

Pertics Botond Zsombor

PhD V. évf.

Doktori (PhD) értekezés

***Klebsiella pneumoniae* és *Staphylococcus aureus*
törzseken izolált bakteriofágok és sejtburkbontó
enzimjeik jellemzése,
antibakteriális hatásuk vizsgálata**

Témavezető: **Dr. Schneider György**¹, egyetemi adjunktus

Programvezető: Dr. Kerényi Monika¹, egyetemi docens

Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglődi Dóra², egyetemi tanár

¹PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

²PTE ÁOK Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Pécs, 2023

BEVEZETÉS

1. A vizsgált baktériumok

A *Klebsiella pneumoniae* a természetes humán mikrobióta része, amely a mukózus felületeket kolonizálja. Ezeken a helyeken ártalmatlan, ám innen más szövetekbe terjedve legyengült szervezet esetében komoly fertőzéseket okozhat, éppen ezért opportunista kórokozóként tartjuk nyilván. Napjainkban kórházban szerzett (nozokomiális, healthcare-associated, HA) tüdőgyulladások, húgyúti, seb-, katéter- és véráramfertőzések gyakori felelőse, melyek gyakorta vezetnek septicus sokkhoz, és más életveszélyes állapotokhoz, főleg a legyengült immunrendszerű, és/vagy idős fekvőbetegek esetében (Shon *et al.*, 2013; Corsaro *et al.*, 2005; Podshun & Ullmann, 1998; Paczosa & Meccas, 2016). A kórházi fertőzések mellett a közelmúltban megjelent hipervirulens törzsek közösségben szerzett fertőzések (community-acquired, CA) kialakulásáért felelősek, úgymint gennykeltő májtályog (pyogenic liver abscess, PLA), áttétes meningitis, és endophthalmitis (Shon *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2013).

A *K. pneumoniae* izolátumok legtöbbször multirezisztensek, azaz legalább három antibiotikum-csoporttal szemben ellenállóak. A klasszikus *K. pneumoniae* (cKP) fertőzések mellett az utóbbi évtizedekben megjelent hipervirulens (hvKP) törzsek még szélesebb rezisztenciával rendelkeznek, és gyakran már az egyébként kevésbé súlyos (pl. húgyúti) fertőzéseket is halálos kimenetelűvé tehetik az antibiotikumos kezelés hatástalansága miatt (Shon *et al.*, 2013).

A *K. pneumoniae* egyik legkiemelkedőbb, és jelen kutatás számára fontos virulenciafaktora a tok (capsular polysaccharide, CPS) (Corsaro *et al.*, 2005), mely védelmet nyújt a baktérium számára a gazdaszervezet immunrendszere (Tomás *et al.*, 2015; March *et al.*, 2013), a kiszáradás, lizozimek, bakteriofágok, antibiotikumok ellen, segíti a szöveti felületekhez tapadást, és a biofilmképzés alapanyaga, kialakítva ezzel azt a multicelluláris prokarióta „közösséget”, melyben a sejtek egymáshoz és/vagy egy felülethez tapadva működnek, a planktonikus (egyedüli) sejtformához képest alapvetően más fiziológiai tulajdonságokkal, így fokozottabb védelmet élveznek. Éppen ezért, a biofilmeknek a humán betegségekben nagy szerepe van (Archer *et al.*, 2011; Lister & Horswill, 2014).

K. pneumoniae esetében a mintegy 80 különböző tok-szerotípus (K-antigének) közül a K1 és a K2 szerotípust izolálják leggyakrabban betegekből, fagocitózis-rezisztenciájuk közrejátszik prevalenciájukban, virulenciájuk a többi szerotípushoz képest kiemelkedő, általában hipervirulensek (hvKP) (Nassif *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 2004).

A *Staphylococcus aureus* szintén a normál mikrobióta tagja, az egészséges felnőtt populáció több mint 50%-ának szervezetét kolonizálja, és az ilyen (főleg orr-) kolonizáció gyakran kiindulási helye lehet szisztémás fertőzéseknek, főleg a legyengült immunrendszerrel bíró populáció körében (Mehraj *et al.*, 2016; Weidenmaier *et al.*, 2012; Archer *et al.*, 2011). A *S. aureus* (piogén) gennykeltő baktérium, jellemzően bőrfertőzések, lágy szöveti fertőzések (impetigo, folliculitis, tályogok, sebfertőzések,

varratgennyedések) okozója, ezen kívül különböző szervfertőzésekért is felelős: ezek véráram-fertőzések, szívbelhártya gyulladás, tüdőgyulladás, csontvelőgyulladás, szepszis, szeptikus ízületi gyulladás. Előfordulhat toxinmediált fertőzés is, a fertőzések toxikus sokk szindrómához vezethetnek (Mehraj *et al.*, 2016; Chambers & DeLeo, 2009; Lakhundi & Zhang, 2018).

Klinikailag a legnagyobb fenyegetést a *S. aureus* esetében az jelenti, hogy kiemelkedően magas szintű rezisztenciát tud nyerni számtalan antibiotikum-csoport ellen. A *S. aureus* számos virulenciafaktorral rendelkezik, melyeket változatos kombinációkban képes kifejezni. Ezek közt akadnak sejt felszínéhez kötött elemek, melyek az adhéziót biztosítják, a fagocitózist gátolják, pl. a sejtfa (peptidoglikán, PG) elemei, melyek lázkeltőek, komplement aktivátorok, szerepet játszanak a tályogképzésben, a vérlemezkék oldásában (Lowy, 1998; Choi *et al.*, 2014).

A *Klebsiellához* hasonlóan a *S. aureus* szintén jellemző a biotikus (bőr és nyálkahártya) és abiotikus (katéterek, implantátumok) felszínnek kolonizációjának képessége. A *S. aureus* többrétegű biofilmet képes alkotni, mely glycocalyxba vagy nyákrétegbe ágyazódik. *S. aureus* biofilm-formációval összefüggő betegségek többek közt az osteomyelitis, beültetett orvosi eszköz fertőződése, periodontitis, szemfertőzés (Archer *et al.*, 2011; Lister & Horswill, 2014; Gutierrez *et al.*, 2014).

Mindkét fent bemutatott kórokozó (*K. pneumoniae* és *S. aureus*) jellemző a **multirezisztencia**, a **kórházi fertőzések gyakorisága**, illetve a **biofilmképzés**. Vizsgált baktériumaink a mindhárom tulajdonság terjedéséért felelős legfőbb ágensek listáján szerepelnek. Ezek a tényezők egymással összefüggenek: a különböző, szerves vagy mesterséges felületekhez tapadó biofilm elérhetetlenné teszi őket olyan antibiotikumok számára, melyek közvetlenül a baktérium metabolizmusára hatnának.

Így az antibiotikumrezisztencia fokozatos terjedése miatt egyre nagyobb jelentőséggel bír új alternatív antimikrobás eljárások alkalmazásának lehetősége.

A fágok és rekombináns fág enzimek antibakteriális alkalmazása egy széles körben kutatott és nagy lehetőségeket ígérő alternatív módszer a különböző multirezisztens és hipervirulens baktériumtörzsek megfékezésére.

2. Bakteriofágok

A bakteriofágok (röviden: fágok) a baktériumok vírusai (Abedon *et al.*, 2011). A farkos fágokra („*Caudovirales*”) jellemző a binális virion, mely egy feji és egy farki részből áll, előbbi fehérjeburok (kapszid) tartalmazza a dupla szálú DNS-t, utóbbi a baktériumon történő megtapadásnál, és a nukleinsav sejtbe juttatásánál játszik szerepet.

