

Streszczenie

Zrozumienie interakcji pomiędzy bakteriofagami a bakteriami jest bardzo istotne nie tylko w kontekście ekologicznym, ale też w odniesieniu do zastosowania bakteriofagów w zwalczaniu infekcji bakteryjnych.

Najczęstszym skutkiem presji selekcyjnej wywoływanej przez fagi jest zmiana ekspresji bakteryjnych struktur powierzchniowych, które są receptorami w procesie adsorpcji faga do komórki gospodarza. Uzyskana w ten sposób oporność na infekcję fagową może jednak wiązać się z obniżeniem kondycji „fitness” populacji bakteryjnej. Niniejsza dysertacja porusza dwa aspekty związane z selekcjonowaniem oporności u *Pseudomonas aeruginosa* przez ogonkowe fagi lityczne. Pierwsza analiza obejmuje ocenę konsekwencji fenotypowych uzyskania oporności na fagi w populacji *P. aeruginosa* PAO1. Badane mutanty charakteryzowano pod kątem wzorców fagotypowania, wrażliwości na antybiotyki, efektywności tworzenia biofilmu, patogenności względem larw *Galleria mellonella* oraz podatności na bakteriobójcze działanie dopełniacza (mechanizmy odporności wrodzonej). Drugim badanym aspektem były zmiany genetyczne w populacji *P. aeruginosa* selekcjonowane po infekcji fagowej na przykładzie szczepu wzorcowego PAO1 oraz czterech szczepów klinicznych (A5803, AA43, CHA i PAK). W obu modułach doświadczalnych zastosowano presję selekcyjną wybranych fagów (KT28, KTN6, phiKZ, KTN4, LUZ7, LUZ19, PA5oct) w infekcji pojedynczej lub w koktajlach. Dobrane fagi należą do różnych grup taksonomicznych i morfologicznych (podowirus, miowirus, gigant), oraz rozpoznają różne typy receptorów (LPS, T4P). Badanie to pozwoliło na ocenę skali zmian genetycznych i fenotypowych, a także na dostrzeżenie pewnych schematów rządzących selekcjonowaniem oporności na fagi. Wśród populacji poddanych presji fagowej odnotowano powstawanie oporności na pojedyncze fagi, jak również oporność krzyżową na fagi rozpoznające ten sam jak i alternatywny receptor. Najczęściej selekcjonowana była oporność na faga giganta PA5oct rozpoznającego jednocześnie dwa typy receptorów (LPS i T4P). Wszystkie izolaty kontrolne pozbawione presji zachowały wrażliwość na panel fagów charakterystyczny dla typu dzikiego. Wyniki uzyskane dla szczepu PAO1 potwierdziły hipotezę o obniżeniu wirulencji klonów selekcjonowanych przez infekcję fagową. Zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy liczbą fagów stanowiących presję selekcyjną a częstością zmian genetycznych i fenotypowych skutkujących obniżeniem wirulencji. W populacji każdego z poddanych presji fagowej szczepów *P. aeruginosa* wykryto mutacje w genach zaangażowanych w szlaki biosyntezy receptorów fagowych, chociaż częstość tego typu zdarzeń była różna. Największe rozbieżności między szczepami wykryto w grupie "globalnych genów regulatorowych". A mianowicie, w szczepie PAO1 do modyfikacji najczęściej dochodziło w genach *yqjG* i *vfr*, natomiast w szczepach klinicznych mutacje kumulowały się w genach *cpdA* i *pars*. Oprócz mutacji punktowych, w genomach mutantów opornych na fagi izolowanych ze wszystkich szczepów (z wyjątkiem *P. aeruginosa* CHA) obserwowano występowanie dużych delecji zorientowanych wokół loci genów *galU* i *mexXY*. Jedną z konsekwencji fenotypowych tak dużych ubytków w materiale genetycznym było zahamowanie produkcji łańcucha O-swoistego LPS i upośledzenie działania pomp efflux manifestujące się jako utrata wrażliwości na fagi rozpoznające LPS oraz jako drastyczne uwrażliwienie na większość testowanych antybiotyków. Ponadto, u niektórych opornych na fagi klonów szczepów PAO1, PAK, AA43 i CHA stwierdzono obecność materiału genetycznego infekującego faga. Obserwacja ta może sugerować występowanie zjawiska tzw. pseudolizogenii. Stwierdzono również korelację pomiędzy obecnością profagów w szczepie wyjściowym, a zmniejszonym prawdopodobieństwem przetrwania DNA fagów litycznych w populacjach klonów opornych. Prawdopodobnie posiadanie profagów w genomie jest jednym z mechanizmów chroniących gospodarza przed stanem nosicielstwa fagów litycznych, zapobiegając w ten sposób znacznemu obniżeniu tempa wzrostu populacji bakteryjnej.

