

**„Charakterystyka bakteriofagów infekujących uropatogenne bakterie *Escherichia coli* oraz identyfikacja w ich genomach czynników o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym i poznawczym”
mgr Wojciech Wesołowski**

Zakażenia układu moczowego (ZUM) należą do najczęstszych infekcji bakteryjnych na świecie, stanowiąc drugą pod względem częstości grupę zakażeń po infekcjach dróg oddechowych. Dotykają one od około 150 do 250 milionów ludzi rocznie, stanowią około 30% wszystkich zakażeń szpitalnych i generują znaczne wydatki systemu opieki zdrowotnej oraz społeczno-ekonomiczne, przy czym w samych tylko Stanach Zjednoczonych roczny koszt leczenia niepowikłanych ZUM szacuje się na około 2 miliardy dolarów. Choć ZUM występują u obu płci, kobiety są nieproporcjonalnie częściej dotknięte tego typu infekcjami, gdyż ponad połowa kobiet na świecie doświadcza co najmniej jednego epizodu zakażenia w ciągu życia.

Głównym czynnikiem etiologicznym ZUM są uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (*uropathogenic Escherichia coli*, UPEC), odpowiadające za około 75–85% niepowikłanych i 50–65% powikłanych zakażeń, które wraz z innymi przedstawicielami rzędu *Enterobacterales*, przede wszystkim *Klebsiella pneumoniae*, stanowią przyczynę większości przypadków infekcji. Dominacja bakterii *E. coli* wśród uropatogenów wynika przede wszystkim z ich zdolności do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz do zasiedlania dróg moczowych. Co istotne, bakterie UPEC nie są jednolitą grupą, albowiem obejmują szczepy istotnie różniące się profilami wirulencji i oporności. Genom *E. coli* można podzielić na zachowany ewolucyjnie genom rdzeniowy (*core genome*), obejmujący geny kodujące białka pełniące podstawowe funkcje życiowe komórki oraz sekwencje wysoce zmienne (*accessory genome*), obejmujące mobilne elementy genetyczne, takie jak plazmidy, profagi i wyspy genomowe, których nabywanie lub utrata, za pośrednictwem horyzontalnego transferu genów, kształtuje zdolność bakterii do kolonizacji układu moczowego, ich patogenność i oporność na antybiotyki.

Patogenność UPEC jest determinowana przez zróżnicowany zestaw czynników wirulencji, a nie przez jeden uniwersalny czynnik. Genomy tych bakterii zawierają geny związane z adhezją, umożliwiające przyleganie do komórek nabłonka i kolonizację, w tym fimbrie typu 1, P i S, adhezyny Dra/Afa oraz antygen 43. Niosą one również geny kodujące toksyny, które modulują odpowiedź immunologiczną i uszkodzają komórki gospodarza, jak na przykład α -hemolizyna, martwiczyny czynnik cytotoksyczny 1 (*cytotoxic necrotizing*

factor 1, CNF1) czy białko USP (*uropathogenic-specific protein*), a także geny zaangażowane w biosyntezę i transport sideroforów, umożliwiające efektywne pozyskiwanie żelaza. Dodatkowe geny i białka związane z wirulencją obejmują czynniki inwazyjne, białka autotransporterowe, elementy sekrecyjnego systemu typu VI oraz produkty uczestniczące w biosyntezie otoczki i lipopolisacharydu, które ułatwiają ucieczkę przed odpowiedzią immunologiczną i hamują proces fagocytozy.

Tworzenie biofilmu jest kluczowym etapem patogenyzy ZUM, umożliwiającym UPEC skuteczne przetrwanie i ekspansję w obrębie dróg moczowych. Rozwój biofilmu umożliwiają struktury komórkowe, takie jak fimbrie typu 1 i P, które rozpoznają receptory na powierzchni komórek nabłonka gospodarza i inicjują produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej chroniącej bakterie przed antybiotykami i komórkami układu odpornościowego. W macierzy biofilmu występują dodatkowo komórki przetrwałe (*persister cells*), które potrafią przetrwać ataki układu odpornościowego oraz terapie antybiotykowe i umożliwiają ponowny wzrost populacji bakteryjnej po zakończeniu antybiotykoterapii, co sprawia, że eradykacja biofilmu jest skrajnie trudna, a nawroty zakażeń są częste. Biofilmy mogą również powstawać na powierzchniach abiotycznych, takich jak cewniki moczowe, co czyni leczenie odcewnikowych ZUM szczególnie trudnym zadaniem, albowiem wydłużające się cewnikowanie zwiększa ryzyko zakażenia o około 5% na dobę. W środowisku szpitalnym biofilm bakteryjny stanowi źródło przewlekłych zakażeń oraz miejsce intensywnego międzykomórkowego transferu genów, sprzyjającego selekcji i rozprzestrzenianiu się oporności na antybiotyki.

