

Molekularne i immunologiczne uwarunkowania obecności bakteriofagów T4, A3R i 676Z w jelicie myszy

Streszczenie

Bakteriofagi są ważnym składnikiem mikrobiomu ludzi i zwierząt, szczególnie w przewodzie pokarmowym, gdzie stanowią dominującą frakcję wirionów i są zaangażowane w regulację bakteryjnej mikrobioty jelitowej. Obecnie wiele badań nad oddziaływaniami fagów z komórkami i układami ludzi i zwierząt wyraźnie wskazuje, że wpływ fagów na organizmy wyższe zdecydowanie wykracza poza jedynie udział w utrzymaniu równowagi populacji bakterii. Bakteriofagi są również wykorzystywane w terapii pacjentów cierpiących na zakażenia bakteryjne i stanowią jedną z najważniejszych alternatyw dla standardowej antybiotykoterapii, szczególnie w obliczu stale rosnącego problemu antybiotykooporności. Doustne podanie terapeutycznych preparatów fagowych jest proste, stosunkowo bezpieczne i dobrze tolerowane przez pacjentów, a do jego głównych ograniczeń należy wrażliwość fagów na silnie kwaśne środowisko żołądka. Jest to dominująca droga podania głównie w przypadku zakażeń bakteryjnych obejmujących przewód pokarmowy, ale skuteczność doustnej terapii fagowej wykazano również w infekcjach ogólnoustrojowych, jak np. sepsa. Dodatkowo, doustne podawanie preparatów fagowych może być stosowane wspomagająco przy innych metodach aplikacji. Niezależnie od drogi podania, bakteriofagi – jako cząstki obce dla organizmu człowieka – mogą indukować produkcję swoistych przeciwciał, których obecność może z kolei prowadzić do inaktywacji fagów, przyczyniając się do obniżenia skuteczności leczenia, jednak w oparciu o dotychczasowe doniesienia nie stwierdzono jednoznacznego związku między poziomem przeciwciał swoistych a powodzeniem terapii fagowej. Ważną perspektywą w rozwoju fagoterapii jest obecnie wykorzystanie nowoczesnych technik pozwalających na precyzyjną, celowaną modyfikację fagów w kierunku uzyskania bardziej pożądanых właściwości – np. usunięcia genów odpowiedzialnych za lizogenię czy modyfikacji białek fagowych rozpoznających receptory na powierzchni komórek gospodarza w celu poszerzenia lub zmiany spektrum litycznego. W szerszym kontekście podobne celowane modyfikacje mogą w przyszłości być potencjalnie wykorzystywane także do „sterowania” immunogennością wirionów lub wrażliwością cząstek fagowych na wybrane czynniki zewnętrzne, np. w przewodzie pokarmowym – szczególnie biorąc pod uwagę, że medyczne zastosowania fagów nie ograniczają się jedynie do zwalczania infekcji bakteryjnych, a całe fagi lub modyfikowane kapsydy fagowe są proponowane jako nowoczesne nośniki leków i szczepionek. Dotyczy to szczególnie fagów o dobrze scharakteryzowanej strukturze i właściwościach, jak np. bakteriofag T4. Mimo tak ważnych i różnorodnych ról bakteriofagów, tych naturalnie bytujących w naszym organizmie jak i stosowanych terapeutycznie, czynniki warunkujące obecność i aktywność fagów w przewodzie pokarmowym są nadal niedostatecznie zbadane. Dotyczy to zarówno czynników po stronie organizmów wyższych, jak i molekularnych właściwości samych wirionów fagowych.

Celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja wybranych immunologicznych i molekularnych czynników wpływających na obecność i aktywność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt – zarówno w kontekście indukcji przez fagi swoistych przeciwciał i ich potencjalnej roli w ograniczaniu biodostępności fagów, jak

również w kontekście tego, jak białka strukturalne fagów mogą przyczyniać się do immunogenności wirionów, a także kształtować odporność fagów na czynniki charakterystyczne dla specyficznego mikrośrodowiska przewodu pokarmowego, takie jak temperatura, kwaśne i zasadowe pH czy obecność proteolitycznych enzymów trawiennych.

W badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały wykorzystane trzy bakteriofagi ogonkowe – T4, A3R i 676Z – reprezentujące ten sam typ morfologii (myovirus) i klasyfikowane wcześniej jako przedstawiciele rodziny *Myoviridae* w obrębie rzędu *Caudovirales*. W związku z reorganizacją taksonomii wirusów bakteryjnych w celu odzwierciedlenia faktycznych powiązań filogenetycznych, a nie jedynie podobieństwa morfologicznego, obecnie bakteriofagi te są klasyfikowane w obrębie klasy *Caudoviricetes* i rodzin *Straboviridae* (T4) i *Herelleviridae* (A3R i 676Z). Bakteriofag T4 jest modelowym bakteriofagiem infekującym bakterie *Escherichia coli*, naturalnie występującym w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Należy on do najbardziej złożonych wirusów, a jego białka strukturalne, ich organizacja i wzajemne oddziaływania są dobrze scharakteryzowane. W kontekście niniejszej rozprawy doktorskiej szczególnie ważne są cztery białka główki faga T4: główne białko kapsydowe (gp23), białko wierzchołkowe główki (gp24) oraz dwa białka dekoratywne Hoc i Soc, a także białko gp12 budujące haczyki płytki podstawowej i zaangażowane w wiązanie receptorów na powierzchni komórek gospodarza. Bakteriofagi A3R i 676Z charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa, wykazują specyficzność wobec *Staphylococcus aureus* i są od lat stosowane w Ośrodku Terapii Fagowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN jako bakteriofagi terapeutyczne. Ich struktura białkowa jest słabiej scharakteryzowana, jednak niedawne badania z wykorzystaniem techniki immuno-TEM pozwoliły na eksperymentalne potwierdzenie przewidywanych funkcji i lokalizacji wybranych białek strukturalnych.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji oryginalnych. Pierwsza publikacja (*Viruses*, 2015, 7(8):4783-99) obejmuje badania indukcji przeciwciał swoistych przez modelowego bakteriofaga T4 podawanego w wodzie pitnej w modelu mysim; było to pierwsze badanie kinetyki odpowiedzi humoralnej podczas długotrwałego doustnego podawania preparatów fagowych. Zaobserwowałam indukcję odpowiedzi humoralnej we krwi (swoiste przeciwciała IgG), a także – znacznie później – w przewodzie pokarmowym (swoiste przeciwciała IgA). Efekt ten był zależny od dawki, a poziom przeciwciał swoistych u myszy immunizowanych relatywnie wysoką dawką faga T4 *per os* był wyraźnie niższy niż w przypadku immunizacji podskórnej, co wskazuje na stosunkowo niską efektywność indukcji odpowiedzi humoralnej przez fagi w modelu podania doustnego. Co ważne, jednoczesna ocena zmian poziomu przeciwciał swoistych oraz ocena próbek kału myszy pod kątem obecności aktywnych fagów T4 i występowania izolatów *E. coli* opornych na faga pozwoliły zidentyfikować sekrecję swoistych przeciwciał IgA jako główny czynnik ograniczający aktywność faga T4 w przewodzie pokarmowym, istotniejszy niż dominacja izolatów bakterii opornych na faga. Porównując poziomy przeciwciał swoistych wobec pięciu wybranych białek strukturalnych faga T4 – gp23, gp24, Hoc, Soc i gp12 – zaobserwowałam istotny wzrost jedynie w przypadku białek Hoc i gp12, tym samym wskazując na udział tych dwóch białek w indukcji odpowiedzi humoralnej na faga w badanym modelu. Następnie na przykładzie antygeny peptydowego pochodzącego z wirusa Ebola zademonstrowałam, że w modelu podania doustnego możliwa jest także indukcja w przewodzie pokarmowym sekrecyjnych przeciwciał

IgA swoistych wobec obcego antygeny prezentowanego na powierzchni kapsydu faga T4 w fuzji ze wskazanym jako immunogenne białkiem Hoc. Obserwacja ta może mieć znaczenie w kontekście potencjalnego zastosowania cząstek fagowych jako nośników leków i szczepionek.