Paweł Markowski

Abstract

Understanding the interactions between bacteriophages and bacteria is highly relevant not only in an ecological context but also concerning the application of bacteriophages in the treatment of bacterial infections.

The most prevalent effect of selective pressure induced by phages is the modification of the expression of bacterial surface structures, which serve as receptors in the process of phage adsorption to the host cell. However, the resulting resistance to phage infection may involve a decrease in the fitness of the bacterial population.

This dissertation addresses two aspects of resistance selection in *Pseudomonas aeruginosa* by tailed lytic phages. The first analysis assesses the phenotypic consequences of obtaining phage resistance in the *P. aeruginosa* PAO1 population. The mutants studied were characterized in terms of phage typing patterns, antibiotic sensitivity, biofilm formation efficiency, pathogenicity toward *Galleria mellonella* larvae, and susceptibility bactericidal activity of complement (innate immunity mechanisms). The second aspect studied involved genetic changes in the *P. aeruginosa* population selected after phage infection using the PAO1 reference strain and four clinical strains (A5803, AA43, CHA, and PAK). Both experimental modules used selective pressure of chosen phages (KT28, KTN6, phiKZ, KTN4, LUZ7, LUZ19, PA5oct) in single infection or cocktails. The selected phages belong to different taxonomic and morphological groups (podovirus, myovirus, giant), and recognize different types of receptors (LPS, T4P). This study made it possible to assess the magnitude of genetic and phenotypic changes and to observe some patterns governing the selection of phage resistance.

Among populations subjected to phage pressure, the emergence of resistance to single phages, as well as cross-resistance to phages recognizing the same as well as an alternative receptor, was noted. The most frequently selected was the resistance to the giant PA5oct phage recognizing two types of receptors simultaneously (LPS and T4P). All pressure-free control isolates retained sensitivity to the phage panel characteristic for the wild type. The results obtained for the PAO1 strain confirmed the hypothesis of reduced virulence of clones selected by phage infection. A positive correlation was observed between the number of phages constituting the selection pressure and the frequency of genetic and phenotypic changes resulting in reduced virulence.

Mutations in genes involved in phage receptor biosynthesis pathways were detected in the population of each phage-pressured *P. aeruginosa* strain, although the frequency of such events varied. The greatest divergence between strains, however, was detected in the "global regulatory genes" group. Namely, in the PAO1 strain, modifications most often occurred in the *yqjG* and *vfr* genes, while in the clinical strains the mutations accumulated in the *cpdA* and *pars* genes. In addition to point mutations, large deletions oriented around the *galU* and *mexXY* gene loci were observed in the genomes of phage-resistant mutants isolated from all strains (except *P. aeruginosa* CHA). One of the phenotypic consequences of such large defects in the genetic material was the inhibition of LPS-specific O-chain production and impaired efflux pump function manifested as a loss of sensitivity to phage recognizing LPS and as a dramatic sensitization to most of the tested antibiotics. In addition, the genetic material of the infecting phage was found in some phage-resistant clones of PAO1, PAK, AA43, and CHA strains. This observation may suggest the occurrence of the so-called pseudolysogeny phenomenon. Correlations between the presence of prophages in the wild-type strain and the reduced likelihood of lytic phage DNA survival in populations of resistant clones were also noted. The possession of prophages in the genome likely is one of the mechanisms that protect the host from the carrier state of lytic phages, thus preventing a significant reduction in the growth rate of the bacterial population.