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród uropatogenów jest stale rosnącym problemem, napędzanym w dużej mierze niewłaściwym stosowaniem antybiotyków i generuje wysokie koszty leczenia. Odnotowane wskaźniki oporności różnią się znacznie w zależności od regionu geograficznego i grupy antybiotyków. Oporność na trimetoprim-sulfametoksazol wśród izolatów UPEC w Europie wynosi od 14,6 do 60%, podczas gdy oporność na amoksycylinę-kwas klawulanowy mieści się w zakresie od 5,3% w Niemczech do 37,6% we Francji, a w krajach rozwijających się odnotowuje się jeszcze wyższe wartości. Oporność na cefalosporyny II i III generacji również rośnie w Europie, a badania izolatów klinicznych UPEC wykazały oporność na cefalosporyny III generacji i amoksycylinę-kwas klawulanowy w niektórych regionach przekraczającą 70–85%. Rozległe stosowanie fluorochinolonów, w szczególności

cyprofloksacyny, przyczyniło się do stałego wzrostu oporności na tę grupę leków, która jest wyraźnie bardziej rozpowszechniona w regionach o niskich i średnich dochodach (w zakresie 55,5–85,5%) niż w krajach wysoko rozwiniętych (w zakresie 5,1–32,0%). Z drugiej strony, izolaty UPEC na ogół pozostają wrażliwe na karbapenemy i nitrofurantoinę, przy czym ta ostatnia, nadal stanowi terapię pierwszego wyboru w zależności od lokalnych wzorców oporności i rodzaju zakażenia. Skalę problemu odzwierciedla włączenie *E. coli* do listy patogenów monitorowanych przez Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC) a także dane z globalnego systemu nadzoru WHO GLASS, wskazujące na istotne obciążenie związane z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród *E. coli* i *K. pneumoniae*, będących częstymi przyczynami zakażeń krwi. W związku z rosnącą częstością oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród bakterii UPEC, pojawiła się pilna potrzeba opracowania terapii alternatywnych.

Wśród alternatywnych strategii walki z zakażeniami wywoływanymi przez wielolekooporne UPEC obiecującym podejściem jest terapia fagowa. Lityczne bakteriofagi posiadają kilka swoistych zalet w porównaniu z konwencjonalnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi: (I) mogą niszczyć biofilmy bakteryjne, które są odporne na leczenie antybiotykami, (II) namnażają się w miejscu zakażenia, zapewniając w ten sposób samoreplikujące się środki bakteriobójcze oraz (III) zabijają patogeny selektywnie, zachowując przy życiu pożyteczne bakterie mikrobiomu. Mimo to zastosowanie terapeutyczne fagów pozostaje wyzwaniem. Do terapii nadają się wyłącznie fagi o ściśle litycznym cyklu rozwojowym, a bioinformatyczna predykcja drogi rozwoju fagów często wymaga potwierdzenia eksperymentalnego. Rzadko badanym aspektem jest to, że aktywność fagów może być obniżona przez odpowiedź immunologiczną gospodarza. Ponadto, wiele bakteriofagów jest wysoce specyficznych wobec zaledwie kilku szczepów bakterii, co uniemożliwia ich szerokie, uniwersalne zastosowanie.

Co ważne, genomy fagów stanowią również cenne źródło informacji genetycznej, mogącej zawierać geny kodujące białka i inne czynniki o znaczeniu zarówno aplikacyjnym, jak i poznawczym. Z jednej strony produkty genów znajdujących się w genomach fagów mogą mieć użyteczne aktywności biologiczne, takie jak liza komórek bakteryjnych lub degradacja struktur na powierzchni bakterii, przez co mogą stanowić źródło nowych środków przeciwdrobnoustrojowych. Z drugiej strony, sekwencje

genomów fagowych mogą zawierać informacje przydatne w badaniach różnorodności i ewolucji fagów, umożliwiając identyfikację cech genomowych przydatnych w określaniu pokrewieństwa oraz rekonstrukcji zależności filogenetycznych między fagami. Niewątpliwie systematyczna eksploracja genomów fagów może jednocześnie przyczyniać się do odkrywania nowych białek o znaczeniu aplikacyjnym oraz do lepszego zrozumienia molekularnej i ewolucyjnej charakterystyki bakteriofagów.

