

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Lekarski

**BADANIA NAD ADHEZJĄ CZĄSTEK FAGOWYCH
DO RECEPTORÓW NA KOMÓRKACH BAKTERYJNYCH**

JUSTYNA BAZAN

Promotor:

prof. dr hab. Andrzej Gamian

dr hab. Ireneusz Całkosiński, prof. nadzw.

Wrocław, 2014

Streszczenie

Bakteriofagi to bardzo liczna grupa wirusów bakteryjnych, które posiadają zdolność do swoistego infekowania szczepów bakteryjnych. W zależności od typu wirusa i jego zjadliwości fagi mogą namnażać się w kilku cyklach rozwojowych bytując w komórce bakteryjnej lub doprowadzając do śmierci gospodarza. Niekorzystne parametry fizyko-chemiczne środowiska i zmiana metabolizmu zainfekowanej bakterii mogą sprzyjać aktywacji cyklu litycznego. Obecnie bakteriofagi są szeroko badane pod kątem możliwości wykorzystania ich właściwości w medycynie i przemyśle do zwalczania infekcji bakteryjnych i monitorowania procesów technologicznych. Systemy bazujące na bakteriofagach i ich właściwościach stały się podstawą w konstrukcji narzędzi diagnostycznych, poszukiwaniu nowych leków i szczepionek oraz transportu substancji aktywnych. Endotoksyny bakteryjne są strukturami pełniącymi istotną rolę w adsorpcji bakteriofagów do komórek bakterii Gram-ujemnych. Ze względu na duże zróżnicowanie budowy O-antygenowych łańcuchów polisacharydowych wiele bakteriofagów jest zdolnych do infekcji tylko wybranego szczepu bakteryjnego. Białka fagowe odpowiedzialne za adsorpcję określane są jako adhezyny i są zlokalizowane w najbardziej peryferyjnych częściach wirusa. Ponieważ niektóre fagi rozpoznają specyficznym określony szczep bakterii założono, iż możliwe jest opracowanie odpowiednich zestawów adhezyn bakteriofagowych, pozwalających na wykrycie obecności określonego szczepu bakteryjnego w badanym materiale.

Celem prowadzonych badań była analiza oddziaływań wirionu bakteriofagowego z receptorem obecnym na komórce bakteryjnej, co może stanowić podstawę opracowania metody diagnostycznej wykrywania obecności bakterii w analizowanych materiałach.

Do badań wykorzystane zostały patogenne szczepy *E. coli* pochodzące od zwierząt hodowlanych z terenu Dolnego Śląska oraz patogen ludzki *E. coli* PCM 2674. Do badań modelowych zostały wykorzystane bakteriofagi O19 specyficzne względem *E. coli* PCM 2674. Efektem prac było scharakteryzowanie oddziaływań faga O19 i jego receptora – lipopolisacharydu bakterii *E. coli* PCM 2674. Pierwszy etap przeprowadzonych prac stanowiła część mikrobiologiczna, konieczna do pozyskania