Életciklusukat tekintve a fágok lehetnek virulensek vagy temperáltak. Virulens fágok esetben a lítikus fágciklus valósul meg, mely a gazdabaktérium pusztulásával jár (Parasion *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014). A temperált (mérsékelt) fágok ezen felül képesek arra, hogy „lizogén döntést” hozzanak: adott körülmények közt genomjuk beépülhet a bakteriális kromoszómába (lizogén), és ún. profágként replikálódik tovább a baktérium szaporodása során. Stressz vagy más faktorok hatására aztán visszaléphet a lítikus útra (Cieslik *et al.*, 2021).

A fágterápia előnye az antibiotikumokkal szemben például, hogy gazdaságosabb: fágokat izolálni olcsóbb és gyorsabb is, mint antibiotikumokat szintetizálni, főként az antibiotikum-rezisztens törzsek ellen. Az obligát lítikus fágok baktericidek, sok bakteriosztatikus antibiotikummal ellentétben, mely a patogének jelenlétét csak represszálja, ezzel függ össze, hogy a fágok mennyisége önszabályozó, az önreplikáció miatt dózisfüggetlen. A fágok továbbá szűk specificitásuknak köszönhetően a normál mikrobiótát nem eradikálják, mi több, a célzott biofilmeket is képesek degradálni. Emellett rugalmasak: felhasználásuk különböző kombinációkban más fágokkal vagy antibiotikumokkal számos lehetőséget nyújt. Nem utolsó sorban a fágok „természetes” ágensek: egyrészt a baktériumokkal való fegyverkezési versenyben maguk veszik fel a kesztyűt, másrészt alkalmazásuk nem szennyezi a környezetet és nem járul hozzá az antibiotikum rezisztens törzsek terjedéséhez (Loc-Carillo & Abedon, 2011; Vázquez *et al.*, 2022).

3. Bontó fág enzimek

Enzimek egész arzenálja áll a bakteriofágok rendelkezésére, melyek segítségével felismerik és/vagy lebontják a baktériumsejt különböző komponenseit a lítikus fág-fertőzés különböző szakaszaiban (Yan *et al.*, 2014; Roach & Donovan, 2015).

Tokos baktériumok esetében a legelső vonal, mellyel a fágok megtapadáskor szembekerülnek, a tok (capsule polysaccharide, CPS), vagy a lazább felépítésű exopoliszacharidok (EPS). Ezek ellen egyes fágok poliszacharid depolimeráz enzimekkel rendelkeznek. Az ilyen hidroláz vagy liáz aktivitású fehérjék a tok polimerjeit oligo- vagy monoszacharidokká bontják (Parasion *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2016). A depolimerázok lehetnek **virion-integrált struktúrfehérjék**, melyek jellemzően farki fehérjék, fiberek vagy tüskék, de lehetnek nyaki vagy feji részen is. Depolimerázok **termelődhettek szolubilis fehérjékként** is a lízis során. Mindkét forma is szabadon diffundálhat az agarban (Nobrega *et al.*, 2018; Blundell-Hunter *et al.*, 2021; Knecht *et al.*, 2020).

A peptidoglikán (PG) sejtfa bontását peptidoglikán-hidrolázok, röviden lizinek végzik. A fágfertőzés kezdetén, a megtapadás után a **virion-asszociált lizinek (VAL)**, kívülről, egy pontra lokalizáltan penetrálják át a sejtfa, hogy aztán a DNS-t a baktériumba juttathassák. A fágfertőzés végén az **endolizinek** az utódvirionok kiszabadulásakor, belülről bontják le a sejtfa, delokalizáltan (Latka *et al.*, 2017; Fernandes & Sao-José, 2018; Sao-José, 2018).

A rekombináns fágfehérjék, bontó fág enzimekben rejlő antibakteriális potenciált több dolog is fokozza. Alkalmazásukkal kiszűrhetjük azon hátrányokat, melyek a fágok esetében fellépnek. A rekombináns fehérjék karakterizálása, strukturális és farmakológiai vizsgálata, egy antimikrobiális ágens uniform előállítás, tisztítása a fágokhoz képest beláthatóbb és kontrollálhatóbb folyamat. A rekombináns endolizinek a Gram pozitív baktériumok (pl. MRSA) okozta fertőzésekkel szembeni sikerei iránt joggal támasztanak nagy elvárásokat. A Gram negatív hipervirulens törzsek (pl. *K. pneumoniae*) tokjai és biofilmje ellen pedig a depolimerázok bizonyulnak hatékony fegyvernek (Nelson *et al.*, 2012; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2012; Kashani *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018; Drulis-Kawa *et*

al., 2012; Fenton *et al.*, 2010; Schmelcher *et al.*, 2012)).

A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI

Célunk olyan bakteriofágok izolálása és analízise volt, melyek hatékonyak bizonyulnak a K2-es toktípust kódoló *Klebsiella pneumoniae* ellen, illetve hasonló irányvonalak mentén más, *Staphylococcus aureus* ellen hatékony fágok izolálása és analízise. Igyekeztünk a fágok potenciális antibakteriális ágensként történő felhasználásának lehetőségét is megvizsgálni.

Mindehhez az alábbi fő lépéseket tettük meg:

- A fágok alapszintű jellemzése: morfológia, tűréshatárok, növekedés és molekuláris jellemzés.
- A fágok gazdaspektrumának tesztelése, specificitásuk, receptoraik felderítése.
- A fágok hatásának vizsgálata biofilm-képzésre.
- Rekombináns fág-enzimek kifejezése és azok jellemzése; A *K. pneumoniae* tokja ellen depolimeráz-, illetve a *S. aureus* sejtfala ellen lizinek expressziója.
- A fágok és a rekombináns enzimek együttes hatásának vizsgálata.

1. Bakteriofágok izolálása, tisztítása

A fágok izolálása hagyományos módszerrel történt (Twist & Kropinski, 2009), a Klebsiella fágok (B1, 731) esetében szennyvízmintákból (2016 tavaszán, pellérdi szennyvíztelep, Baranya), míg a Staphylococcus fágokat (A1, R4) lovardából származó talajmintából (alom, homok) izoláltuk. A B1 és 731 Klebsiella fágok gazdatörzsei a K2 toktípusú *K. pneumoniae* 52145, ill. a tokmutáns 52145- Δwca_{K2} , az A1 és R4 Staphylococcus fágok gazdatörzsei a *S. aureus* JSNZ és a 06-01019 számú MRSA törzs voltak. A kívánt fágok jelenlétét és aktivitását a szuszpenzió titrálásával és a hígítások gazdabaktériumgyeprre történő kicseppentésével detektáltuk (spot test), ahol a fág aktivitást a gyeperen látható feltisztulás mutatta. A szuszpenzió tartalmának egyféle fág-klónból származó fágokra való redukálásának érdekében a fág-klónokat agar ráöntéssel szétválasztottuk, a gyepről kivágott individuális plakkokat a gazdatörzssel ko-inkubáltuk, majd megtisztítottuk (centrifugálás, kloroform-kezelés).

2. Morfológiai vizsgálatok

A fágok transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képeihez a mintákat JEM-1200EX II (JEOL USA Inc., Peabody, MA, USA) típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk meg a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában. Az individuális plakk-morfológiákat minden fág esetében agar kiöntéssel vizsgáltuk meg a saját gazdatörzszükön.

3. Növekedési jellemzők vizsgálata

A fág-növekedési görbe elkészítéséhez és a replikációs ciklus, vagy más néven kitörési méret („burst size”) meghatározásához egy korábban leírt módszert alkalmaztunk, akárcsak a fágok adszorpciójának méréséhez (D’Andrea *et al.*, 2017). A fág-fertőzés és az első utód-fágpartikulumok megjelenése közti időt nevezzük látenciaidőnek. A kitörési méretet (burst size) a plató fázis alatti fág-részecskék száma és a kezdeti fertőzött baktériumsejtszám hányadosa adja meg.