W niniejszej rozprawie skoncentrowaliśmy się na bakteriofagach infekujących bakterie UPEC. Badania obejmowały zarówno fagi już opublikowane, których sekwencje genomowe były dostępne w bazie GenBank, jak i poszukiwanie nowych fagów oraz ich kompleksową charakterystykę, uwzględniającą analizę morfologiczną i fizjologiczną, ocenę stabilności i bezpieczeństwa wobec komórek ludzkich, a także sekwencjonowanie, składanie i szczegółową analizę ich genomów. Przeprowadziliśmy również analizę filogenetyczną badanych fagów w celu określenia ich pokrewieństwa z innymi wirusami infekującymi bakterie UPEC. Z kolei analizy genomowe ukierunkowaliśmy na identyfikację genów i cech genomowych o potencjalnym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym. Szczególną uwagę poświęciliśmy identyfikacji genów kodujących białka enzymatyczne, w tym białka zaangażowane w lizę komórek bakteryjnych i potencjalne depolimerazy, mogące stanowić źródło nowych narzędzi przeciwdrobnoustrojowych. Z drugiej strony, badania miały także na celu identyfikację genów o silnym sygnale filogenetycznym, odgrywających istotną rolę w rekonstrukcji relacji ewolucyjnych nawet dla blisko spokrewnionych fagów infekujących UPEC.

W **artykule nr 1** przeprowadziliśmy analizę 98 bakteriofagów i wykazaliśmy ich znaczny potencjał terapeutyczny w zwalczaniu UPEC. Stwierdziliśmy, że zdecydowana większość tych izolatów, a dokładnie 95%, została oceniona pod kątem zakresu gospodarza, co stanowi fundament zrozumienia spektrum ich aktywności wobec różnych szczepów bakteryjnych. W naszym badaniu wyróżniliśmy siedem fagów: vB_Ecos_Golestan, myPSH1131, Killian, 590b, FS2B, UGKSEcP1 i UGKSEcP2 jako dobrze scharakteryzowanych, potencjalnych kandydatów do dalszych badań nad terapią fagową. Te konkretne szczepy fagowe przeszły szczegółową analizę fizjologiczną i bioinformatyczną, obejmującą ocenę zakresu gospodarza, stabilności, kinetyki rozwoju i organizacji genomu. Co godne uwagi, analiza faga FS2B ujawniła jego silną aktywność lityczną, duży plon fagowy oraz wyjątkową stabilność w szerokim zakresie temperatur

i pH, wraz z potwierdzonym litycznym cyklem rozwojowym i brakiem genów związanych z lizogenią. Ponadto zaobserwowaliśmy, że fag ten wykazywał synergistyczne działanie z badanymi antybiotykami, co sugeruje, że stanowi on przykład dobrze scharakteryzowanego faga, który prezentuje duży potencjał, aby stać się skuteczną, spersonalizowaną opcją terapeutyczną w nawracających zakażeniach układu moczowego.

Analizy bioinformatyczne wykazały ponadto znaczne zróżnicowanie genomowe fagów infekujących UPEC. Wielkości ich genomów mieściły się w zakresie od 39 091 do 169 905 pz, a liczba przewidzianych otwartych ramek odczytu (*open reading frames*, ORF) od 49 do 305. Adnotacje genomów oraz analizy porównawcze przeprowadziliśmy w celu określenia funkcji białek fagowych. Co istotne, osiem wcześniej zsekwencjonowanych, lecz nieopisanych genomów fagów zostało w tej pracy poddanych adnotacji po raz pierwszy. Spośród 792 unikatowych białek fagowych zgromadzonych w tabelach uzupełniających S2 i S3, aż 79 białek fagowych o potencjalnym charakterze aplikacyjnym zidentyfikowaliśmy w nowo zadnotowanych genomach fagów anty-UPEC. Szczególny nacisk położyliśmy na identyfikację fagowych enzymów o potencjalnym zastosowaniu w strategiach przeciwdrobnoustrojowych, w tym białek uczestniczących w lizie komórek bakteryjnych oraz potencjalnych depolimeraz, zidentyfikowanych na podstawie strukturalnych analiz bioinformatycznych. Łącznie, u wszystkich badanych fagów zidentyfikowano 40 klasycznych endolizyn, 75 holin, 40 spanin i 16 potencjalnych depolimeraz. Aby dokładniej scharakteryzować potencjał rozwojowy fagów, wykonaliśmy predykcje cyklu życiowego, dostarczając nowych wyników i wskazując kilka fagów wymagających dalszej weryfikacji eksperymentalnej ze względu na potencjalnie lizogeniczny cykl rozwojowy. Ponadto opracowaliśmy wieloetapowe podejście do analizy filogenetycznej badanych fagów. W pierwszym etapie, 82 fagi pogrupowaliśmy w kłady na podstawie ich wstępnego podobieństwa i pokrewieństwa ewolucyjnego, określonego na podstawie drzewa proteomicznego wygenerowanego z wykorzystaniem programu ViPTree. Następnie, za pomocą oprogramowania OMA, zidentyfikowaliśmy grupy genów ortologicznych. W kolejnym etapie oceniliśmy poszczególne matryce uszeregowień sekwencji białkowych pod kątem liczby miejsc parsymonicznie informatywnych. Na tej podstawie wytypowaliśmy geny dostarczające informacji filogenetycznej i wykorzystaliśmy je do skonstruowania drzew wielogenowych. Należały do nich między innymi geny kodujące białka ogonka, białka portalowe oraz białka związane z replikacją genomu. Z analizy wykluczyliśmy sekwencje o wysokim stopniu zakonserwowania.

