

Doktori értekezés tézisei

**Egy új diagnosztikai eljárás kifejlesztése
bakteriális kórokozók kimutatására
rekombináns bakteriofágok segítségével**

**Development of a novel diagnostic method to
detect bacterial pathogens using recombinant
bacteriophages**

Avramucz Ákos

Témavezető:

Dr. Fehér Tamás tudományos főmunkatárs

**Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori
Iskola**

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémiai intézet

Bevezetés

Az antibiotikumok hatékonyságának csökkenése, valamint a molekuláris biológia eszköztárának gyors fejlődése a bakteriofágkutatás reneszánszát hozta el. Noha kis méretük miatt csupán 1915 óta tudunk a fágok létezéséről, azonban minden jel arra utal, hogy egyszerre, vagy közel egy időben jöttek létre az első élő sejtekkel, ami egy évmilliárdok óta tartó evolúciós kölcsönhatást vázol fel. A baktériumok védekezése elsősorban a vírusok által felismert és azok kikötődésére szolgáló sejtfelszíni struktúrák megváltozásán alapult. Az egymástól elkülönült fejlődési pályára került baktériumfajok végsősoron nagymértékben specializálódott bakteriofágokat eredményeztek. A fágterápia nagyszabású áttörése még várat magára, azonban az egyszerűbb engedélyeztetési folyamat miatt a nem terápiás célú felhasználás is reflektorfénybe került.

A közelmúlt globális egészségügyi kríziseiből levonható egyik legfontosabb tanulság, hogy szükség van egy felhasználóbarát, gyors és olcsó diagnosztikus tesztre, mellyel felmérhető a krízis súlyossága és

terjedési dinamikája. A bakteriofág-alapú diagnosztikus eljárások ideális jelöltek a probléma megoldására. A bakteriofágok könnyen, olcsón és gyorsan előállíthatóak, ellenállóak a biológiai mintákra jellemző szennyeződésekkel szemben és - a megfelelő faj kiválasztásával - beállítható a specificitásuk. A korábban leírt fág-alapú diagnosztikus eljárások többféle megközelítést alkalmaznak. Az egyik ezek közül a genetikailag módosított vírusok használata, melyek specificitásuktól függően csak a célbaktérium jelenlétében képeznek valamilyen mérhető jelet a bakteriális bioszintetikus masinéria felhasználásával. Jelen munka témája egy bakteriofágokon alapuló innovatív diagnosztikus rendszer kifejlesztése.

Célkitűzés

Ebben a munkában olyan fágalapú diagnosztikai eljárást kívántunk kifejleszteni, mely a célbaktériumok rekombináns fágok általi *in vitro* fertőzése során keletkező fény detekcióján alapul. Szemben a szakirodalomban eddig leírtakkal, célunk egy olyan új rendszer kiépítése volt, amely nem igényli a fényemittáló fehérjét kódoló gén kifejeződését, hanem közvetlenül a fehérje injektálását detektálja. Az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

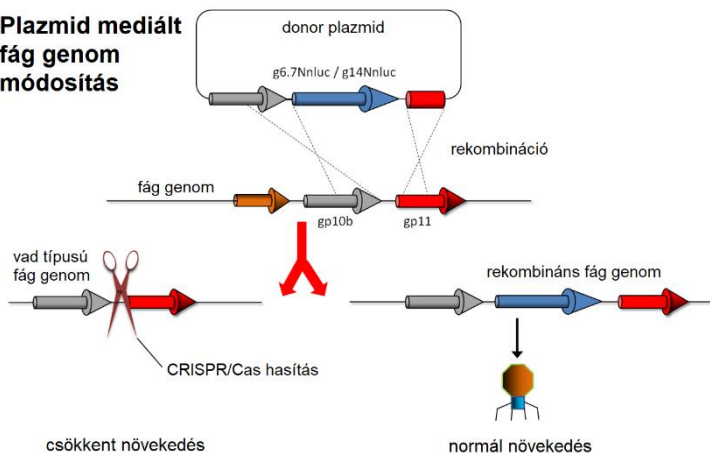
1. Létrehozható-e olyan stabil bakteriofág, amely a kapszidjába képes csomagolni egy lumineszcens fehérjét?
2. Lehet-e a fágból a célbaktériumba injektált lumineszcens fehérjével detektálható mértékű fényt generálni a baktériumsejt fertőzése közben?
3. Kialakítható-e egy diagnosztikai modell eljárás, mely a fenti mechanizmus útján szelektíven képes jelezni egy adott baktériumtörzs jelenlétét más törzsekkel szemben?