4. Fág DNS kivonás, génszekvencia és bioinformatikai analízis

A fágok DNS-ét 10^8 - 10^9 PFU/ml titerű fág-szuszenziókból nyertük ki, saját protokollunkat alkalmazva. A fág DNS-ek szekvenálása az Enviroinvest Zrt. (Pécs) laborjában történt.

A nyers nukleotid-szekvenciák alapján különböző online felületeken annotáltuk, alapszinten elemeztük a genomokat, illetve homológiákat kerestünk és filogenetikai elemzést végeztünk.

5. Ellenállóképesség tesztelése

Tűrészatárai vizsgálatához a fágok különböző fizikai-kémiai kondícióknak lettek kitéve.

Hőtűrés vizsgálatához a tömény fáguszuszpenziókat különböző hőmérsékleteken inkubáltuk. Detergens-tűrés esetében a fágok különböző detergensbe kerültek. A vizsgált detergens a

következők voltak: Tween 80, Tween 20, Triton X-100, 10% SDS.

6. Gazdaspektrum és rezisztencia vizsgálat, fág-receptorok feltérképezése

A fágok gazdaspektrumát a tömény szuszpenziók (10^9 PFU/ml) kicseppentésével teszteltük, összesen 105 *K. pneumoniae*, ill. 166 *S. aureus* izolátumon. Azokon, melyeken az adott fág hatékonynak bizonyult, részletesebb, szélesztési hatékonyság-mérést is végeztünk (EOP=efficiency of plating).

Hogy a rezisztens kolóniák *K. pneumoniae* mivoltáról bizonyosságot nyerjünk, a kolóniákat, MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry) (Vitek MS, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, France) segítségével fajszinten meghatároztuk (Maasz *et al.*, 2020). A rezisztencia-nyerés módjának meghatározásához egy korábban jegyzett módszert alkalmaztunk (D'Andrea *et al.*, 2014).

Az 52145 *K. pneumoniae* mutánsok LPS-CPS mennyiségi arányának vizsgálatához LPS izolálást végeztünk, melyet a protokoll végén egydimenziós fehérje gél-elektroforézissel (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) detektáltuk. A gélt ezüst-nitrát festéssel kezeltük.

7. Biofilmképzés és biofilm-eradikáló tulajdonságok vizsgálata

Biofilmek felnövesztése, biofilm festése, fágok hatása a biofilmre: Mind a *K. pneumoniae* mind a *S. aureus* törzsek esetében 96-lyukú szövettenyésztő polisztirol lemezeken (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) teszteltük a biofilmképzés meglétét/hiányát. Ennek során a baktériumokból először ON kultúrát növesztettünk, a biofilmet PBS-sel mostunk és 2% formalinnal fixáltuk, majd kristályibolyával festettük meg. Az optikai denzitást (OD) ELISA olvasóval detektáltuk ($\lambda=595$ nm).

A fágok hatását a különböző törzsekből származó biofilmre a következőképpen vizsgáltuk: a szövettenyésztő lemezen felnövesztett törzseket különböző hosszúságú inkubáció után PBS-sel mostuk, majd a lyukakhoz 100-200 μ l tömény, vagy hígított fágot adtunk, majd ON inkubáció után a lemezt a fent írt módon festettük meg.

Biofilmre adaptált A1 fág (A1-BA) létrehozása: A *S. aureus* biofilmre nagyobb eredménnyel ható A1 klónok propagálásához, jó biofilmképző tulajdonsága miatt az 53. izolátumot használtuk. Az OD és a PFU alapján hatékonynak mutató fág-klónt 6-lyukú szövettenyésztő lemezen propagáltuk fel a saját gazdatörzsén, több ciklusban. Ily módon jött létre a biofilm-adaptált A1-BA fág. Az A1 fágot az összehasonlító kísérletekben ezután A1-E (eredeti) névvel illettük.

A két fág-változatot több módszerrel is összehasonlítottuk. Konfokális lézer scanning mikroszkópia (CLSM) és Scanning elektronmikroszkópia (SEM) segítségével kvalitatívan és kvantitatívan is meghatároztuk a biofilm-eradikálás mértékét a két fág esetében, illetve a fent leírt módokon összevetettük gazdaspektrumukat és hőtüreési paramétereiket is.

8. Rekombináns fág-enzimek előállítása és tesztelése

A Klebsiella és Staphylococcus fágok egyes baktérium-degradáló enzimjeit rekombinánsan akartuk

kifejezni. A B1 *Klebsiella* fág esetében a K2 tok-specifikus tok-depolimerázt, a 731 esetében két feltételezett depolimerázt, míg az A1 *Staphylococcus* fág egy-egy sejtfal-bontó enzimét, egy endolizint és egy VAL-t választottunk ki.

A kiválasztott fehérjék homológiáinak keresését, konzervált régióik predikcióit, 3D modellezését, másodlagos struktúrájuk predikcióját elvégeztük. A fág DNS templátként használva a kiválasztott géneket amplifikálva, azokat klónoztuk majd expressziós vektor segítségével kifejeztük. A kifejezett fehérjéket polihisztidin-tag alapú affinitás kromatográfiával tisztítottuk ki, a hatékonyabb kimutathatóság érdekében a fehérjéket koncentráltuk. A fehérjék jelenlétét SDS-gélen mutattuk ki. Az elválasztás után a fehérje sávokat Coomassie Brilliant Blue vagy ezüst-nitrát festéssel tettük láthatóvá. Az expresszált és kinyert fehérjék enzimatis aktivitását kicseppentéssel vizsgáltuk meg a különböző törzseken, tömény, ill. felező-hígításos formában.

A B1dep depolimeráz hatásának gélen történő kimutatásához a *Klebsiella* törzsek tok poliszacharidjait (CPS) izoláltuk a forró víz-fenol kivonás módszerrel, két korábban leírt protokollt is alkalmazva (Hsieh *et al.*, 2017; Dunstan *et al.*, 2021). A mintákat ezután ON vagy 1 órán át 37°C-on különböző mennyiségű depolimerázzal kezeltük, majd SDS-gélen futtattuk.

9. *In vivo* kísérletek: orrkolonizációs egérmodell, B1 fág rescue

Az *in vivo* kísérletek korábban leírt metódus alapján történtek (Horváth *et al.*, 2020), kisebb módosításokkal. Az állatokat a FELASA (European Federation for Laboratory Animal Science Associations) előírásai szerint gondoztuk és kezeltük, és minden folyamatot a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélye alapján végeztünk (engedélyszám: BA02/2000-37/2015). A kísérletekhez 6-7 hetes (16-22 g) BALB/c egereket használtunk. Az egereket COMBO oldattal altattuk (1:1:0,015 v/v/v fiziológiás sóoldat/calypsol (Richter Gedeon, Budapest)/2% Primazin (Alfasan, Woerden, Hollandia)). Hét csoport *K. pneumoniae* 52145 WT kezelést kapott, orrba történő fecskendezéssel. Hat csoportot B1 faggal is kezeltünk, különböző időpontokban, a baktériummal fertőzés előtt vagy után. Egy csoport, mely fágot nem kapott, pozitív kontrollként szolgált. Az egerek általános jellemzőit (testtömegét, vitalitását) és túlélését 16 napig monitoroztuk. A kísérlet végén a szerveket feldolgoztuk, majd megmértünk a baktérium és a fág jelenlétét.

