraz mechanizm działania białka TTPAgp11 (ang. Tail Tubular Protein A) pochodzącego z faga  $\phi$ YeO3-12. Jest to białko z grupy białek TTPA, do której należy gp31 z faga *Klebsiella pneumoniae* KP32 wykazującego aktywność  $\alpha$ -1,4-glukozydazy. W celu wykazania, czy białko TTPAgp11 również posiada tą samą aktywność enzymatyczną co białko TTPAgp31, wyprodukowano białko rekombinowane TTPAgp11, następnie użyto skrobi (komercyjny substrat Red-Starch) i maltozy jako substratów w testach trawienia z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej i chromatografii gazowej. Wykazano, że białko to posiada aktywność hydrolityczną względem badanych substratów i możemy je sklasyfikować do enzymów z rodziny  $\alpha$ -1,4-glukozydaz. Dzięki temu potwierdzono hipotezę o dwufunkcyjności białek ogonkowych (ang. dual-function protein) również w przypadku fagów *Yersinia*.

Druga praca cyklu dotyczyła ogólnej charakterystyki bakteriofaga  $\phi$ 80-18. Została ona zainicjowana trudnościami z namnożeniem faga, a co za tym idzie, brakiem możliwości ekstrakcji matrycy DNA niezbędnej do syntezy genów białek ogonkowych. Okazało się także, że brakuje danych literaturowych na temat jego biologii i ogólnej charakterystyki. Bakteriofag został wyizolowany w latach 90, natomiast dopiero w 2020 roku został opisany właśnie przy okazji realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Dla faga  $\phi$ 80-18 wyznaczono krzywą wzrostu (ang. one-step growth curve), określono jego stabilność w szerokim zakresie pH oraz temperatury, przeanalizowano przynależność filogenetyczną, ale także przeprowadzono analizę genomu i proteomu oraz wyznaczono zakres gospodarzy. Analiza filogenetyczna potwierdziła przynależność faga do rodziny *Podoviridae* oraz podrodziny *Autographivirinae*. Gospodarzem dla tego faga jest patogenny szczep *Y. enterocolitica* O:8 biotyp 1B, ale również serotypy: O:4, O:4,32, O:20 i O:21. Otrzymane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania  $\phi$ 80-18 w biokontroli amerykańskiego biotypu 1B *Y. enterocolitica*.

Trzecia przedstawiona praca dotyczyła charakterystyki białek TTPBgp12 (ang. Tail Tubular Protein B) oraz TFPgp17 (ang. Tail Fiber Protein), które pochodzą z faga  $\phi$ YeO3-12. Białka te przynależą do odpowiednich grup białek opisanych wcześniej dla bakteriofagów *Klebsiella pneumoniae*. Z tego też względu, białko TTPBgp12 oprócz funkcji strukturalnej, było rozpatrywane pod kątem posiadania funkcji enzymatycznej. Nie udało się wyznaczyć specyficzności substratowej dla białka TTPBgp12. W toku badań stwierdzono natomiast, że białko to hamuje wzrost bakterii i spowalnia rozwój biofilmu bakteryjnego *Y. enterocolitica*. W pracy przedstawiono obszerną analizę porównawczą *in silico* dla obu białek. Ciekawy wynik uzyskano z analizy dla białka TFPgp17, dla którego wykazano podobieństwo do białka RsaA obecnego w warstwie S u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Podobieństwo strukturalne obu białek fagowego i bakteryjnego może być wynikiem ewolucyjnego przystosowania się wirusa do efektywnego infekowania swojego gospodarza. W pracy przedstawiono także wyniki testów dotyczących stabilności białek ogonka w obecności

wybranych cukrów. Najistotniejszym okazał się wpływ stabilizujący N-acetylogalaktozaminy na białko TFPgp17. GalNac jest głównym źródłem węgla dla bakterii *Yersinia* w przewodzie pokarmowym człowieka oraz świń. Nie dziwi więc fakt, że ten aminocukier może stabilizować całe cząstki fagowe tam obecne. Wykonane badania mogą częściowo potwierdzać tę hipotezę.

Ostatnia przedstawiona praca dotyczyła białka TFPgp17 i jego wykorzystania jako specyficznej adhezyny wykrywającej patogenny serotyp O:3 *Yersinia enterocolitica*. Białko TFPgp17 wyprodukowano w kompleksie z MBP (ang. maltose binding protein) z metką histydynową, co było konieczne do umożliwienia detekcji, nie zakłócało właściwości adhezyjnych białka fagowego i dodatkowo pozwalało na znaczne skrócenie procedury oczyszczania. Ponadto obecność metki daje możliwość immobilizacji białka (za pomocą metki) do nośnika np. czujnika światłowodowego w ściśle ukierunkowany, nieprzypadkowy sposób i wykorzystania do opracowania czujników np. optycznych. W przeprowadzonych badaniach wykonano test ELISA, w którym analizowano nie tylko szczepy *Y. enterocolitica* o różnych serotypach, ale także inne szczepy m.in. *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Test miał na celu ocenę specyficzności białka TFPgp17. Wykazano, że było ono wysoce specyficzne i umożliwiało detekcję tylko *Y. enterocolitica* o serotypie O:3. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników wykonano analizę w mikroskopii TEM, gdzie immobilizowano bakterie do siatki, a następnie inkubowano z TFPgp17. Detekcja utworzonego połączenia między białkiem, a bakterią była możliwa właśnie dzięki obecności zastosowanej metki, która była wykrywana przeciwciałami anty-metka zmodyfikowanymi złotem koloidalnym. Obrazowanie TEM pokazało przyczepianie się kompleksu TFPgp17-MBP/his tag na powierzchni komórki bakteryjnej *Y. enterocolitica* O:3, co było potwierdzeniem wyników otrzymanych w teście ELISA.

Podsumowując, cel pracy doktorskiej został osiągnięty. W toku badań udało się uzyskać i scharakteryzować 3 białka ogonka bakteriofagów. Dla dwóch z nich, obok funkcji strukturalnej, udało się wykazać właściwości biologiczne i tak dla białka TTPAgp11 określono funkcję enzymatyczną,  $\alpha$ -1,4-glukozydazy, dla białka TTPBgp12 wykazano znaczący wpływ hamujący wzrost bakterii patogennych i tworzenia się biofilmu bakteryjnego. Wskazanie antyseptycznego potencjału białka TTPBgp12 może być wykorzystane do rozwoju preparatów biologicznie czynnych w przyszłości. W przypadku białka włókienkowego TFPgp17 potwierdzono jego adhezyjną funkcję. Określono jego specyficzność względem bakterii. Ponadto opracowano wydajną i szybką metodę uzyskiwania tego białka w formie zmodyfikowanej do szerokiego zastosowania w rozwoju biosensorów do szybkiej detekcji skażeń *Yersinia enterocolitica* serotypu O:3.