

Projekt pt. „ROLA PROFAGÓW W ZJADLIWOŚCI KLINICZNYCH SZCZEPÓW PATOGENU LUDZKIEGO *CLOSTRIDIoidES DIFFICILE IN VITRO I IN VIVO*”

Prof. dr hab. Hanna M. Pituch – Kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej, WL WUM (kierownik projektu)

Skład zespołu projektowego i miejsce realizacji projektu

Projekt pt. „Rola profagów w zjadliwości klinicznych szczepów patogenu ludzkiego *Clostridioides difficile in vitro i in vivo*” jest realizowany w ramach konsorcjum badawczego utworzonego przez trzy ośrodki tj. Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed), Warszawski Uniwersytet Medyczny (WUM) i Śląski Uniwersytet Medyczny (SUM). Liderem projektu jest GUMed reprezentowany przez dr hab. Krzysztofa Hinca – kierownika projektu. Część projektu jest realizowana w Kate-

drze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej (KiZML) pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny M. Pituch. W skład zespołu projektowego w ramach KiZML wchodzi dr Dorota Wultańska oraz studentka SGGW, stypendystka, inżynier Urszula Maciąg. W badaniach ze strony WUM uczestniczą również badacze UCK, Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr A. Jurasza w Bydgoszczy i Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego (USK) im. WAM w Łodzi. Projekt jest finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN), konkurs OPUS22, nr DEC-2021/43/B/NZ6/00461.

Wstęp

Wyniki badań epidemiologicznych na całym świecie wskazują na ciągły wzrost zakażeń spowodowanych przez ludzki patogen – beztlenową laseczkę *Clostridioides difficile* (CDI). Duży wpływ na wzrost tych zakażeń miało pojawienie się i szybkie rozprzestrzenianie szczepów hiperwirulentnych (NAP1/BI/RT027). Liczne mutacje w obrębie genomu tych szczepów spowodowały wzrost wirulencji, co z pewnością związane jest z szybkim rozprzestrzenianiem się bakterii w środowisku szpitalnym, cięższym przebiegiem zakażenia

NOWE PROJEKTY NAUKOWE

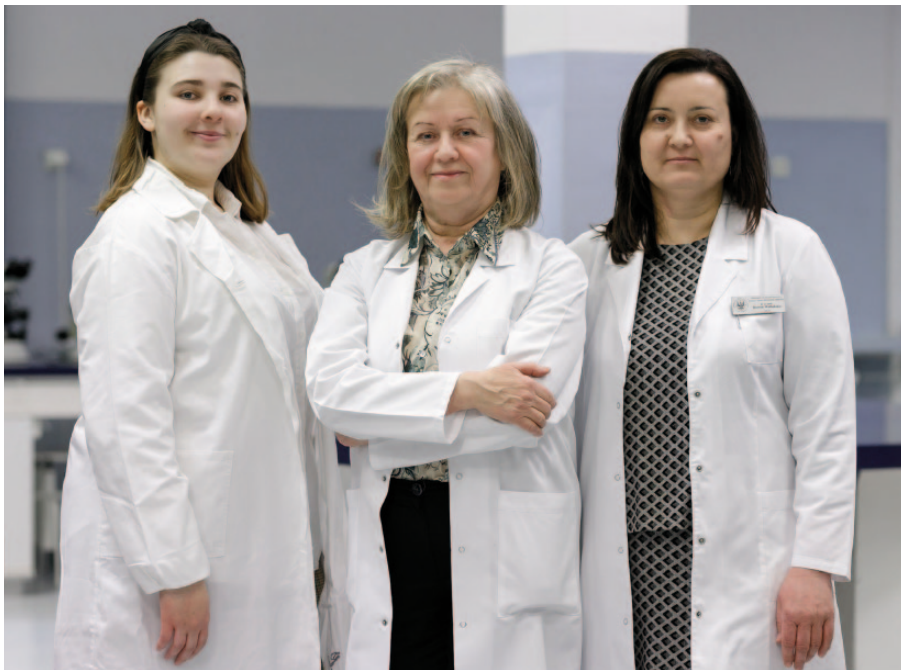
oraz zwiększonym ryzykiem nawrotów zakażenia. Zakażenie *C. difficile* może szerzyć się również w środowisku pozaszpitalnym. Z powodu braku podejrzenia zakażenia *C. difficile* w krajach Unii Europejskiej nie wykrywa się ok. 16% przypadków CDI pochodzenia szpitalnego i 55% przypadków pozaszpitalnych. Brak odpowiedzi na leczenie za pomocą standardowych terapii powoduje, że odsetek pacjentów z nawrotami choroby może dochodzić do 25%, z czego 65% pacjentów może mieć kolejny nawrót.