EREDMÉNYEK

I. A Klebsiella fágok jellemzése

1. A B1 és 731-es Klebsiella fágok általános jellemzői

A B1 és a 731 fág is egy-egy, $\approx 50-60$ nm átmérőjű feji, és egy hosszú, hajlékony, $\approx 150-200$ nm hosszú farki résszel rendelkező fág, ezek a korábbi morfológiai alapú rendszertanban a *Siphoviridae* család tagjaira jellemző bélyegek. A *Klebsiella* fágok 1,5-2,5 mm átmérőjű, elkülönült plakkokat képeznek a gazdabaktériumuk gyepén. A B1 esetében az 52145 WT gyepen képződő, tiszta plakkokat relatíve nagy, 6-10 mm átmérőjű, félig-átlátszó feltisztulási udvar, ún. halo zóna veszi körbe ON 37°C inkubáció után, mely a plakkokkal ellentétben egyre növekszik, kellő idő után akár kiterjedve az egész táptalaj területére. Ezen a területen a baktériumgyep lízise nem történik meg, csupán a bakteriális tok bontása, amit a virionokról leszakadó, vagy eleve szolubilis, az agarban szabadon diffundáló tok depolimeráz enzimek végeznek. Ez a jelenség a B1 tok depolimeráz aktivitását mutatja. A 731 52145- Δwca_{K2} gyepen képzett plakkjai körül hónapokig tartó tárolást követően (4°C) sem figyeltünk meg halo zónát, mivel itt a baktérium eleve nem is rendelkezik tokkal. A 731 fág a K33 szerotípusú tokkal bíró 53.8-as baktérium gyepén sem mutatott halo-jelenséget, jóllehet, itt a plakkok sokkal kisebbek, 0,2–0,5 mm-esek voltak.

A látenciaidő és a kitörési méret (burst size) meghatározásának érdekében a két fágot saját gazdabaktériumaikon propagáltuk és ún. egy lépéses növekedési görbét (one-step growth curve) vettünk fel. A görbe minden esetben három fázisú lett, egy látencia, egy logaritmusos (növekedési) és egy nyugvó (plató) szakasszal. Ezek, és a kitörési méret pontosabb értékei az irodalomban fellelhető *Klebsiella* fágok jellemző értékeivel jórészt egybeesnek. Érdekes kiemelni, hogy a 731 fág esetében a tok nélküli gazdabaktériumon a növekedési szakasz kevésbé bizonyult dinamikusnak, mint a K33 tokkal bíró 538 törzs esetében, ez utóbbinál a burst size azonban kétszer akkora volt. A fágok adszorpciója a vizsgált törzseken 97-99%-nál nagyobbak mutatkozott.

A fágjellemzés elengedhetetlen része a genetikai elemzés, melyből az adott fágról szinte a legtöbbet tudhatjuk meg. Mindkét fág dupla szálú, lineáris DNS-sel rendelkezik. A két *Klebsiella* fág DNS-e a hasítási helyek mintázata alapján nagymértékben hasonlít.

Az összes B1-gyel és 731-gyel homológ *Klebsiella* fágot mind a *Webevirus* génuszba sorolják, melyet ma a *Drexlerviridae* < *Caudoviricetes* < *Uroviricota* < *Heunggongvirae* < *Duplodnaviria* ágon lelhetjük fel (ICTV taxonomy release, 2022. március).

2. A B1 fág, a B1dep depolimeráz és a 731 fág gazdaspektruma és receptoraik

A gazdaspektrum teszteléséhez összesen 105 izolátum állt rendelkezésünkre, ezek összesen 37 különböző féle tok-szerotípussal rendelkeztek. Ez a vizsgálat a szerotípus-specifititás feltérképezése

céljából volt hasznos.

A **B1 fág**ról elmondható, hogy **szűk spektrumú**: egyedül a gazdatörzsén, az 52145 WT-n mutatott teljes feltisztulást magas hatékonysággal. A hatás változatlanul megfigyelhető volt az 52145 LPS mutánsán is, melyen szintén halo jelenséget figyelhettünk meg a tiszta plakkok körül. A többi izolátumon, melyen a B1 valamiképpen hatott, csupán halo foltot láhattunk, feltisztulás nélkül. Ez teljesen lefedte a szintén kicseppentett B1dep spektrumát. A halo folt mind a fág, mind a fehérje kicseppentésekor ugyanúgy viselkedett, mint a halo zóna, tehát idővel nőtt, hígított kicseppentés esetén kevésbé áttetsző, de még összefüggő területet alkotott.

A **731 fág** esetében, annak ellenére, hogy ezt a fágot a tokmentes 52145- Δwca_{K2} törzsön izoláltuk, **szélesebb gazdaspektrumot figyeltünk meg** a vártnál. Összesen 8 féle szerotípusra mutatott különböző mértékű hatást. Halo nélküli, tiszta feltisztulást okozott nagy hatásfokkal K21, K24 és K33. Nagy hatásfok mutatkozott a dupla mutáns 52145- $\Delta wca_{K2}\Delta waaL$ (O:-K-)-on, a tokmutánsához képest ugyanakkora PFU-val. Csekélyebb lítikus aktivitást kaptunk az alábbi szerotípusú törzseken: K11, K20, K21, K27, K27, K51 és K64. Ezen kicseppentések nyomán fátyolos feltisztulást kaptunk, mely idővel nem nőtt, hígításra pedig elkülönült plakkokat eredményezett – ez nem teljes lízist jelzett, a fágot ezen izolátumokra éppen ezért hatástalannak jegyeztük fel.

A Klebsiella fágok különböző 52145 variánsokon megfigyelhető hatásának részletesebb eredményei a rezisztencia vizsgálatához és fágreceptor-azonosításhoz voltak hasznosak.

A fágok egymás gazdatörzsén nem aktívak: a **B1 nem hatott a tokmentes mutánsra, a 731 pedig a tokos vad típusra**. Saját gazdatörzsén propagálva mindkét fág 10^9 PFU/ml titert ért el. Ez először arra engedett következtetni, hogy a tok lehetővé teszi a B1 hatását, a 731-ét viszont gátolja. A vad típuson megjelenő B1 rezisztens kolóniák MALDI-TOF MS vizsgálata alapján ezek a rezisztensek *K. pneumoniae*-k, a kiválasztott, felnövesztett 40 db B1 rezisztens kolónia mindegyike szenzitív volt a 731 fágra, ami azt jelezte, hogy ezek a rezisztenciát mind a tok elvesztésével nyerték, mely során a 731 fág membránreceptora szabadabbá vált.

A **B1 fág** azonban **aktívnek bizonyult a dupla mutáns** (O:-K-), a WT-hez képest kisebb titerrel ugyan, de teljes feltisztulást produkálva. Az adszorpció mértéke (99,0%) a WT-n megfigyelthez képest (99,2%) nem kiugróan alacsony. Ez alapján a tok nem szükséges a B1 fág megtapadásához, annak nem kizárólagos csupán másodlagos (reverzibilis) receptora, a fág elsődleges (irreverzibilis) receptora pedig a membránon található.

A négy 52145 variáns LPS izolálása során megfigyeltük, hogy a WT-hez képest a tokmutánsnál sokkal töményebbek az O-oldalláncokat jelentő sávok. Mindez a tok hiányában megnövekedett O-antigén termelést jelentheti. Az LPS mutáns (O:-K2) és dupla mutáns (O:-K-) oszlopában a narancssárga folt (O-antigén) teljesen hiányzik. A **B1 fág hatástalansága a tokmentes mutáns** (O1:K-) tehát nem a tok receptorkénti hiánya miatt lép fel, hanem feltehetően, mert a hosszú O-antigén láncok akadályként szolgálnak a fág elsődleges membránreceptorhoz tapadásához.

A B1 fágot különböző felnövesztési kondíciók (gyep és folyékony kultúra) variálásával a dupla

mutáns törzsön propagáltuk, ennek során megfigyeltük, hogy a titer a dupla mutánsra megnőtt, a feltisztulási udvar (halo) mérete, és így a depolimeráz-termelés lecsökkent. Több fág-variációt hoztunk létre, melyeket együttesen B1-dm fágoknak neveztünk el. A B1 fág összességében a vad típushoz képes jóval gyengébben képes DM folyadékkultúrában propagálódni, hacsak azt nem előzi meg DM gyepen (táptalajon) történő akklimatizációja. A B1 fágnek két plakk morfortípusa van, folyadékban és talajon is a DM a 2. plakk-formának kedvez az 1-vel szemben: ha DM kerül a rendszerbe, a 2. forma egyből átveszi az uralmat, melynek az 1. formánál nagyobb a plakkja, de kisebb a feltisztulási udvara (halo).