Te nowo wykonane analizy w znacznym stopniu wzbogaciły dostępną charakterystykę bioinformatyczną genomów fagowych i dostarczyły nowych informacji o ich potencjale aplikacyjnym, cechach rozwojowych i relacjach ewolucyjnych tych fagów. Co ważne, analizy przeprowadzone z użyciem wielu narzędzi bioinformatycznych konsekwentnie wskazywały na brak czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki w analizowanych genomach fagów. Wyniki te demonstrowają istotność i znaczenie kompleksowej charakterystyki fagów dla oceny ich stabilności, bezpieczeństwa wobec komórek ludzkich, ich cech rozwojowych i zależności ewolucyjnych, przed zastosowaniem terapeutycznym.

Mimo tych obiecujących wyników zidentyfikowaliśmy istotne luki metodologiczne i niespójności w opublikowanych pracach, które utrudniają ocenę przydatności badanych fagów w terapii fagowej. Nasza praca przeglądowa (**artykuł nr 1**) ujawniła, że kluczowe dane dotyczące bezpieczeństwa fagów w dużej mierze nie istnieją, a co ważne, żaden z 98 analizowanych fagów nie został przetestowany pod kątem cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych. Ponadto tylko 42% przeanalizowanych fagów miało zbadaną wydajność infekcji (*efficiency of plating*, EOP). Brak wyników tej analizy, jest istotnym zaniedbaniem prowadzącym do nieprecyzyjnych ocen skuteczności działania opublikowanych fagów. Z kolei badania stabilności przeprowadzono jedynie dla 20% szczepów fagowych pod względem temperatury i 19% pod względem pH. Dodatkowo 15% genomów fagowych w ogóle nie zostało zsekwencjonowanych, a inne nie miały wykonanej prawidłowej adnotacji ani analizy filogenetycznej. W celu zaradzenia tym ograniczeniom doszliśmy do wniosku, że przyszłe badania powinny opierać się na ustandaryzowanych, kompleksowych protokołach charakterystyki fagów, a konkretnie, opowiedzieliśmy się za obowiązkowymi testami EOP, dokładnymi badaniami przesiewowymi pod kątem cytotoksyczności, badaniami stabilności w warunkach fizjologicznie istotnych oraz rygorystyczną weryfikacją bioinformatyczną genomów pod kątem obecności genów toksyn i oporności na antybiotyki, aby móc ocenić potencjał badanych fagów w zastosowaniu w terapii fagowej.

Mając na uwadze ograniczenia dotyczące charakterystyki bakteriofagów, zidentyfikowane w **pracy nr 1**, staraliśmy się im zaradzić we własnych badaniach eksperymentalnych, przedstawionych w **artykule nr 2**. W tej pracy wyizolowaliśmy i wszechstronnie scharakteryzowaliśmy kilka nowych litycznych bakteriofagów

infekujących kliniczne szczepy UPEC oraz zaproponowaliśmy pięć nowych gatunków fagów: *Hanrivervirus* vB_EcoS-149_4M, *Warwickvirus* vB_EcoS-149_6D, *Nonavirus* vB_EcoS-164_2, *Kagunavirus* vB_EcoS-179_3 i *Vectrevirus* vB_EcoP-179_5. Co ważne, wyszliśmy daleko poza opisowe raportowanie dominujące w literaturze: zamiast jedynie rejestrować zakres gospodarzy standardowo stosowanym testem nakropień (*spot test*), wykonaliśmy analizę EOP i zintegrowaliśmy charakterystykę fagów z porównawczą analizą genomową samych gospodarzy bakteryjnych. Ponadto wykonaliśmy szeroką analizę bioinformatyczną genomów fagowych, wykluczyliśmy występowanie genów toksyn i genów oporności na antybiotyki oraz udokumentowaliśmy obecność genów kodujących potencjalne białka lityczne, takie jak endolizyny, holiny i spaniny, u wszystkich nowo zidentyfikowanych fagów.