W drugiej publikacji (Frontiers in Immunology, 2019, 10:2607) podjęłam próbę odpowiedzi na pytanie, czy obserwacje oparte o wyniki uzyskane dla modelowego bakteriofaga T4 mają charakter uniwersalny i czy można je odnieść do innych bakteriofagów, szczególnie reprezentujących podobny typ morfologii, ale infekujących odległy filogenetycznie gatunek bakterii, znacznie mniej licznie niż *E. coli* reprezentowany w normalnej mikrobiocie przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. W tym celu przeprowadziłam analogiczną jak w przypadku faga T4 immunizację myszy preparatami bakteriofagów gronkowcowych A3R i 676Z. Ponieważ obydwie te bakteriofagi są wykorzystywane jako fagi terapeutyczne w leczeniu zakażeń *S. aureus* u pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej, uzyskane w ramach tych badań wyniki mają również potencjalne znaczenie kliniczne. Podobnie jak dla bakteriofaga T4, także w przypadku fagów A3R i 676Z stwierdziłam indukcję odpowiedzi humoralnej we krwi i w przewodzie pokarmowym i podobną kinetykę zmian poziomów przeciwciał swoistych – tym razem jednak w osoczu zaobserwowałam także nieznaczny, choć statystycznie istotny wzrost poziomu swoistych przeciwciał IgM. Ponownie zaobserwowałam też korelację pomiędzy zmianami poziomu swoistych przeciwciał klasy IgA a wykrywaniem fagów w kale myszy, co potwierdziło rolę sekrecyjnych przeciwciał IgA jako głównego czynnika ograniczającego aktywność fagów w przewodzie pokarmowym. Porównanie poziomu przeciwciał swoistych wobec wirionów fagów A3R i 676Z uzyskanych w badanym modelu podania *per os* i w wyniku immunizacji dootrzewnowej również wykazało niższy poziom odpowiedzi humoralnej w przypadku podania doustnego, co dodatkowo potwierdziła słabsza inaktywacja fagów A3R i 676Z po inkubacji z osoczem myszy immunizowanych *per os*.

Co ciekawe, porównanie immunogenności trzech wybranych białek strukturalnych – głównego białka kapsydowego (Mcp) budującego główkę bakteriofagów A3R i 676Z, białka TmpH wchodzącego w skład struktury ogonka oraz białka gpORF096 zlokalizowanego w obrębie płytki podstawowej i najprawdopodobniej zaangażowanego w rozpoznawanie receptorów na powierzchni komórek bakteryjnych – wykazało znaczne różnice względem wyników uzyskanych dla badanych białek strukturalnych faga T4. W przypadku bakteriofagów gronkowcowych, zaobserwowałam wyraźny wzrost poziomu przeciwciał swoistych wobec białka Mcp, świadczący o jego immunogenności w badanym modelu, natomiast białko gpORF096 okazało się nieimmunogenne. Wyraźny wzrost poziomu przeciwciał swoistych zaobserwowałam również w przypadku białka tuby ogonka TmpH. Obserwacje te sugerują, że o ile ogólna kinetyka indukcji przeciwciał swoistych ma uniwersalny charakter, to rola poszczególnych białek strukturalnych we wzbudzaniu odpowiedzi humoralnej może znacząco różnić się u poszczególnych fagów.

Poza kinetyką indukcji przeciwciał, w pracy zbadalam również translokację bakteriofagów A3R i 676Z z przewodu pokarmowego do krwioobiegu w modelu mysim. Uzyskane wyniki wskazywały na słabe i nieregularne przenikanie aktywnych cząstek fagowych do krwi i brak wyraźnej zależności pomiędzy liczbą wykrywanych fagów a zastosowaną dawką czy wcześniejszym wprowadzeniem substancji neutralizujących kwaśne środowisko żołądka.