3. A B1 és 731 fágok tok depolimerázai

A Klebsiella fágok esetében az általunk azonosítani és kifejezni kívánt fehérjék a tok depolimerázok voltak, azzal a céllal, hogy általuk a *K. pneumoniae* egyik legfőbb virulenciafaktorát, a biofilm alkotó komponensét, a legkülső, legjelentősebb védelmi vonalat, a tokot célozzuk meg. A B1 fág depolimerázát azonosítottuk, kifejezését és a rekombináns fehérje tesztelését elvégeztük: aktivitását, gazdaspektrumát (specifitását) felderítettük. A 731 fág depolimerázának azonosítása megtörtént, ám eddig sikertelen kifejezése helyett a bioinformatikai eszközökkel jellemzett molekuláris sajátosságait, illetve a rokon fágok homológ kódoló régióinak és potenciális depolimerázainak feltérképezését közöljük részletesebben. A jövőben kívánjuk a 731 depolimerázait a B1 fágéhoz hasonlóan kifejezni és jellemezni.

A B1 fág depolimeráza. A rekombináns depolimeráz aktivitása a K2 szerotípusú tokkal bíró 52145 (WT) törzs gyepén a tok bontására korlátozódik, és az enzim önmagában nem lítikus. A tokbontó hatást az izolált K2 tokanyag (CPS) B1dep-pel kezelése során fehérje gélen is detektáltuk, ahol a depolimeráz a CPS-mennyiséget szemmel láthatóan redukálta a kontroll WT CPS-éhez képest.

Megfigyelhető volt továbbá (hosszabb inkubáció esetén) a foltok növekedése, terjedése, csakúgy, mint a halo zóna esetében. Hígítási sor kicseppentése esetén megfigyelhető volt az áttetszőség csökkenése, ill. a terjedés sebességének, mértékének visszaesése. A B1dep feltehetően egy szolubilis fehérje, mely szabadon diffundál az agarban, amire a nagyobb méretű fág-részecskék nem képesek.

A B1dep 1 napig inkubálódott 52145 WT baktériumgyepre kicseppentve hatását azonnal kifejti, és a tokot 5 percen belül szemmel láthatóan bontani kezdi szobahőmérsékleten. Ez megfigyelhető volt minden olyan izolátum gyepén, melyre a B1dep egyébként is kifejtette hatását.

A B1dep támogató hatást fejtett ki olyan fágokra nézve, melyek egyébként nem rendelkeznek megfelelő tokbontó aktivitással. Az 52145 WT gyepén a B1dep a K2 tokot lebontva halo foltokat alkot, így a 731 fág képes lesz lízist előidézni a „tokmentesített” 52145 gyepén, csakúgy, mint a K- mutáns vagy a B1 rezisztens kolóniák esetén. A B1dep támogató hatását egy másik fággal is kimutattuk: a szintén a *Webevirus* génuszba tartozó 13-as fággal, mely 40 különböző K24 tok típusú izolátumon hatott (Horváth *et al.*, 2020). Ez szintén teljes, tiszta feltisztulást produkált az 52145 gyepén a B1dep társaságában. A 731 és 13 fág aktivitása az 52145 törzsön azt jelzi, hogy „a” tok bontásával a „b” és „c” tokra specifikus depolimerázokkal bíró fágok lítikus spektruma megnövelhető „a+b+c”-re, mivel a

fágoknak egyenes út nyílik a korábban „a” tok által maszkírozott, de egyébként fogékony irreverzibilis külső membrán receptorokhoz.

A 731 fág feltételezett depolimerázai. Jelen dolgozat elkészültéig az *orf22* kifejezése nem valósult meg, ezért hiánypótlásként feltérképeztük a 731-gyel rokon fágok depolimeráz-tokspecifitás jellemzőit, hiszen a 731 polivalenciája arra engedett következtetni, hogy a fág az *orf22*-n kívül további potenciális depolimerázokkal is rendelkezik. Ezen összehasonlító elemzés során a Webvirus nemzetség több fágjában további potenciális depolimerázokat találtunk, illetve a 731 egy génjét, az *orf17*-et is annak könyveltük el.

A 731 fág egyik feltételezett depolimeráz-kódoló génje, az *orf22* 2919 bp hosszú, és egy 102,9 kDa tömegű, 972 as hosszú fehérjét kódol, mely fág farki fonál fehérjeként került annotálásra, és rendelkezik konzervált peptidáz doménnel. Az *orf17* egy 738 bp hosszú gén, mely egy 28,4 kDa tömegű, 245 as hosszú fehérjét kódol, ami rendelkezik katalitikus izopeptidáz és hidroláz aktivitású konzervált doménnel.

4. A 731 fág hatása a *K. pneumoniae* törzsek biofilmképzésére

A fágok biofilmre gyakorolt romboló hatása terápiás szempontból fontos paraméter, így feltétlenül meg kívántuk vizsgálni.

A 731-es fágnál azonban megfigyeltük, hogy a fág a K21, K24 és K33 szerotípusú törzsek biofilmjét nem degradálta szignifikánsan. A K33 törzs biofilm növekedését azonban visszafogta, csakúgy, mint az 52145 K- mutáns esetében, melynél azonban a biofilm eradikációja is számottevő.

5. A B1 fág toleranciája környezeti hatásokkal szemben

A B1 fág potenciális gyakorlati felhasználhatósága érdekében a hagyományos fágjellemzés egy további mérföldkövének számító, a fág környezeti (fizikai és kémiai) hatásoknak kitételét, tűréshatárainak vizsgálatát is elvégeztük.

A hőtűrések esetében kiderült, hogy a B1 az 50 és 60°C hőmérsékletnek 1 órán keresztül ellenáll, kiinduló titerét (10^9 PFU/ml) megtartja. Hosszú távú kísérletből láttuk, hogy a B1 fág 42 és 37°C-on fokozatos titer-esést produkált, melyet teljesen elveszített 9 hónap után. 3 év elteltével a 9 hónapig szinte változatlan 23 és -20°C-on kezelt minták titere is csökkent, míg a -80°C és 4°C változatlanul tartotta magát.

6. *In vivo* eredmények: orrkolonizációs egérmodell és fág-rescue

A B1 fág terápiás készségét egy egér orrüreg-kolonizációs egérmodellben vizsgáltuk meg. A fág hatását erősen befolyásolta a bakteriális fertőzés és a fág hozzáadása között eltelt idő.

K. pneumoniae 52145 fertőzés esetén a pozitív kontroll csoport egerei 3 napon belül elpusztultak

(LD₅₀ = 36 óra), a túlélési ráta azoknál a csoportoknál is romlott, melyekben az egyedek a fertőzés után kaptak fágot. Ezek mind elpusztultak 96 órán belül.

A B1 fággal előkezelt csoport túlélési rátája 9 nap után 100% volt, és a 13. napra 50%-ra esett. 16 nappal a bakteriális fertőzés után a két még élő egér orrürege, tüdeje, lépe, veséi és agya is viszonylag magas számú baktériumot tartalmazott. Az orrüreget az 52145 törzs kolonizálta, mely szisztémás fertőzést eredményezett, így történhetett meg, hogy a baktérium a távolabbi szervekben is jelen volt a túlélő egereknél. A feldolgozott szervekből nem tudunk aktiv fágpartikulumokat visszanyerni. Tokmentes 52145 variánsok hiánya a szervekből azt igazolta, hogy a tok elengedhetetlen a baktérium gazdaszervezeten belüli kolonizációjához és túléléséhez.