Aby ustalić pozycję filogenetyczną badanych fagów, zmodyfikowaliśmy nieco podejście zastosowane w **pracy przeglądowej nr 1**. Odległości genomowe pomiędzy analizowanymi fagami określiliśmy za pomocą programu VIRIDIC, a następnie przeprowadziliśmy rekonstrukcję relacji filogenetycznych na podstawie drzew wielogenowych. Do analiz wykorzystaliśmy grupy genów ortologicznych zidentyfikowane za pomocą oprogramowania OMA. Po wykonaniu uszeregowania sekwencji oraz ocenie ich sygnału filogenetycznego wykluczyliśmy sekwencje charakteryzujące się niewystarczającą liczbą miejsc parsymonicznie informatywnych, a pozostałe wykorzystaliśmy do rekonstrukcji drzew. Wśród genów wykorzystanych do rekonstrukcji znajdowały się między innymi geny kodujące białka ogonka, małą i dużą podjednostkę terminazy, a także białka związane z lizą komórki, w tym holiny i spaniny.

Ponadto wykazaliśmy, że właściwości biologiczne i bezpieczeństwo badanych fagów istotnie różnicują ich potencjalną przydatność w terapii fagowej. Fag vB_EcoS-149_4M, charakteryzujący się najszerszym zakresem gospodarza, wysoką stabilnością w badanych warunkach oraz korzystnym profilem bezpieczeństwa, obejmującym brak genów kodujących toksyny i determinanty oporności na antybiotyki oraz brak wykrywalnego działania cytotoksycznego wobec badanych linii komórek ludzkich, stanowi obiecującego kandydata do dalszych zastosowań aplikacyjnych. Natomiast fagi vB_EcoS-179_3 i vB_EcoP-179_5 prezentują bardzo wąski zakres gospodarza, ograniczony do infekcji szczepu EC179, co wskazuje na ich potencjalną przydatność raczej w podejściu zindywidualizowanym niż w zastosowaniach o charakterze uniwersalnym.

Chociaż identyfikacja pięciu nowych gatunków bakteriofagów anty-UPEC poszerzyła dotychczasową pulę 98 opisanych fagów zdolnych do infekcji tych uropatogenów, to uzyskane wyniki wskazują jednak, że liczba opisanych fagów litycznych infekujących UPEC nadal pozostaje niewystarczająca w porównaniu z dużą liczbą i znacznym zróżnicowaniem genotypowym i fenotypowym przedstawicieli tej grupy bakterii. Szczególnie wymownym przykładem jest szczep EC256, dla którego w ramach przeprowadzonych badań nie udało się zidentyfikować infekującego go bakteriofaga.

Strategię wieloaspektowej charakterystyki pozyskanych ze środowiska bakteriofagów rozszerzyliśmy jeszcze bardziej w **pracy nr 3**, dotyczącej bakteriofaga vB-EcoS_57-3 i jego endolizyny 57_3Lys. W tej pracy wyizolowaliśmy faga ze ścieków miejskich, scharakteryzowaliśmy go jako faga o morfologii siphovirusów i oceniliśmy morfologię łysinek, która sugeruje działanie depolimerazy. W pełni zsekwencjonowaliśmy i opisaliśmy jego genom o długości 45 774 pz, obejmujący 91 ORF, oraz jednoznacznie ustaliliśmy jego pozycję taksonomiczną jako nowego przedstawiciela rodzaju *Veterinaerplatzvirus* w rodzinie *Drexlerviridae*. Ponadto eksperymentalnie zbadaliśmy cykl rozwojowy faga: określiliśmy czas latencji wynoszący 11 minut, plon fagowy na poziomie około 42 PFU na komórkę, umiarkowanie szybką adsorpcję osiągającą wydajność 80% w ciągu 10 minut oraz wysoce wydajny rozwój lityczny, prowadzący do istotnej redukcji liczby żywych komórek bakteryjnych w ciągu 30 minut. Co istotne, przetestowaliśmy faga w warunkach zbliżonych do warunków zamierzonego zastosowania klinicznego, czyli w sztucznym moczu przy pH 4,5, 5,8 i 6,5, w którym fag pozostał stabilny i redukował liczbę bakterii do zaledwie 10% początkowej ich liczby po 24 godzinach. Dodatkowo wykluczyliśmy niekorzystne działanie lizatu fagowego na komórki ssacze, wykazując brak cytotoksyczności wobec ludzkich linii pęcherza moczowego (T24) i nerki (HEK293).

