

Identyfikacja adhezyjnych białek strukturalnych bakteriofagów T4, A3/R, 676/Z oraz ich wpływ na komórki ssaków

Zuzanna Kaźmierczak

Streszczenie

Bakteriofagi naturalnie występujące w organizmach ludzi i zwierząt, są ważnym składnikiem mikrobiomu. Mogą być również stosowane jako potencjalne terapeutyki w infekcjach spowodowanych lekoopornymi szczepami bakterii. Szczegółowa budowa większości fagów oraz ich interakcje z organizmami ssaków nie są dobrze poznane. Zagadnienia te mają znaczenie dla zrozumienia roli fagów naturalnie występujących w naszych organizmach oraz dla bezpieczeństwa i skuteczności stosowania fagów w medycynie. Zdolność fagów do utrzymywania się w organizmach ssaków sugeruje, że wirusy te mogły w toku ewolucji wykształcić mechanizmy odpowiedzialne za interakcje z organizmami wyższymi. Tymczasem wiedza na temat charakteru tych oddziaływań, a szczególnie na temat tego, jakie elementy wirionów fagowych są w nie zaangażowane, jest bardzo ograniczona. Celem niniejszej pracy była identyfikacja takich białek strukturalnych bakteriofagów gronkowcowych: A3/R i 676/Z, które nadają im zdolność do oddziaływań z komórkami ludzkimi.

Wykorzystując modelowego faga o zbliżonej do tych fagów morfologii (T4 znakowany fluorescencyjnie) oceniono zdolność do kumulacji w organach pełniących główną rolę w funkcjach efektorowych układu odpornościowego, w szczególności w wyłapywaniu obcych dla organizmu elementów (w tym fagów) i indukcji specyficznych dla tych elementów przeciwciał. Dla wizualizacji wirusów bakteryjnych, sklonowano i poddano ekspresji w systemie bakteryjnym *E. coli* gen kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP) w fuzji z genem kodującym dekoratywne białko faga (białko hoc). Następnie wykorzystano metodę phage display *in vivo* do wprowadzenia fuzji GFP-hoc na kapsyd bakteriofaga, uzyskując faga zdolnego do fluorescencji. Obserwowano akumulację bakteriofaga w tkankach. Wiriony gromadziły się głównie w organach zaangażowanych w wytworzenie odpowiedzi układu odpornościowego, w tym za indukcję odpowiedzi swoistej: w śledzionie i węzłach chłonnych.

W niniejszej pracy zbadano również zdolność gronkowcowych fagów terapeutycznych A3/R i 676/Z, a następnie ich białek strukturalnych, do indukowania specyficznych przeciwciał. Stwierdzono, że w modelu mysim oba bakteriofagi efektywnie indukują wytwarzanie

specyficznych przeciwciał klasy IgM i IgG, a rozkład wzrostu poziomym tych przeciwciał jest typowy, obserwowany w wypadku wielu innych rodzajów antygenów białkowych.

W przypadku fagów A3/R i 676/Z nieznana była dotąd struktura kapsydów, dlatego przeprowadzono identyfikację głównych białek strukturalnych budujących wiriony. Metodami bioinformatycznymi wytypowano geny kodujące potencjalne białka strukturalne, sklonowano do wektorów ekspresyjnych, ekspresjonowano i poddano wieloetapowemu oczyszczaniu. Otrzymane białka wykorzystano do testów immunologicznych, immunolokalizacji białek w wirionach oraz do badań właściwości adhezyjnych fagów względem komórek eukariotycznych.

Efektom przeprowadzonych badań było określenie funkcji czterech genów występujących w genomie bakteriofaga A3/R: AFN38122.1 (A2), AFN38181.1 (A4), AFN38113.1 (A6), AFN38152.1 (A8) oraz czterech homologicznych genów w genomie faga 676/Z: AFN38316.1 (A2), AFN38375.1 (A4), AFN38307.1 (A6), AFN38346.1 (A8). Za pomocą techniki immunoelektronomikroskopii stwierdzono, że białka kodowane przez powyższe geny pełnią funkcje strukturalne, budując kapsyd fagów. Białko A2 jest białkiem strukturalnym budującym główkę faga A3/R i 676/Z. Białka A4 i A6 występuje na tubie w fagu A3/R i 676/Z. Białko A8 występuje w okolicy płytki podstawowej fagów A3/R i 676/Z. Co więcej, tylko w wypadku białka A8 obserwowano całkowite zahamowanie aktywności przeciwbakteryjnej faga przez surowicę specyficzną do tego białka. Nie zaobserwowano neutralizacji fagów w przypadku przeciwciał specyficznych do pozostałych białek (A2, A3, A4, A6). Sugeruje to, że białko A8 może pełnić funkcję liganda dla bakteryjnych receptorów wykorzystywanych przez te fagi.

Zbadano również częstość występowania przeciwciał neutralizujących fagi A3/R i 676/Z w populacji ludzkiej. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania specyficznych przeciwciał do fagów A3/R i 676/Z; była ona na poziomie 30% dla faga A3/R i 35% dla faga 676/Z. Poddano też analizie występowanie naturalnych przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym białkom strukturalnym (A2, A6, A8) fagów gronkowcowych u osób zdrowych. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy występowaniem przeciwciał specyficznych względem badanych białek w populacji u ludzi.

Poza oczekiwanymi oddziaływaniami fagów z układem odpornościowym ludzi lub zwierząt, są możliwe innego typu oddziaływania fagów z organizmem ssaka, a oddziaływania takie są mediowane również przez białka strukturalne obecne w wirionach. Ewentualne istnienie takich białek ma znaczenie np. dla kumulacji fagów w miejscach infekcji spowodowanych przez bakterie *Staphylococcus aureus*. Prawdopodobna zdolność fagów do adhezji w tych tkankach,

gdzie typowo takie infekcje występują, nadawałaby fagowi szansę na zwiększony kontakt z bakteriami swojego gospodarza, i decydowała m.in. o skuteczności leczenia za pomocą adherujących fagów. W niniejszej pracy zbadano właściwości adhezyjne białek A2, A4, A6, A8 względem komórek ssaków *in vitro*. Zaobserwowano oddziaływania adhezyjne białka A6 względem komórek ludzkiej linii prawidłowej śródbłonna naczyń krwionośnych płuc (HLMEC) oraz ludzkich komórek skóry (wykorzystano linię nowotworową Hs294T). Nie obserwowano oddziaływań adhezyjnych pozostałych białek. Otrzymane wyniki sugerują, że badane fagi oddziałują adhezyjnie z niektórymi komórkami ssaków poprzez białko A6, które jest ulokowane na tubie.

Bakteriofagi, powszechnie obecne w organizmach ssaków oraz podawane w celach terapeutycznych, mogą wchodzić w interakcje z komórkami organizmów wyższych. Oddziaływania, zarówno adhezyjne, jak i te pomiędzy fagami a układem immunologicznym, były obserwowane wcześniej w wypadku bakteriofagów modelowych. W niniejszej pracy zostały zbadane i opisane dla fagów terapeutycznych. Wiedza ta może się przysłużyć dla dalszego rozwoju naszego zrozumienia praktycznego znaczenia tych wirusów, zarówno jako składników naturalnych ekosystemów, w tym mikrobiomu człowieka, jak i jako potencjalnych narzędzi wykorzystywanych w biotechnologii i medycynie.