II. Staphylococcus fágok jellemzése

1. Az A1 és R4 Staphylococcus fágok általános jellemzői

Az A1 fág 150-200 nm hosszú, kontraktilis farokkal bír; ez a korábbi morfológiai alapú rendszertanban a *Myoviridae* család sajátossága volt. Feji része ikozahedrális szimmetriájú, kb. 80-90 nm átmérőjű. A fág plakkjai tiszták, 0,5-1 mm átmérőjűek, halo zóna nem figyelhető meg körülöttük. Az R4 fág a korábbi *Siphoviridae* család tulajdonságaival rendelkezik: flexibilis, nem kontraktilis, kb. 300 nm hosszú farok, 100×50 nm méretű, hosszúkás fej. Plakkjai tiszták, 0,5 mm átmérőjűek.

Az A1 esetében 20 és 30 perc között figyelhető meg kitörés, így a burst size ≈ 1000 , a látenciaidő 20 perc, a nyugó szakasz 30 perc után kezdődik.

Az A1 és az R4 fág is dupla szálú, lineáris DNS-sel rendelkezik, ám méretben eltérnek: előbbi 141 kbp, utóbbi 45 kbp hosszú (harmadakkora sincs), a kódoló régiók száma 250, ill. 69. Csupán ebből is megállapíthatjuk, hogy az A1 egy myovirus, míg az R4 egy siphovirus (II. és III. osztályú Staphylococcus fágok). A két Staphylococcus fág (A1 és R4) DNS-e a hasítási helyek mintázata alapján is jelentősen eltér. Az R4 fág genomjában a bakteriális genomba integrálódásért felelős lizogénia-modul génjei (integráz) jelen vannak, így a fág feltehetően temperált, és lizogén életciklusba léphet. Ez a Staphylococcus siphovirusokra jellemző tulajdonság, mely alapján felmerülnek kételyek a terápiás felhasználás iránt. Ezzel szemben a Staphylococcus myovirusoknak általában obligát lítikusak (virulensek) – ez alapján alkalmasabbak fágterápiás célokra. Az A1 genomjában nem találtunk integráz gént.

Az R4 fág a *Triavirus* génusz fágjaival mutatott nagyfokú rokonságot, a génusz besorolása *Duplodnaviria* › *Heunggongvirae* › *Uroviricota* › *Caudoviricetes* › *Triavirus* (ICTV 2022). Az A1 a homológiák alapján egy *Kayvirus*, besorolása: *Duplodnaviria* › *Heunggongvirae* › *Uroviricota* › *Caudoviricetes* › *Herelleviridae* › *Twortvirinae* › *Kayvirus* (ICTV 2022).

2. Az A1 és R4 Staphylococcus fágok lizinjei

A Staphylococcus fágok esetében célunk olyan fág-fehérjék kinyerése volt, melyek célzottan a

sejtfalat (peptidoglikánt) bontják, s ezzel potenciális direkt felhasználásuk esetén kívülről képesek azonnal a baktérium lízisét okozni. Az A1 két lizinje esetében a kifejezés meghiúsult (a fehérjéket a klónozás és kifejezés végén egyelőre nem sikerült detektálni). Az R4 esetében az *orf27*, az A1 esetében az *orf183* kódolt endolizint. Az A1 virion-asszociált lizinje (VAL) a genom elején található *orf4*. Mindhárom fehérjében találtunk konzervált doméneket: egy vagy több enzimatikusan aktív amidázt, illetve sejtfal-kötésért felelős doméneket. A *Staphylococcus* fág endolizinekre jellemző modularitás teljes mértékben megfigyelhető mindhárom általunk vizsgált fág-lizin esetében. Különböző hasítási helyeken aktív lizinek kombinálása és együtt alkalmazása gyakran szinergiát eredményez, a lizinek például antibiotikumokkal is kombinálhatók (Nelson *et al.*, 2012).

3. A *Staphylococcus* A1 fág biofilmre adaptálása (A1-E vs. A1-BA)

Az A1 fág esetében az egyik legfőbb célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk: kifejezetten biofilmen történő növesztése eredményez-e bármilyen jellegű különbséget a hagyományos módon propagált fág jellemzőitől, és fejleszthető/fokozható-e ilyen módon a fág biofilm-degradáló képessége. Ehhez először a megfelelő biofilmképző törzset kellett kiválasztani, majd a fág adaptálását optimalizálni, melyet az eredeti és a biofilm-adaptált fág-változat összehasonlítása követett– ezt több módszerrel is elvégeztük.

A legkézenfekvőbb biofilm-mérési módszer (kristályibolyával festés és abszorbancia mérés) viszonylagos eredménytelensége miatt annak finomítása és pontosítása helyett más, hatékonyabb módokon igyekeztünk felderíteni és reprezentálni az eredeti (A1-E) és biofilmre adaptált (A1-BA) fágok közti különbségeket. A legszembetűnőbbet a biofilm-eradikációs készségükben figyelhettük meg, melyet a konfokális lézer-scanning mikroszkópos felvételeken, és a belőlük származtatott mérési adatokban, valamint a scanning elektronmikroszkópos képeken láthattunk. Az 53. *S. aureus* biofilmje magasan struktúrált mátrix formát alkot. Az A1-BA faggal kezelt minta képe dezintegrált, szétszórt szerkezetet mutat, mely a biofilm összeomlását jelzi. Az A1-E faggal kezelt mintában a biofilm a két állapot közé tehető: a biofilm ugyan nincs annyira szétdarabolódva, aggregátumai nagyobbak, ám a kontrollhoz képest sokkal kevésbé homogén; a fág kisebb mértékű romboló hatást vált ki a biofilm-struktúrára. A SEM felvételeken azt is megfigyelhetjük, hogy a fágokkal kezelt mintákban az ép baktériumsejtek száma is sokkal kevesebb. A vizsgált paraméterek (átlagos vastagság, biomassa, maximális vastagság, biotérfogat) számszerűsítve is jól mutatják a graduális csökkenést a kontroll – A1-E – A1-BA irányban, ez pedig egyrészt mindkét fág biofilm-degradáló hatását jelzi, másrészt ennek nagyobb mértékét az A1-BA fág esetében.

A két fág közti különbség nem kifejezetten biofilmre vonatkozó, ám mégis kézenfekvő indikátora a gazdaspektrumaik vizsgálata, melyet kicseppentéssel, majd a lítikus mintázatok vizsgálatával végeztünk el. A gazdaspektrumok közti eltérésekből, az érzékeny/rezisztens törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségéből következtethettünk az A1 fág hatékonyságában bekövetkezett változásra.

A *Staphylococcus* fágok kicseppentéssel történő tesztelése során a teljes feltisztulás és a változatlan

gyep között számos átmeneti forma akadt. Ezen lítikus mintázatok, morfológiai sajátosságok standardizálásához létrehoztunk egy „kicseppentés-kategorizálási” rendszert, mely segítségével definiálni lehet a fág hatékonyságát.

Az A1-E fág a 165 db izolátumból 25-re hatékonyak (14,5%), 59-re hatástalannak (35,8%) bizonyult. A megmaradt 81 törzs ($\approx 50\%$) esetében a hatás részleges volt. Az A1-BA fág 74-re hatékonyak (44,8%), 32-re hatástalannak (19,4%) bizonyult. A megmaradt 59 törzs ($\approx 35\%$) esetében a hatás részleges volt. Ezek alapján tehát az A1-BA fág összességében hatékonyabbnak bizonyult, mert a teljes feltisztulások száma összességében nőtt, a hatástalanság száma csökkent az A1-E-hez képest.