Alkalmazott módszerek

Rekombináns bakteriofágok előállítása

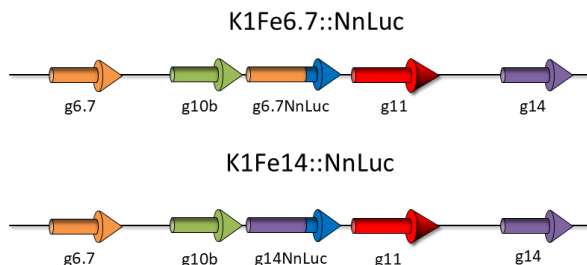
A felvázolt diagnosztikus rendszer központi eleme a lumineszcens fehérjét hordozó bakteriofág. Mivel nem ismert fágspecifikus szignálszekvencia, úgy döntöttünk, hogy két, a kapszidban hordozott, majd a rendes fertőzés során az örökítőanyagot megelőzően beinjektálódó internális kapszid fehérjéhez fuzionáljuk a nanoluciferáz riportergén N-terminálisát (NnLuc). A K1F bakteriofágtörzsből kiindulva, plazmid mediált fággenom módosítással hoztuk létre a rekombináns K1Fg6.7::NnLuc és K1Fg14::NnLuc törzseket. Ehhez a vad típusú vírustörzset donorplazmidokat tartalmazó EV36 céltörzsön növesztettük, melyek a megfelelő homológiaboxok ölelésében tartalmazták a fúziós génkazettát. A fertőzés során ritka eseményként lejátszódó homológ rekombináció a kazettát egy semleges lókuszbába építette be, így az adott internális kapszid fehérjék génjeinek duplikációját létrehozva.

Plazmid mediált fág genom módosítás



A duplikáció biztosítja, hogy az egyébként esszenciális gének az eredeti funkciójuk esetleges elvesztése esetén sem lehetetlenítik el a rekombináns törzsek létrehozását. A rekombináns fágok szelekciójához a további növesztési ciklusok során Cas9 endonukleázt alkalmaztunk. Ez egy olyan, a vad típusú fág-genomban megtalálható szekvencia mentén hasított, amely a rekombináns fágokból hiányzott, így az utóbbiakat végül két tiszta rekombináns, és egyébként stabil vonal formájában izolálhattuk.

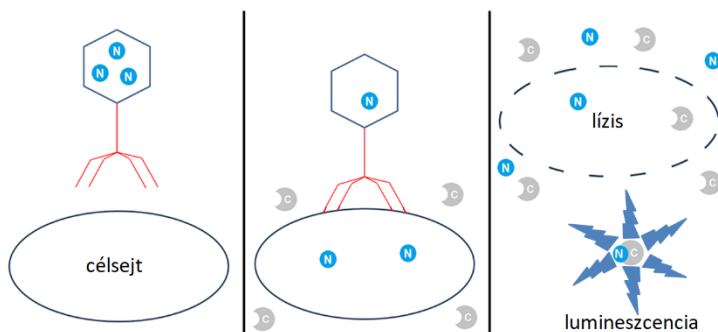
A két rekombináns fág e munkában érintett génjeinek sémás térképe



A lumineszcencia feltételeinek biztosítása

A lumineszcencia létrejöttéhez természetesen biztosítani kell a C-terminális nanoluciferáz fragmenst (CnLuc), mely oldatban spontán módon kapcsolódik az N-terminálishoz és funkcionális enzimet hoz létre. A kísérletek során kétféle módon vittük be a C-terminálist: a koncepcióigazoló *in vivo* kísérletekben a bakteriális sejteken belül, plazmidról kifejeztetve, az *in vitro*- és a diagnosztikus modell kísérletekben kívülről hozzáadva. Ezutóbbi esetben szintén plazmidról fejeztettük ki a fehérjefragmenst BL21 törzsben, majd vagy a feltárt sejtek felülúszóját, vagy a felülúszóból tisztított és koncentrált enzimtöredéket a mintához adva.