odpowiedniej ilości masy bakteryjnej i cząstek fagowych niezbędnych do badań. Scharakteryzowano także badane patogenne szczepy *E. coli* oraz określono specyficzność różnych fagów względem nich. Wykazano, że wszystkie badane izolaty charakteryzują się wytwarzaniem α -hemolizyny i w przeważającej większości wykazują zdolność do enteroagregacji, wszystkie też posiadają LPS z O-antygenem gładkim. Jednakże zaobserwowano znaczne różnice zarówno w intensywności hemolizy, zdolności do enteroagregacji, jak i w składzie cukrowym O-antygeny oraz wrażliwości na antybiotyki i bakteriofagi. Dodatkowo modelowy układ fag-gospodarz poddano szczegółowej charakterystyce fenotypu. Określono serotyp badanego szczepu *E. coli* PCM 2674 jako O19:H-K-. W badaniach genotypu określono, że analizowany szczep nie posiada genów *eae*, *vtx1*, *vtx2*, *vtx2f*, *bfpA*, *EAF*, *ehxA*, *saa*, *astA* związanych z głównymi czynnikami wirulencji bakterii *E. coli*. Określono także, iż fag wykorzystany w badaniach należy do rzędu *Caudovirales* i rodziny *Myoviridae* morfotypu A1 wg. Ackermanna i Eisenstarka oraz do pierwszej grupy wg. Baltimore'a, a dodatkowo jest specyficzny względem *E. coli* PCM 2674 i nie powoduje lizy pozostałych analizowanych izolatów bakteryjnych. W badaniach określono także charakterystykę oddziaływania fag-gospodarz wskazując, że fag O19 preferuje środowisko alkaliczne i ma optimum temperaturowe zbliżone do optimum gospodarza. Wykazano także, że obecność jonów dwuwartościowych w roztworze wpływa na wielkość tworzonych łysek. Celem drugiego etapu było uzyskanie preparatu bakteryjnego i bakteriofagowego. Prace koncentrowały się wokół oczyszczania preparatu fagowego i preparacji białek wirusów bakteryjnych, doboru najlepszych warunków do namnażania faga i dopracowania metod oczyszczania wirionów oraz izolacji i oczyszczania receptorów bakteryjnych. Usprawniono procedury laboratoryjne i zgłoszono poprawki do metod oczyszczania fagów sugerując zastosowanie w nich Tweenu 20 zamiast deoksyholanu sodu, ze względu na dopuszczenie Tweenu 20 do zastosowania wewnętrznego u ludzi. Kolejnym przeprowadzonym etapem prac było przeprowadzenie serii testów, dzięki którym możliwe stało się opracowanie podstaw uniwersalnej metody badań oddziaływań bakteriofagów z receptorami. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że bakteriofag O19 rozpoznaje i wiąże się z LPS bakterii *E. coli* PCM 2674 natomiast białka błonowe nie są receptorem dla badanego faga. Ustalono także, że biotynylacja LPS powoduje silniejsze wiązanie się faga do O-antygeny. Wprowadzono także modyfikacje wirionów i receptorów,

które poszerzają możliwości zastosowania metod pomiarowych. Znakowanie fluorescencyjne wirionów fagowych umożliwiło zastosowanie ich do detekcji LPS w testach dot-blotingu. Natomiast biotynylowany LPS posłużył do wykrycia metodą blotingu adhezyn fagowych. Określono, że za rozpoznawanie receptora odpowiedzialny jest kompleks dwóch białek o masach około 15 kDa. Białka te wykazywały znaczne podobieństwo do białek ogonka i płytki podstawowej innych fagów. W badaniach dodatkowo określono kinetykę wiązania receptora bakteryjnego i bakteriofaga i ustalono, że stała dysocjacji kompleksu fag-receptor wynosi $2,92 \times 10^{-5} \pm 0,569 \times 10^{-5}$ co wskazuje, że wiązanie to nie jest zbyt silne.

Uzyskane wyniki badań oprócz charakteru poznawczego posiadają znaczący potencjał aplikacyjny. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano koncepcję oraz schemat układu pomiarowego w konstrukcji biosensora do identyfikacji bakterii. Identyfikacja bakterii jest istotna w badaniach środowiskowych przy wykrywaniu obecności patogenów np. w wodzie wodociągowej, kąpieliskach, w glebie, a także w kontroli mikrobiologicznej np. w przedsiębiorstwach biotechnologicznych i spożywczych czy produkcji rolnej, zarówno do wykrywania skażenia mikrobiologicznego produktów i obiektów, ochrony roślin i zwierząt przed infekcjami jak i do kontroli składu złóż biologicznych przeprowadzających procesy produkcyjne np. w oczyszczalniach ścieków.

Uzyskane wyniki doświadczeń biologicznych wymagają prowadzenia dalszych badań i rozwoju prac nad metodą pomiarową i konstrukcją biosensora.