

Tytuł: Ocena zdolności białek kapsydowych bakteriofaga T4 do modulowania reakcji zapalnej

Streszczenie

Wirusy wywołują silną reakcję zapalną u zwierząt i ludzi. Zwykle to białka je budujące nadają im immunostymulujący charakter. Aktywując szlaki sygnałowe przyczyniają się do indukcji produkcji mediatorów stanu zapalnego. Potencjalny wpływ wirusów bakteryjnych na mediatory procesu zapalnego w organizmach wyższych powinien być więc rozpatrywany ze względu na perspektywę ich medycznych lub weterynaryjnych zastosowań.

Celem niniejszej pracy była ocena zdolności białek kapsydowych bakteriofaga T4 do modulowania reakcji zapalnej. Spośród licznej i wszechobecnej grupy fagów ogonkowych podobnych do T4, to właśnie T4 został jako pierwszy całkowicie zsekwencjonowany i dokładnie scharakteryzowany. Jest to też wirus reprezentujący dużą grupę podobnych fagów, bardzo powszechnych w środowisku i w organizmach ludzi i zwierząt.

W pierwszej części niniejszej pracy zbadano białka budujące dojrzałą formę główki bakteriofaga T4: gp23*, gp24*, Hoc i Soc. Geny kodujące powyższe białka zostały sklonowane do wektorów ekspresyjnych, a następnie zoptymalizowano ich ekspresję i oczyszczanie. Uzyskano preparaty białkowe o wysokiej czystości, które zastosowano do dalszych badań.

Oceniono wpływ otrzymanych preparatów białek fagowych na produkcję czynników zaangażowanych w reakcję zapalną. Przeprowadzone przesiewowe testy produkcji kilkudziesięciu czynników immunologicznych (macierze cytokinowe RayBio® Cytokine Array) w modelu mysim i *ex vivo* w krwi ludzkiej wykazały, że gp23*, gp24*, Hoc i Soc nie wpływają na aktywność cytokin zapalnych, np. IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12 p40/p70, IFN- γ , TNF- α , chemokin np. IL-8, MCP-1, MIG, RANTES, czynników wzrostu, np. MCSF, GCSF, GM-CSF, VEGF, mediatorów zapalenia związanych z alergią, np. IL-4, IL-5, IL-13, cytokin i czynników przeciwzapalnych, np. IL-10, sTNF RI, sTNF RII, lub cząstek adhezyjnych np. selektyny L, selektyny P, VCAM-1. Stwierdzono również brak wpływu badanych białek fagowych na uwalnianie ROS przez ludzkie PBMCs i PMNs.

Struktura T4 jest złożona i istnieją inne elementy, które potencjalnie mogłyby wpływać na wystąpienie i przebieg reakcji zapalnej. Z tego względu tym samym badaniom poddano również całą cząstkę faga T4, by ocenić ewentualne działanie całego kapsydu.

Wykazano, że fag T4 nie indukuje ani czynników regulujących stan zapalny u myszy, ani nie stymuluje produkcji ROS w komórkach krwi ludzkiej. Można zatem stwierdzić, że zarówno fag T4 jak i jego białka główki gp23*, gp24*, Hoc i Soc nie stymulują indukcji stanu zapalnego u ssaków.

Do badań włączono również fagi gronkowcowe A3R i 676Z, w celu porównania właściwości modelowego faga T4 z innymi fagami. Wyniki przesiewowych testów produkcji kilkudziesięciu czynników immunologicznych w modelu mysim z wykorzystaniem RayBio® Cytokine Array, wskazują, że fagi A3R i 676Z również nie wpływają na aktywację reakcji zapalnej. Są to fagi odległe taksonomicznie, nie wykazujące homologii (T4 w stosunku do A3R i 676Z), co sugeruje, że brak zdolności do wzbudzania reakcji zapalnej jest cechą charakterystyczną dla szerszej grupy wirusów bakteryjnych.

Przeprowadzono testy określające wpływ fagów *Escherichia coli* T4 i HAP1 oraz *Staphylococcus aureus* A3R i 676Z na aktywność układu dopełniacza. Zbadano wszystkie trzy drogi aktywacji dopełniacza: ścieżkę klasyczną, ścieżkę alternatywną i lektynową. Wykazano, że fagi T4, HAP1, A3R i 676Z nie działają na aktywność ścieżki alternatywnej. HAP1, naturalny mutant T4 pozbawiony białka Hoc, obniżał aktywność ścieżki klasycznej. Fagi gronkowcowe A3R i 676Z hamowały aktywność ścieżki lektynowej.

Kolejna część niniejszej pracy dotyczyła badań białka budującego haczyki płytki podstawowej bakteriofaga T4, które jest zdolne do wiązania LPS. W pierwszej kolejności sklonowano i zoptymalizowano produkcję gp12. Uzyskano oczyszczony preparat gp12, który zachował swoją natywną strukturę, a tym samym swoje właściwości biologiczne, tj. zdolność wiązania LPS, co potwierdzono badając średnicę hydrodynamiczną mieszaniny gp12 i LPS.

Oczyszczony preparat gp12 wykorzystano do badań *in vivo*. Wykazano, że w modelu mysim rekombinowane gp12 może zmniejszać zdolność LPS do indukowania stanu zapalnego. Preparat gp12 po równoczesnym podaniu z LPS myszom powodował obniżenie poziomu mediatorów stanu zapalnego a analiza histopatologiczna wybranych tkanek zwierzęcych wykazała, że gp12 może zmniejszać nacieki leukocytarne w śledzionie i wątrobie. Stwierdzono także, że gp12 nie jest toksyczne dla zwierząt oraz dla komórek eukariotycznych *in vitro*.

Brak aktywności immunostymulacyjnej zarówno przez białka kapsydowe jak i całe cząstki fagowe potwierdza bezpieczeństwo stosowania fagów w medycynie. Obserwacje te mają znaczenie dla każdego medycznego lub weterynaryjnego zastosowania bakteriofagów. Ostre, przewlekłe zakażenia prowadzące do sepsy nadal stanowią ogromne wyzwanie i problem dla klinicystów na całym świecie. Gp12 wydaje się posiadać właściwości, które mogłyby być przydatnym rozwiązaniem medycznym w przypadkach ostrych zakażeń lub sepsy o etiologii

związanej z działaniem LPS. Wyniki niniejszej pracy mają charakter badań pionierskich, które należy w przyszłości rozwinąć i poszerzyć, jednak wpisują się w trend najnowszych zainteresowań badawczych dotyczących immunobiologii fagów oraz bezpieczeństwa ich stosowania.