W dalszej części pracy zwróciliśmy uwagę na kodowane przez fagi białka, ponieważ enzymy lityczne pochodzenia fagowego stanowią ciekawą grupę czynników o właściwościach przeciwbakteryjnych. Jak podsumowaliśmy w **artykule nr 4**, endolizyny to enzymy degradujące peptydoglikan, produkowane w trakcie litycznego cyklu faga i mają wiele zalet, takich jak szybkie zabijanie bakterii, niskie prawdopodobieństwo rozwoju oporności, aktywność synergistyczna z innymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi oraz skuteczność zarówno wobec komórek planktonicznych,

jak i biofilmów bakteryjnych. Poprzez zastosowanie technik inżynierii genetycznej, ich spektrum działania można nawet celowo modyfikować, na przykład poprzez fuzję z komponentami uszkodzającymi błonę zewnętrzną, domenami wiążącymi ścianę komórkową dla bardziej specyficznego działania lub peptydami przeciwdrobnoustrojowymi. Niemniej jednak liczba doniesień na temat endolizyn wykazujących bezpośrednią aktywność wobec uropatogenów, w szczególności bakterii UPEC, pozostaje ograniczona. Istotnym ograniczeniem ich zastosowania wobec Gram-ujemnych bakterii UPEC jest obecność błony zewnętrznej, która stanowi barierę utrudniającą dostęp egzogennie aplikowanych enzymów do warstwy peptydoglikanu. Dodatkowe wyzwania obejmują ryzyko zaburzeń mikrobiomu wynikające ze zbyt szerokiego spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, trudności w oczyszczaniu oraz fakt, że zbyt niskie stężenia endolizyn mogą zmieniać fenotyp bakterii w sposób potencjalnie niekorzystny dla pacjenta, co uwidacznia konieczność przeprowadzenia dokładnej oceny ich bezpieczeństwa.

Poszukując opisanych w **artykule nr 4** endolizyn, przeanalizowaliśmy genomy 75 litycznych fagów anty-UPEC dostępnych w bazie GenBank. Analiza ta pozwoliła nam zidentyfikować 39 potencjalnych endolizyn w 30 genomach fagowych. Zidentyfikowane enzymy obejmowały zarówno białka wcześniej opisane przez innych badaczy, jak i białka opisane po raz pierwszy przez nas. Przeprowadzona analiza *in silico* wykazała znaczną różnorodność potencjalnych endolizyn pod względem przewidywanej aktywności enzymatycznej. Wśród zidentyfikowanych białek wyróżniono pięć grup obejmujących enzymy z domenami lizozymowymi, amidazowymi i peptydazowymi, a także białka o przewidywanej aktywności transglikozylazowej i hydrolazowej. Parametry fizykochemiczne zidentyfikowanych endolizyn wskazują, że masy cząsteczkowe tych białek mieściły się w zakresie od około 8,7 do 22,6 kDa, a ich punkty izoelektryczne wskazywały na zasadowy charakter. Wartości wskaźnika niestabilności sugerowały dobrą stabilność większości analizowanych białek, natomiast wysokie wartości wskaźnika alifatyczności wskazywały na ich potencjalną stabilność termiczną. Ujemne wartości współczynnika GRAVY wskazywały z kolei na hydrofilowy charakter białek i ich przewidywaną rozpuszczalność w wodzie. Dodatkowo w sekwencjach tych białek zidentyfikowaliśmy wiele sekwencji przeciwdrobnoustrojowych peptydów (*antimicrobial peptides*, AMP), co wskazuje na ich potencjalne właściwości lityczne.

Szczególnie interesujące było również nasze odkrycie, że w genomach siedmiu fagów występują duże białka o masie od 120 do 145 kDa z domenami przypominającymi endolizyny, które prawdopodobnie ułatwiają wstrzykiwanie materiału genetycznego faga do wnętrza komórki na początku infekcji, a nie ostateczną lizę komórki. Co więcej, przeprowadzona przez nas analiza filogenetyczna i funkcjonalna ujawniła problemy związane z prawidłową adnotacją niektórych, opisanych przez innych badaczy potencjalnych endolizyn. W przypadku kilku białek pierwotnie opisanych jako endolizyny analiza zidentyfikowanych domen wskazała na możliwość ich błędnej klasyfikacji. Przykładowo, w przypadku białek pochodzących z fagów Killian i ZCEC14 zidentyfikowano domeny charakterystyczne odpowiednio dla beztlenowej rybonukleozydo-trifosforanowej reduktazy oraz RNazy H T4, a także domenę inhibitora proteazy uczestniczącej w dojrzewaniu główki bakteriofaga. Obecność tych domen, a także przeprowadzona klasyfikacja filogenetyczna sugerowały, że analizowane białka mogą pełnić inne funkcje niż degradacja peptydoglikanu i prawdopodobnie nie są endolizynami. Wyniki te wskazują na konieczność szczegółowej weryfikacji białek adnotowanych jako endolizyny fagowe.