Miana aktywnych fagów w próbkach krwi były też znacznie niższe niż oczekiwane wartości oszacowane w oparciu o zaproponowany w pracy model matematyczny.

W obu powyższych publikacjach skupiłam się głównie na zależnościach pomiędzy fagami a elementami odpowiedzi humoralnej przeciwko fagom, jednak wpływ organizmów wyższych na przeżywalność fagów nie ogranicza się wyłącznie do czynników immunologicznych. Dlatego też w trzeciej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej (*Microbiology Spectrum*, 2023, przyjęta) podjęłam temat bezpośredniego wpływu czynników charakterystycznych dla środowiska przewodu pokarmowego na aktywność fagów na przykładzie modelowego bakteriofaga T4. Stanowiło to odniesienie do perspektywy ewolucyjnej, w której skład białkowy główki faga mógł – przynajmniej do pewnego stopnia – ukształtować się w odpowiedzi na presję specyficznych warunków w przewodzie pokarmowym zwierząt i człowieka: temperaturę, kwaśne i zasadowe pH oraz obecność proteolitycznych enzymów trawiennych i żółci. W celu określenia roli białek główki bakteriofaga T4 – gp24, Hoc i Soc – w odporności wirionów na te czynniki, skonstruowałam panel mutantów faga T4 nieposiadających jednego, dwóch lub wszystkich trzech spośród tych białek. Do uzyskania panelu mutantów została wykorzystana homologiczna rekombinacja i metody selekcji oparte o techniki mikrobiologiczne lub reakcję PCR, a skład białkowy główki fagów zweryfikowałam w teście ELISA. Mutanty nieposiadające w strukturze główki wyspecjalizowanego białka wierzchołkowego gp24 okazały się bardziej wrażliwe na kwaśne pH i aktywność proteolitycznych enzymów trawiennych – pepsyny i α -chymotrypsyny. Dodatkowo, mutanty pozbawione jednocześnie gp24 i Soc były bardziej wrażliwe na temperaturę 37°C. Uzyskane wyniki wskazują na kluczową rolę gp24 w odporności faga T4 na warunki środowiska – w tym środowiska przewodu pokarmowego – jednocześnie wspierając postulowaną wcześniej rolę białka Soc jako molekularnego kleju, stabilizującego kapsyd. Co więcej, porównanie denaturacji termicznej białek gp24, gp23 i dwóch wariantów białka gp23 posiadających mutacje typu bypass-24 (mutacje te pozwalają gp23 na tworzenie – poza heksamerami – również pentamerów, zastępujących pentamery gp24 na wierzchołkach kapsydu, tym samym kompensując letalny dla faga brak gp24) wykazało wyjątkową stabilność gp24 i brak wyraźnych różnic pomiędzy białkiem gp23 i jego dwoma wariantami.

Podsumowując, cel pracy doktorskiej został osiągnięty. W toku badań określiłam kinetykę zmian poziomów przeciwciał swoistych w odpowiedzi na doustne podawanie bakteriofagów w modelu mysim i wskazałam swoiste przeciwciała sekrecyjne klasy IgA jako główny czynnik ograniczający aktywność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym, istotniejszy niż pojawienie się w populacji bakterii o fenotypie oporności na faga. Wykazałam też, że białka strukturalne bakteriofagów w różnym stopniu przyczyniają się do indukcji przez wiriony odpowiedzi humoralnej, a immunogenność białek budujących struktury o tej samej lub podobnej funkcji (np. główne białko kapsydowe czy białka płytki podstawowej zaangażowane w oddziaływanie z komórkami gospodarza) może być różna u różnych fagów mimo reprezentowania przez nie tego samego typu morfologii. Dodatkowo, na przykładzie faga T4 wykazałam, że złożony skład białkowy kapsydu – w szczególności obecność wyspecjalizowanego białka wierzchołkowego – odpowiada za odporność fagów na czynniki charakteryzujące m.in. środowisko przewodu pokarmowego, co może sugerować potencjalną rolę przewodu pokarmowego w ukierunkowaniu ewolucji struktury wirionów fagowych.