Wpływ na wirulencję bakterii mogą mieć bakteriofagi (wirusy infekujące bakterie). Bakteriofagi obecne są praktycznie we wszystkich ekosystemach. Dlatego uważa się, że bakteriofagi są ważnym czynnikiem napędzającym ewolucję bakterii. W ciągu ostatniej dekady opisano tylko kilka bakteriofagów infekujących *C. difficile*. Genomy dotychczas opisanych fagów *C. difficile* zawierają wiele genów regulatorowych, co sugeruje, że ich wpływ na gospodarza może być odrębny i skomplikowany.

Cele projektu, jego nowatorstwo i przełożenie na praktykę

Celem prowadzonych przez nas badań jest opisanie interakcji fag-gospodarz *in vitro*, aby zrozumieć, w jaki sposób profagi, czyli genomy wirusów zintegrowanych z materiałem genetycznym zainfekowanego gospodarza, mogą wpływać na zjadliwość bakterii, a jednocześnie wpływać na przebieg infekcji *in vivo* w mysim modelu infekcji *C. difficile*. Chcemy zbadać wpływ obecności profagów na fenotyp żywiciela bakteryjnego na poziomie fizjologicznym, jak również transkryptomycznym. Wyniki naszych badań powinny przyczynić się do lepszego zrozumienia interakcji fagów z gospodarzami bakteryjnymi, co powinno znaleźć odzwierciedlenie w przyszłych zastosowaniach terapii fagowej.

Zebranie danych demograficznych i klinicznych pacjentów oraz porównanie przebiegu zakażenia szczepem *C. difficile* posiadającym profaga i bez profaga pozwoli ustalić znaczenie zjawiska dla przebiegu zakażenia u ludzi. Jak zakładamy będzie to innowacyjna wiedza dot. wpływu i znaczenia profagów dla zjadliwości szczepów *C. difficile* i przebiegu zakażenia. Profagi mogą modyfikować styl życia, kondycję, zjadliwość i ewolucję ich gospodarza bak-



Zespół badawczy od lewej: studentka SGGW Urszula Maciąg, prof. dr hab. Hanna M. Pituch, dr Dorota Wultańska

teryjnego na wiele sposobów. Na podstawie tych badań porównamy *in vitro* wpływ profagów na zjadliwość bakterii *C. difficile*. Będziemy poszukiwać bakteriofagów w szczepach klinicznych *C. difficile*, charakteryzować je oraz edytować genomy przy użyciu metody CRISPR-Cpf1 w celu wycięcia bakteriofagów. Genomy fagów zostaną zsekwencjonowane przy użyciu metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS). W wyniku sekwencjonowania, oprócz sekwencji otrzymamy zestaw podstawowych informacji dotyczących genomów, które powinny pomóc w przypisywaniu fagów do odpowiednich rodzin. Domniemane geny zidentyfikowane w genomach zostaną wykorzystane do wyszukiwania homologii względem sekwencji z repozytoriów GenBank. Przewidywanie rodzajów i funkcji białek kodowanych przez zidentyfikowane geny powinno nam dostarczyć informacji dotyczących wpływu analizowanego faga na fizjologię gospodarza. Lizogenne szczepy *C. difficile* zawierające wybrane fagi będą również zsekwencjonowane, ponieważ znajomość sekwencji będzie potrzebna do planowania eksperymentów przy użyciu CRISPR-Cpf1. Genetycznie zmodyfikowany szczep pozbawiony profaga będzie można następnie porównać z lizogennym szczepem rodzicielskim. Porównamy zdolność do adhezji (przylegania) szczepów *C. difficile* do komórek eukariotycznych linii

komórkowych wywodzących się z komórek linii zdrowej jelita grubego i linii nowotworu jelita grubego, jak też tworzenie biofilmu przez szczepy będące w lizogenii i wolne od profagów. Spodziewamy się znaleźć korelację między wynikami uzyskanymi w trakcie realizacji projektu a danymi klinicznymi uzyskanymi od pacjentów z zakażeniem *C. difficile*. Chcemy się dowiedzieć, czy obecność profagów może zwiększać zjadliwość bakterii, i czy przekłada się to na nasilenie objawów CDI u pacjentów zakażonych tymi lizogenami.

Przewidywane trudności w realizacji projektu

W analizie *in vitro* wpływu profagów na gospodarzy bakteryjnych problem może stanowić badanie przebiegu infekcji *C. difficile* w mysim modelu CDI. Aby porównać zjadliwość lizogenów i wolnych od profagów szczepów bakteryjnych, wybraliśmy myszy model badawczy, ponieważ badania histologiczne jelita cienkiego i grubego myszy leczonych antybiotykami i myszy infekowanych *C. difficile* wykazują wiele podobieństw do CDI u ludzi. Zwierzęta zakażone *C. difficile* będą monitorowane pod kątem objawów klinicznych CDI. Przeprowadzimy również badania histologiczne okrężnicy. Dzięki takiemu podejściu będziemy mogli porównać infekcję myszy szczepami z profagiem i bez profaga. ■