Kontynuacją prac bioinformatycznych dotyczących fagowych endolizyn były nasze kolejne badania eksperymentalne, opisane w **pracy nr 3**. W tej pracy dokonaliśmy walidacji funkcjonalnej endolizyny faga vB-EcoS_57-3, nazwanej 57_3Lys. *In silico* ustaliliśmy, że 57_3Lys to niewielkie białko o długości 161 aminokwasów i masie 17,55 kDa. Na podstawie analizy domen zidentyfikowanych w 57_3Lys udało się ustalić, że jest to endolizyna SAR klasy II, reprezentowanej przez endolizynę R21 lambdoidalnego faga 21. W obrębie sekwencji 57_3Lys zidentyfikowaliśmy N-końcowy, umiarkowanie hydrofobowy segment 20 reszt jako domenę „signal-anchor-release”, katalityczną triadę E(X)₈-D(X)₅-T w pozycjach E26, D35 i T41 oraz kationowy, amfipatyczny region podobny do peptydów przeciwdrobnoustrojowych AMP, między resztami 110 a 140. W ramach przeprowadzonych prac eksperymentalnych, sklonowaliśmy i nadprodukowaliśmy enzym, a następnie oczyszczaliśmy go metodą chromatografii powinowactwa, uzyskując białko o masie około 17,55 kDa, zgodnej z wartością przewidywaną *in silico*. Następnie, wykorzystując azydek sodu (NaN₃), będący inhibitorem translokazy Sec u *E. coli*, wykazaliśmy zależne od stężenia zahamowanie lizy komórek bakteryjnych indukowanej przez 57_3Lys. Przy stężeniu 5 mM NaN₃ efekt lityczny był wyraźnie ograniczony, natomiast przy 10 mM został niemal całkowicie zahamowany. W połączeniu z obecnością

przewidywanej N-końcowej domeny SAR oraz charakterystycznego dla endolizyn SAR klasy II motywu E(X)₈-D(X)₅-T, wyniki te dostarczyły zbieżnych dowodów na udział szlaku Sec w translokacji 57_3Lys do przestrzeni peryplazmatycznej. Oprócz tego, wykazaliśmy, że oczyszczone białko 57_3Lys, zastosowane zewnętrznie wobec komórek klinicznego izolatu UPEC, EC57, wykazywało aktywność przeciwbakteryjną bez dodatku zewnętrznego permeabilizatora błony zewnętrznej, powodując istotne zmniejszenie zarówno mętności hodowli, jak i liczby żywych komórek wyrażonej w CFU/mL. Efekt ten rozwijał się powoli i był obserwowany po 24 godzinach inkubacji, podczas gdy w ciągu pierwszych 60 minut nie stwierdzono istotnego działania przeciwbakteryjnego. W przeciwieństwie do 57_3Lys, komercyjnie dostępny lizozym nie wykazywał istotnego działania przeciwbakteryjnego, co prawdopodobnie wynikało z ograniczonego dostępu enzymu do warstwy peptydoglikanu. Obserwowana aktywność 57_3Lys wobec komórek Gram-ujemnych może być związana z obecnością przewidywanego C-końcowego regionu AMP, obejmującego reszty 110–140 i wzbogaconego w reszty dodatnio naładowane oraz hydrofobowe, który może sprzyjać elektrostatycznym oddziaływaniom z lipopolisacharydem i destabilizacji błony zewnętrznej, ułatwiając dostęp domeny enzymatycznej do peptydoglikanu. Należy jednak podkreślić, że udział tego regionu w aktywności 57_3Lys pozostaje hipotezą wymagającą bezpośredniej weryfikacji eksperymentalnej.

Podsumowując, przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej była kompleksowa analiza bakteriofagów infekujących uropatogenne szczepy *E. coli* oraz poszukiwanie w ich genomach czynników o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym i poznawczym. Podjęcie tej tematyki wynikało z narastającego problemu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród uropatogenów, związanego między innymi z niewłaściwym stosowaniem antybiotyków. Skala tego zjawiska jest zróżnicowana w zależności od regionu geograficznego oraz stosowanej klasy antybiotyków, co wskazuje na potrzebę poszukiwania alternatywnych metod zwalczania zakażeń wywołanych przez UPEC. Jedną z takich możliwości stanowi terapia fagowa, której potencjał wynika między innymi ze zdolności fagów litycznych do eliminacji biofilmów, namnażania się w miejscu zakażenia oraz selektywnego oddziaływania na bakterie patogenne, przy ograniczonym wpływie na bakterie komensalne.