A két gazdaspektrumot tüzetesebb vizsgálatnak vetettük alá. Külön is megvizsgáltuk az A1-E és A1-BA egyes izolátumokkal szembeni oldási (lítikus) hatékonyságát, különös tekintettel a hatékonyságok közti eltérésekre, melyeket összesítettünk. Elmondható, hogy az A1-BA fág gazdaspektrumában egyfajta eltolódás figyelhető meg, mely a nagyobb fokú feltisztulás felé mutat.

A fág robusztusságában bekövetkező változás legegyszerűbb mutatója a környezeti kondíciókkal szembeni tűréshatárok vizsgálata. A hőtürések esetében kiderült, hogy az A1-E összességében gyengébben áll ellen a különböző hőmérsékleteknek, mint az A1-BA. 2 év után a fágok teljesen elveszítik aktivitásukat minden vizsgált hőfokon. Az A1-E fágot 1 órán keresztül 60 és 50°C-on tartva kiderült, hogy ezen időablakon belül a kettő közé esik a fág toleranciája, minthogy 60°C-on a titer fokozatosan esik, míg 50°C-on változatlan marad.

A PhD munka során elért új tudományos eredmények

1. Részletes fenó- és genotípusos jellemzéssel leírtunk egy, a K2 toktípusú *K. pneumoniae* törzseken aktív, lítikus, szűk gazdaspektrumú bakteriofágot (*Webervirus B1*) továbbá egy szélesebb gazdaspektrumú, a K2 toktípusú törzsekre nem ható, lítikus bakteriofágot (*Webervirus 731*).

2. A B1 fág tok-depolimerázának szerkezetét és működését részletesen leírtuk. Megállapítottuk, hogy e depolimeráz a K2 tokkal bíró *K. pneumoniae* törzseket érzékennyé teheti további, ilyen toktípusú törzseket egyébként fertőzni képtelen bakteriofágokkal szemben is. A 731 két feltételezett depolimerázát bioinformatikai eszközökkel szintén jellemeztük.

3. A két fág és a négy 52145 variáns segítségével feltérképeztük a fágok receptorait; megmutattuk, hogy a tok egyik-másik fág esetében lehet maszkírozó vagy toborzó hatású, de a B1 fág számára nem elengedhetetlen receptor.

4. Részletes fenó- és genotípusos jellemzéssel leírtunk két, *S. aureus* törzseken aktív bakteriofágot (*Triavirus R4*, *Kayvirus A1*).

5. Fenti két *Staphylococcus* fág lizinjeit szerkezetileg részletesen jellemeztük.

6. Kísérletekkel igazoltuk, hogy a *S. aureus* biofilmről visszaizolált A1 fág (A1-BA) szélesebb gazdaspektrummal, jobb hőtüréssel és erősebb biofilm-bontó képességgel bír, mint az eredeti (A1-E).

Az eredmények azt jelzik, hogy a fágjaink, illetve a már meglévő vagy még nem kifejezett fág enzimeink ígéretesnek bizonyulnak arra, hogy a későbbiekben méltóképpen gyarapítsuk velük a napjainkban világszinten egyre színesebbé váló fág-kutatás palettáját.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Schneider Györgynek a rengeteg elméleti és gyakorlati támogatásért, és mert bevezetett ennek az érdekes témának a rejtelseibe. Továbbá munkatársaimnak: Horváth Mariannának, Kurdi-Schweitzer Bettinának, Pásztor Dorinának és Solti-Hodován Ágnesnek a sok segítségért, Dr. Kovács Tamásnak és az Enviroinvest Zrt.-nek a fág-genomok szekvenálásáért, Prof. Dr. Seress Lászlónak, Dr. Ábrahám Hajnalkának, Faragó Tündének, a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumának a TEM, Prof. Dr. Rákhely Gábornak és Sarshad Koderivalappilnak a CLSM, Szabó Péternek a SEM felvételekért, valamint a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetnek, hogy megfelelő infrastruktúrát és helyszínt biztosított a kutatásnak.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények listája

Pertics, B.Z.; Kovács, T.; Schneider, G. Characterization of a Lytic Bacteriophage and Demonstration of Its Combined Lytic Effect with a K2 Depolymerase on the Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain 52145. *Microorganisms* **2023**, *11*(3), 669. Published 2023 Mar 6. doi:10.3390/microorganisms11030669 **IF=4,5**

Pertics, B. Z.; Cox, A.; Nyúl, A.; Szamek, N.; Kovács, T.; Schneider, G. Isolation and Characterization of a Novel Lytic Bacteriophage against the K2 Capsule-Expressing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain 52145, and Identification of Its Functional Depolymerase. *Microorganisms* **2021**, *9*(3), 650. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030650> **IF=4,8**

Pertics, B. Z.; Szénásy, D.; Dunai, D.; Born, Y.; Fieseler, L.; Kovács, T.; Schneider, G. Isolation of a Novel Lytic Bacteriophage against a Nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Belonging to ST45. *BioMed research international* **2020**, *2020*, 5463801. <https://doi.org/10.1155/2020/5463801> **IF=3,4**

Egyéb publikációk listája

Schneider, G.; Schweitzer, B.; Steinbach, A.; Pertics, B.Z.; Cox, A.; Kőrösi, L. Antimicrobial Efficacy and Spectrum of Phosphorous-Fluorine Co-Doped TiO₂ Nanoparticles on the Foodborne Pathogenic Bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Typhimurium, Enterohaemorrhagic *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Foods* **2021**, *10*(8), 1786. Published 2021 Jul 31. doi:10.3390/foods10081786 **IF=5,5**

Koderi Valappil, S.; Shetty, P.; Deim, Z.; Terhes, G.; Urbán, E.; Váczi, S.; Patai, R.; Polgár, T.; Pertics, B. Z.; Schneider, G.; Kovács, T.; Rákhely, G. Survival Comes at a Cost: A Coevolution of Phage and Its Host Leads to Phage Resistance and Antibiotic Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistant Strains. *Frontiers in microbiology* **2021**, *12*, 783722. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.783722> **IF=6,06**

Kőrösi, L.; Pertics, B.; Schneider, G.; Bognár, B.; Kovács, J.; Meynen, V.; Scarpellini, A.; Pasquale, L.; Prato, M. Photocatalytic Inactivation of Plant Pathogenic Bacteria Using TiO₂ Nanoparticles Prepared Hydrothermally. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2020**, *10*(9), 1730. <https://doi.org/10.3390/nano10091730> **IF=5,02**

Kongresszusi előadások

Pertics, B. Z.; Schneider, G. Identification of the polysaccharide depolymerase of phage B1, specific for the K2 capsular type of *Klebsiella pneumoniae*. 6th Central European Forum For Microbiology, Kecskemét, 2021. 10. 14.

