

Immunologiczna i biochemiczna charakterystyka receptorów fagowych w dwóch klinicznych szczepach *Pseudomonas aeruginosa*

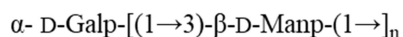
Streszczenie

Pseudomonas aeruginosa jest oportunistycznym patogenem, który może atakować ludzkie ciało i powodować ostre i przewlekłe infekcje, takie jak zapalenie płuc, mukowiscydoza, infekcje dróg moczowych, infekcje kości i stawów, bakteriemia, infekcje rogówki, rumień spojówek, infekcje skóry czy tkanek miękkich. *P. aeruginosa* wykształcił kilka mechanizmów patogenności i antybiotykoodporności, które prowadzą do wzrostu zachorowalności, przypadków zakażeń szpitalnych i śmiertelności. Obserwowany w ostatnich latach wzrost częstości występowania szczepów bakteryjnych opornych na wiele leków wymaga dalszego poszukiwania nowych strategii przeciwbakteryjnych. Jedną z nich jest terapia fagowa.

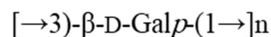
W niniejszej pracy określono skuteczności bakteriofagów i ich białek przeciwno, opornym na wiele leków, szczepom *P. aeruginosa* PAR21 i PAR50 izolowanym od chorych z wrzodziejącą stopą cukrzycową. Określono charakter oddziaływania fagów i bakterii przy użyciu analiz immunochemicznych, a także zbadano wpływ białek fagowych na bakterie oraz ich możliwość zastosowania w terapii przeciwno szczepom *P. aeruginosa* jako element wspomagający działanie antybiotyków. Szczepy bakteryjne pochodziły z Kolekcji Mikroorganizmów Uniwersytetu Jagiellońskiego, natomiast fagi zostały wyizolowane ze środowiska. Wykazano, że dwa fagi wykazywały aktywność przeciwno szczepowi PAR50, natomiast nie obserwowano żadnego wpływu na szczep PAR21. W pierwszej kolejności określono charakter oddziaływania fagów z bakteriami poszukując potencjalnych receptorów dla fagów: polisacharydów oraz białek błony zewnętrznej. Polisacharydy były izolowane poprzez ekstrakcję fenolem, kwasem trójchlorooctowym lub PBS, następnie oczyszczane z wykorzystaniem technik chromatograficznych na złożu DEAE-Sephadex A-25, a następnie na Toyopearl HW-55S. Ze szczepu PAR21 uzyskano 5 frakcji natomiast ze szczepu PAR50 tylko dwie zawierające materiał cukrowy. Oczyszczone polisacharydy analizowano z użyciem klasycznych metod chemicznych i nowoczesnych metod analizy instrumentalnej:

spektrometrii mas oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Analiza strukturalna wykazała istnienie trzech głównych struktur chemicznych:

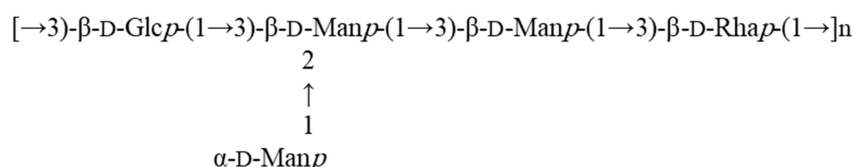
- struktura I, występująca we frakcjach PAR21-PS5, PAR50-PS1 i PAR50-PS2 i składająca się z dwóch monosacharydów: galaktozy i mannozy;



- struktura II, występująca we frakcji PAR21-PS4 będąca homopolisacharydem składającym się z β -1,3-podstawionej-galaktopiranozy;



- struktura III, występująca we frakcjach PAR21-PS2 oraz PAR21-PS3, której jednostka powtarzająca składa się z pięciu monosacharydów:



Wykorzystując metodę Nelsona-Somogyiego oraz wykonując zymograf na żelu akrylamidowym wzbogaconym w bakteryjny polisacharyd wykazano, że polisacharydy nie są receptorami dla białek fagowych. Białka błony zewnętrznej izolowano przy użyciu SDS. Wykonując zymograf na żelu akrylamidowym wzbogaconym w uzyskane białka błony zewnętrznej wykazano, że jedno z białek błony zewnętrznej (zidentyfikowane jako białko porynowe) jest receptorem dla badanych fagów, a dokładniej dla ich białek, które oznaczono jako PA-PP1 oraz PA-PP2. Białka te wyizolowano, oczyszczono z wykorzystaniem technik chromatograficznych, określono aktywność proteolityczną z użyciem kazeiny znakowanej rezuorfiną oraz przeprowadzono szereg analiz pozwalających na ocenę ich aktywności: test punktowy, zymografię, test spektrofotometryczny oraz analizę z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej przy niskim napięciu. Białka zidentyfikowano za pomocą analizy porównawczej mas peptydów (NCBI, bazy danych UniProt). Oba białka należą do rodziny proteaz serynowych. W celu oceny możliwości zastosowania białek w terapii przeciwko szczepom *Pseudomonas* jako element wspierający działanie antybiotyków przeprowadzono antybiogram. Połączenie białek fagowych i

antybiotyków przeciwko *P. aeruginosa* PAR50 wykazało wyraźną zmianę skuteczności antybiotykowej. Znacząco wzrosła wrażliwość szczepu na piperacylinę.

W niniejszej pracy scharakteryzowano dwa białka fagowe PA-PP1 i PA-PP2, które mają skuteczność terapeutyczną przeciwko szczepowi *P. aeruginosa* PAR50 odpornym na wiele antybiotyków. Receptor fagowy na powierzchni tego szczepu bakteryjnego został zidentyfikowany jako jedno z białek porynowych, które biorą udział w wielu mechanizmach oporności wielolekowych np. systemach MexAB i MexXY. Białka fagowe poprzez oddziaływanie z białkiem porynowym mogą wpływać na zwiększenie wrażliwość na antybiotyki.