Przeprowadzony przez nas systematyczny przegląd 98 bakteriofagów anty-UPEC wykazał jednak istotne braki w sposobie ich dotychczasowej charakterystyki. Szczególnie widoczne były ograniczenia dotyczące oceny bezpieczeństwa, w tym brak badań cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych, a także niepełne oznaczenia EOP, ograniczony zakres badań stabilności oraz niekompletna adnotacja i analiza genomów. Wyniki te wskazały na potrzebę stosowania bardziej kompleksowego i ujednoliconego schematu oceny bakteriofagów. Wyniki uzyskane w części eksperymentalnej rozprawy stanowiły naszą bezpośrednią odpowiedź na zidentyfikowane wcześniej ograniczenia. Wyizolowaliśmy i kompleksowo scharakteryzowaliśmy nowe lityczne bakteriofagi infekujące kliniczne szczepy UPEC, co doprowadziło do zaproponowania pięciu nowych gatunków. Szczególną uwagę zwrócił fag vB_EcoS-149_4M, który ze względu na szeroki zakres gospodarza, wysoką stabilność oraz korzystny profil bezpieczeństwa został wskazany jako kandydat do dalszych badań w kierunku oceny jego przydatności w terapii fagowej. Podejście to rozszerzyliśmy dodatkowo poprzez pogłębioną charakterystykę bakteriofaga vB-EcoS_57-3 i jego endolizyny 57_3Lys. Istotnym elementem badań była ocena właściwości faga w warunkach związanych z potencjalnym zastosowaniem w zakażeniach układu moczowego. Wykazaliśmy jego stabilność i aktywność lityczną w sztucznym moczu o wartościach pH odpowiadających zakresowi występującemu w drogach moczowych, a jednocześnie nie stwierdziliśmy cytotoksycznego działania wobec ludzkich komórek. Równolegle przeprowadziliśmy analizę 75 genomów litycznych bakteriofagów anty-UPEC, koncentrując się na identyfikacji potencjalnych endolizyn. Zidentyfikowaliśmy 39 białek należących do pięciu grup funkcjonalnych, różniących się przewidywaną aktywnością enzymatyczną. Analiza ta pokazała również, że sama adnotacja genomu nie zawsze pozwala na wiarygodną identyfikację endolizyn. Szczegółowa analiza endolizyny 57_3Lys pozwoliła następnie na połączenie przewidywań bioinformatycznych z wynikami badań funkcjonalnych. Uzyskane wyniki wskazują, że zidentyfikowana przez nas endolizyna 57_3Lys wykazuje działanie antybakteryjne i w przyszłości może mieć praktyczne zastosowanie w leczeniu ZUM. Enzym ten był zdolny do znaczącego zmniejszenia zarówno mętności, jak i liczby żywych komórek klinicznego izolatu UPEC bez dodatku egzogenego permeabilizatora błony zewnętrznej, co podkreśla jego aktywność wobec osłony bakterii Gram-ujemnych i umacnia potencjał terapeutyczny enzymów litycznych pochodzenia fagowego jako strategii komplementarnej wobec terapii fagowej.

Co istotne, uzyskane w ramach tej rozprawy wyniki mają znaczenie nie tylko w kontekście poszukiwania nowych czynników przeciwdrobnoustrojowych, ale również znaczenie poznawcze, istotne z punktu widzenia badań nad biologią i ewolucją bakteriofagów. Analiza genów wpływających na topologię drzew filogenetycznych pozwoliła wskazać sekwencje szczególnie przydatne do odtwarzania relacji ewolucyjnych pomiędzy fagami anty-UPEC. Wybrane geny, w tym geny kodujące białka ogona, białka portalowe, lityczne oraz białka związane z replikacją, charakteryzowały się silnym sygnałem filogenetycznym. Mogą one zatem stanowić użyteczne markery genomowe, pomocne w rozróżnianiu blisko spokrewnionych fagów oraz zwiększaniu wiarygodności ich klasyfikacji i rekonstrukcji zależności ewolucyjnych.

Ostatecznie wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy pokazują, że bakteriofagi są źródłem różnorodnych czynników o potencjalnym znaczeniu zarówno aplikacyjnym, jak i poznawczym. Ich kompleksowa charakterystyka pozwala nie tylko identyfikować i oceniać kandydatów do wykorzystania w nowych strategiach przeciwdrobnoustrojowych, lecz także dostarcza informacji przydatnych do poznania różnorodności, biologii i ewolucji tych wirusów. Szczególne znaczenie ma połączenie klasycznych badań biologicznych z analizą bioinformatyczną genomu i badaniem zależności filogenetycznych, co pozwala na pełniejszą ocenę zarówno możliwości wykorzystania fagów i ich produktów, jak i głębsze zrozumienie biologii i ewolucji bakteriofagów.