HIVATKOZÁSOK

- Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.M. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **2011**, *1*, 66–85.
- Archer, N. K.; Mazaitis, M. J.; Costerton, J. W.; Leid, J.G.; Powers, M.E.; Shirtliff, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* **2011**, *2*(5), 445–59.
- Blundell-Hunter, G.; Enright, M.C.; Negus, D.; Dorman, M.J.; Beecham, G.E.; Pickard, D.J.; Wintachai, P.; Voravuthikunchai, S.P.; Thomson, N.R.; Taylor, P.W. Characterisation of Bacteriophage-Encoded Depolymerases Selective for Key *Klebsiella pneumoniae* Capsular Exopolysaccharides. *Front Cell Infect Microbiol.* **2021**, *11*, 686090.
- Chambers, H. F.; Deleo, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology* **2009**, *7*(9), 629–641.
- Choi, J.H.; Seo, H.S.; Lim, S.Y.; Park, K. Cutaneous Immune Defenses Against *Staphylococcus aureus* Infections. *J Lifestyle Med.* **2014**, *4*(1), 39–46.
- Cieślak, M.; Bagińska, N.; Jończyk-Matysiak, E.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, G.; Górski, A. Temperate Bacteriophages-The Powerful Indirect Modulators of Eukaryotic Cells and Immune Functions. *Viruses* **2021**, *13*(6), 1013.
- Corsaro, M. M.; De Castro, C.; Naldi, T.; Parrilli, M.; Tomás, J. M.; Regué, M. 1H and 13C NMR characterization and secondary structure of the K2 polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* strain 52145. *Carbohydrate Research* **2013**, *340*, 2212–2217.
- D'Andrea, M. M.; Marmo, P.; Henrici De Angelis, L.; Palmieri, M.; Ciacci, N.; Di Lallo, G.; Demattè, E.; Vannuccini, E.; Lupetti, P.; Rossolini, G. M.; Thaller, M. C. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Scientific Reports* **2017**, *7*(1), 2614.
- Drulis-Kawa, Z.; Majkowska-Skrobek, G.; Maciejewska, B.; Delattre, A.; Lavigne, R. Learning from bacteriophages – advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein & Peptide Science* **2012**, *13*, 699–722.
- Dunstan, R.A.; Bamert, R.S.; Belousoff, M.J.; Short, F.L.; Barlow, C.K.; Pickard, D.J.; Wilksch, J.J.; Schittenhelm, R.B.; Strugnell, R.A.; Dougan, G.; Lithgow, T. Mechanistic Insights into the Capsule-Targeting Depolymerase from a *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage. *Microbiology spectrum* **2021**, *9*(1), e0102321.1
- Fenton, M.; Ross, P.; McAuliffe, O.; O'Mahony, J.; Coffey, A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered bugs* **2010**, *1*(1), 9–16.
- Fernandes, S.; São-José, C. Enzymes and Mechanisms Employed by Tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial Cell Barriers. *Viruses* **2018**, *10*(8), 396.
- Gutiérrez, D.; Ruas-Madiedo, P.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS One* **2014**, *9*(9), e107307.
- Haddad Kashani, H.; Schmelcher, M.; Sabzalipoor, H.; Seyed Hosseini, E.; Moniri, R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clinical microbiology reviews* **2017**, *31*(1), e00071-17.
- Horváth, M.; Kovács, T.; Koderivalappil, S.; Ábrahám, H.; Rákhely, G.; Schneider, G. Identification of a newly isolated lytic bacteriophage against K24 capsular type, carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5891.
- Hsieh, P.F.; Lin, H.H.; Lin, T.L.; Chen, Y.Y.; Wang, J.T. Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4624.
- Hsu, C. R.; Lin, T. L.; Pan, Y. J.; Hsieh, P. F.; Wang, J. T. Isolation of a Bacteriophage Specific for a New Capsular Type of *Klebsiella pneumoniae* and Characterization of Its Polysaccharide Depolymerase. *PLoS ONE* **2013**, *8*.
- Knecht, L.E.; Veljkovic, M.; Fieseler, L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. *Front Microbiol.* **2020**, *10*, 2949.
- Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews* **2018**, *31*(4), e00020-18.
- Latka, A.; Maciejewska, B.; Majkowska-Skrobek, G.; Briers, Y.; Drulis-Kawa, Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Applied microbiology and biotechnology* **2017**, *101*(8), 3103–3119.
- Liao, Y.C.; Lin, H.H.; Sabharwal, A.; Haase, E.M.; Scannapieco, F.A. MyPro: A seamless pipeline for automated prokaryotic genome assembly and annotation. *J Microbiol Methods* **2015**, *113*, 72–4.
- Lin, J. C.; Chang, F. Y.; Fung, C. P.; Xu, J. Z.; Cheng, H. P.; Wang, J. J.; Huang, L. Y.; Siu, L. K. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes and Infection* **2004**, *6*, 1191–1198.
- Lister, J. L.; Horswill, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2014**, *4*, 178.
- Loc-Carrillo, C.; Abedon, S. T. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* **2011**, *1*(2), 111–114.
- Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine* **1998**, *339*(8), 520–532.
- Maasz, G.; Zrínyi, Z.; Fodor, I.; Boross, N.; Vitál, Z.; Kánainé Sipos, D.I.; Kovács, B.; Melegh, S.; Takács, P. Testing the Applicability of MALDI-TOF MS as an Alternative Stock Identification Method in a Cryptic Species Complex. *Molecules* **2020**, *25*, 3214.
- March, C.; Cano, V.; Moranta, D.; Llobet, E.; Pérez-Gutiérrez, C.; Tomás, J. M.; Suárez, T.; Garmendia, J.; Bengoechea, J. A. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PLoS ONE* **2013**, *8*.
- Mehraj, J.; Witte, W.; Akmatov, M. K.; Layer, F.; Werner, G.; Krause, G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Current topics in microbiology and immunology* **2016**, *398*, 55–87.

- Nassif, X.; Fournier, J. M.; Arondel, J.; Sansonetti, P. J. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infection and Immunity* **1989**, *57*, 546–552.
- Nelson, D. C.; Schmelcher, M.; Rodriguez-Rubio, L.; Klumpp, J.; Pritchard, D. G.; Dong, S.; Donovan, D. M. Endolysins as antimicrobials. *Advances in Virus Research* **2012**, *83*, 299–365.
- Nobrega, F. L.; Vlot, M.; de Jonge, P. A.; Dreesens, L. L.; Beaumont, H. J. E.; Lavigne, R.; Dutilh, B. E.; Brouns, S. J. J. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology* **2018**, *16*, 760–773.
- Oliveira, H.; São-José, C.; Azeredo, J. Phage-Derived Peptidoglycan Degrading Enzymes: Challenges and Future Prospects for In Vivo Therapy. *Viruses* **2018**, *10*(6), 292.
- Paczosa, M. K.; Meccas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2016**, *80*, 629–661.
- Parasion, S.; Kwiatek, M.; Gryko, R.; Mizak, L.; Malm, A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology* **2014**, *63*, 137–145.
- Pires, D. P.; Oliveira, H.; Melo, L. D. R.; Sillankorva, S.; Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, *100*, 2141–2151.
- Podschun, R.; Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews* **1998**, *11*, 589–603.
- Roach, D.R.; Donovan, D.M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* **2015**, *5*, e1062590.
- Rodríguez-Rubio, L.; Martínez, B.; Donovan, D. M.; Rodríguez, A.; García, P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzymotics. *Critical reviews in microbiology* **2013**, *39*(4), 427–434.
- São-José, C. Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **2018**, *7*(2), 29.
- Schmelcher, M.; Donovan, D.M.; Loessner, M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* **2012**, *7*(10), 1147–71.
- Shon, A. S.; Bajwa, R. P. S.; Russo, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* **2013**, *4*(2), 107–108.
- Tomás, A.; Lery, L.; Regueiro, V.; Pérez-Gutiérrez, C.; Martínez, V.; Moranta, D.; Llobet, E.; González-Nicolau, M.; Insua, J. L.; Tomás, J. M. *et al.* Functional genomic screen identifies *Klebsiella pneumoniae* factors implicated in blocking nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 16678–16697.
- Twist, R.; Kropinski, A.M. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 15–21.
- Vázquez, R.; Díez-Martínez, R.; Domingo-Calap, P.; García, P.; Gutiérrez, D.; Muniesa, M.; Ruiz-Ruigómez, M.; Sanjuán, R.; Tomás, M.; Tormo-Mas, M. Á.; García, P. Essential Topics for the Regulatory Consideration of Phages as Clinically Valuable Therapeutic Agents: A Perspective from Spain. *Microorganisms* **2022**, *10*(4), 717.
- Weidenmaier, C.; Goerke, C.; Wolz, C. *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends in microbiology* **2012**, *20*(5), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.004>
- Yan, J.; Mao, J.; Xie, J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs* **2014**, *28*, 265–274.