A modell diagnosztikai rendszer kísérleti elrendezése



A lumineszcencia létrejöttéhez továbbá szükséges egy specifikus, baktériumokban rendszerint nem fellelhető szubsztrát, a furimazin. A szubsztrát biztosítása érdekében egy kereskedelmi lumineszcencia kitet alkalmaztunk, a Promega NanoGlo-t, mely egyúttal a sejtek gyors feltárását is elvégezte.

Lumineszcencia mérés

A lumineszcencia mérések során minden esetben 100 µl mintát egyesítettünk 100 µl előkészített Promega NanoGlo reagenssel egy-egy lyukban egy 96-lyukú lemezen. A minta tartalmazta a sejteket, a bakteriofágokat és adott esetben a kívülről hozzáadott C-terminális nanoluciferáz fragmenst. A leolvasás minden alkalommal

közvetlenül a reagens mintához keverése után történt egy Synergy leolvasóberendezésben.

Eredmények összefoglalása

1. Lumineszcens fehérjéket hordozó bakteriofág törzsek előállítás

Bemutattuk, hogy a nanoluciferáz enzim N-terminális fragmense (NnLuc) a megfelelő tervezéssel fuzionálható a K1F fág g6.7 vagy g14 génjeihez, azok duplikációit létrehozva. Bebizonyosodott, hogy a létrehozott két bakteriofágtörzs szekvenciája a tervezetteknek megfelelően létrejött és hogy ezek a rekombináns törzsek szelekció nélkül is stabilan fenntarthatóak.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a rekombináns fúziós fehérjék kapszidba történő becsomagolódását, egy *in vitro* tesztet használtunk, melynek lényege, hogy a bakteriofágok kellően magas hőmérsékleten hőinaktiválhatóak, aminek következtében a kapszid alegységek elválnak egymástól, és a fágfejben

található, egyébként elszigetelt fehérjék oldatba kerülnek. Az *in vitro* kísérletek során bebizonyítottuk, hogy a fúziós fehérjék becsomagolódnak a fágkapszidba a rendes, batch alapú virionszaporítás során. Bemutattuk, hogy a becsomagolt N-terminális nanoluciferáz enzimtöredék hőkezelés hatására, célsejt jelenléte nélkül is felszabadítható, majd a C-terminális nanoluciferáz alegység és a specifikus furimazin szubsztrát hozzáadásával mérhető lumineszcens jelet ad, igazolva a fúziós fehérje enzimatiszus aktivitását.

2. Lumineszcens fehérje injekció célsejtekbe

Az *in vivo* kísérletekben CnLuc-ot expresszáló bakteriális sejteket fertőztünk NnLuc-ot hordozó rekombináns bakteriofágokkal. A fő kérdés az volt, hogy fágfertőzés során képes-e a rekombináns fág a fúziós fehérjét a baktériumsejtbe injektálni oly mennyiségben, hogy az detektálható mértékű fényt generálhasson. Ezek a kísérletek egyúttal igazolták a rendszer szelektivitását, mivel csak a K1 kapszulával rendelkező célsejtek adtak mérhető lumineszcens jelet, miközben a K5 kapszulával burkolt nem-célsejtek a háttértől megkülönböztethetetlen

jelet mutattak. Kinetikai, valamint transzkripció- és translációgátlás mellett mért lumineszcencia-adatokkal is alátámasztottuk, hogy a célsejt jelenlétében a fággenomon hordozott transzgének kifejeződése nélkül, csupán a kapszidból injektált enzimtöredék is képes jelet adni, bizonyítva az eredeti felvetést.

