**Immunogenność bakteriofagów z grupy PB1 u człowieka i w modelu mysim**

Bakterie *Pseudomonas* powodują trudne do pokonania infekcje zarówno u ludzi jak i zwierząt. Duża część tych bakterii to szczepy antybiotykooporne. Badania wirusów bakteryjnych atakujących bakterie *Pseudomonas*,takich jak grupa PB1są, więcważne dla rozwoju terapii fagowej, jako alternatywy dla często nieskutecznych antybiotyków. Bakteriofagi PB1 są jednak bardzo słabo poznane, istnieje niewiele doniesień literaturowych opisujących budowę tych fagów. Ponadto do chwili obecnej nie przedstawiono żadnych danych pozwalających na powiązanie charakterystyki molekularnej bakteriofagów PB1 z ich reaktywnością immunologiczną.

 Celem niniejszej pracy doktorskiej było porównanie immunogenności fagów z grupy PB1 oraz powiązanie występujących różnic immunogenności z różnicami w molekularnej budowie, na przykładzie fagów F8, LMA2 i P1. Badanie obejmowało określenie wpływu przeciwciał specyficznych względem bakteriofagów, na aktywność przeciwbakteryjną tych wirusów, a także badanie lokalizacji wybranych białek fagowych.

 Punktem wyjścia do prowadzonych badań było porównanie *in vivo* oraz *in vitro* immunogenności bakteriofagów z grupy BP1. Wykorzystano trzy fagi z tej grupy: Bakteriofag F8, używany w leczeniu pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej (IITD) we Wrocławiu, fag LMA2, otrzymany dzięki współpracy z prof. Robem Lavigne, (Katholieke Universiteit Leuven, Belgia) oraz P1 otrzymany dzięki współpracy z prof. Joany Azeredo (University of Minho, Portugalia).

 Porównano zdolność tych bakteriofagów do wzbudzania produkcji specyficznych przeciwciał klasy IgM i IgG w modelu mysim. Myszy immunizowano wysokooczyszczonymi preparatami fagowymi i monitorowano w surowicy zwierząt poziom przeciwciał IgM oraz IgG specyficznych do każdego faga przez 160 dni. Stwierdzono, że początkowo najwyższy poziom przeciwciał zaobserwowano dla faga LMA2, jednakże podczas trwania doświadczenia poziom przeciwciał wobec LMA2 spadł na rzecz faga P1, który wzbudzał najdłużej utrzymywany poziom IgG.

 *In vitro* zbadano surowice pochodzących od 55-osobowej grupy zdrowych osób, które nigdy nie zostały poddane terapii fagowej. Stwierdzono, że wśród badanej populacji najczęściej występowały przeciwciała skierowane przeciwko bakteriofagowi P1: 40% prób, znacznie częściej niż specyficzne do LMA2 i F8, odpowiednio 11% i 15%.

Badania nad określeniem związku pomiędzy strukturą molekularną fagów, a ich zdolnością do wzbudzania odpowiedzi układu odpornościowego zostały rozpoczęte poprzez wytypowanie genów kodujących białka strukturalne w tych fagach (ORF18, ORF22, ORF29). Geny zostały sklonowane oraz zoptymalizowano ekspresje tych białek w systemie *Escherichia coli*. Opracowano protokoły produkcji wysokooczyszczonych preparatów z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, proteolizy, chromatografii sitowej, chromatografii powinowactwa LPS (EndoTrap®HD) oraz dializ. Otrzymane białka wykorzystano do immunizacji w modelu mysim oraz jako antygeny w detekcji przeciwciał specyficznych do poszczególnych białek po immunizacji zwierząt całymi bakteriofagami, a także w badaniach próbek surowicy ludzkiej zdrowych dawców i pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej IITD.

W próbkach surowic zwierząt immunizowanych fagami F8, LMA2 oraz P1 porównano poziom przeciwciał klasy IgM oraz IgG (specyficznych do wyekspresjonowanych grup białek gp18, gp22, gp29). Stwierdzono, że poziom przeciwciał indukowanych przez białko gpP18 z faga P1 jest istotnie wyższy niż ten indukowany przez gp18 z faga terapeutycznego F8. Za silne właściwości immunogenne białka gpP18 odpowiada najprawdopodobniej obecny w nim motyw 'MMAFK/KIAPE' (dane te zostały uzyskane poprzez analizę bioinformatyczną wykonaną przez mgr Marka Harhalę, IITD).

Wysoka immunogenność faga P1 oraz białka gpP18 nie została potwierdzona w badaniach nad naturalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko wybranym białkom strukturalnym fagów PB1 w próbkach surowicy ludzkiej. Najwyższą częstość występowania naturalnych przeciwciał zaobserwowano w stosunku do białek pochodzących z bakteriofaga LMA2. Wyniki te nie pokrywają się z danymi dotyczącymi białek strukturalnych uzyskanymi w badaniach na modelu mysim. Jednakże można je odnieść do danych otrzymanych podczas immunizacji zwierząt całymi cząstkami fagowymi, gdzie początkowo bakteriofag LMA2 wykazywał najwyższy poziom wzbudzanych przeciwciał. Badania te mogą świadczyć o tym, że krótkotrwały kontakt z fagiem LMA2 powoduje wzrost poziomu przeciwciał, natomiast z czasem ilość przeciwciał w stosunku do tego faga spada. Ponadto proces wytworzenia odpowiedzi immunologicznej jest złożony i może zależeć od różnych czynników wpływających na immunogenność białek fagowych do tej pory jeszcze dobrze niepoznanych.

Za pomocą technik immunomikroskopii elektronowej zlokalizowano białko gpP18, znajdujące się na główce bakteriofaga P1 oraz potwierdzono lokalizację białek gpP22 oraz gpP29. Białko gpP22 jest białkiem występującym w narożnikach kapsydu, natomiast gpP29 buduje ogonek faga P1.

Efekt wpływu specyficznych przeciwciał na aktywność faga *in vivo* zbadano na przykładzie terapeutycznego faga F8, określając koncentrację bakteriofaga we krwi i innych tkankach w modelu mysim. Porównano myszy pre-immunizowane do myszy, które nie miały kontaktu z fagiem. Aktywność faga we krwi myszy poddanych wstępnej immunizacji (wysoki poziom przeciwciał IgM) była znacznie niższa w stosunku do kontroli już po 1 godzinie od podania faga. U zwierząt mających wysoki poziom IgG fag został całkowicie zneutralizowany. Analogiczna tendencja była zaobserwowana w wątrobie, śledzionie, nerkach, węzłach chłonnych i mięśniach. Wyniki laboratoryjne obejmujące interakcje faga F8 z układem immunologicznym zostały użyte do stworzenia modelu matematycznego (dr Jarosław Drapała, Politechnika Wrocławska). Model ten ma praktyczne implikacje, gdyż pozwala na estymację przebiegu fagoterapii w zadanych warunkach z uwzględnieniem trójstronnych interakcji bakteriofaga, bakterii i układu immunologicznego.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki stanowią pierwszą próbę powiązania cech molekularnej budowy bakteriofagów z grupy PB1 z ich wpływem na układ immunologiczny. Pełna wiedza dotycząca interakcji fagów z układem immunologicznym może pozytywnie wpłynąć na optymalizację terapeutycznego zastosowania bakteriofagów. Ponadto może ułatwić proces doboru danego faga do sytuacji konkretnego pacjenta, w tym jego statusu immunologicznego, w celu zastosowania jak najkorzystniejszego rozwiązania terapetycznego.