3. Diagnosztikus modell eljárás fejlesztése

Felállítottunk egy valós szituációt modellező diagnosztikus rendszert, melyben kimutattuk, hogy a valós körülményekhez hasonló kísérleti elrendezésben, vad típusú sejtek rekombináns fágokkal való fertőzésekor is keletkezik könnyen kimutatható, erős lumineszcens jel. Elvégeztük a diagnosztikus rendszer kezdeti optimalizációját, ami így megbízhatóan képes különbséget tenni az K1-kapszulát kifejező, és nem kifejező baktériumtörzsek között. Jellemeztük továbbá a módszerünk érzékenységét egy gyors, mindössze 8 perces reakcióban (2.3×10^6 CFU/ml), majd ezt gyakorlati példákkal és az egyéb fág-alapú diagnosztikus rendszerekhez történő összehasonlítással perspektívába helyeztük. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy az

eljárás piaci érdeklődésre tarthat számot. Végül bemutattuk elképzeléseinket az általunk kifejlesztett rekombináns bakteriofágokon alapuló diagnosztikum további fejlesztési lehetőségeiről és távlati koncepcióiról.

Summary

Rapid diagnosis of infections is of paramount importance in the prevention or control of pandemics. None of the established methods can simultaneously fulfill the requirements for rapid, easy-to-use, specific, and inexpensive diagnostics. In recent decades increasing scientific attention has turned toward bacteriophages which can serve as diagnostic tools where one can rely on the speed, specificity and efficiency of phage-cell interactions. One approach involves leveraging phage infection to amplify the signal with the phage-derived expression of reporter genes. In this study, we investigated the bypassing of gene expression by directly detecting the injection of the reporter.

We chose the bacteriophage K1F, which infects K1 *E. coli* strains, as our model system and the cleaved nanoluciferase protein as the reporter. We demonstrated that the gene encoding the N-terminal fragment of this enzyme can be fused to the g6.7 or g14 genes of the K1F phage, creating duplications. We confirmed that the two bacteriophage strains are stable and can be maintained without selection.

In vitro experiments showed that the fusion proteins are packaged into the phage capsid during assembly and verified that the enzymatic activity of the fusion protein is retained.

In vivo experiments provided kinetic, transcriptional, and translational evidence that the N-terminal fragment injected from the capsid is sufficient to generate a signal, if the C-terminal fragment and the substrate are provided. Here, we also demonstrated the selectivity of the system: only K1 target cells produced measurable luminescence, while non-target cells showed a baseline signal.

In a model diagnostic setup, we demonstrated that a strong luminescent signal is generated when wild-type cells are infected with recombinant phages, with the system being able to distinguish between cognate and non-cognate strains. We then characterized the sensitivity of our approach and outlined directions for further development.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10081639

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény:

Shukla RD, Zvara Á, **Avramucz Á**, Biketova AY,
Nyerges A, Puskás LG, Fehér T. inPOSE: A Flexible
Toolbox for Chromosomal Cloning and Amplification of
Bacterial Transgenes. Microorganisms. 2022 Jan
21;10(2):236. doi: 10.3390/microorganisms10020236.
PMID: 35208691; PMCID: PMC8875745.

IF: 4.5

Avramucz Á, Møller-Olsen C, Grigonyte AM,
Paramalingam Y, Millard A, Sagona AP, Fehér T.
Analysing Parallel Strategies to Alter the Host Specificity
of Bacteriophage T7. Biology (Basel). 2021 Jun
20;10(6):556. doi: 10.3390/biology10060556. PMID:
34202963; PMCID: PMC8234382.

IF: 5.079

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem Avramucz Ákos PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „Egy új diagnosztikai eljárás kifejlesztése bakteriális kórokozók kimutatására rekombináns bakteriofágok segítségével” című disszertációját.

Felelős szerzőként kijelentem, hogy Avramucz Ákos jelentősen hozzájárult az alább felsorolt, a doktori eljárás alapjául szolgáló tudományos publikációk eredményéhez:

1. Shukla RD, Zvara Á, **Avramucz Á**, Biketova AY, Nyerges A, Puskás LG, Fehér T. inPOSE: A Flexible Toolbox for Chromosomal Cloning and Amplification of Bacterial Transgenes. *Microorganisms*. 2022 Jan 21;10(2):236. doi: 10.3390/microorganisms10020236. PMID: 35208691; PMCID: PMC8875745.

2. **Avramucz Á**, Møller-Olsen C, Grigonyte AM, Paramalingam Y, Millard A, Sagona AP, Fehér T. Analysing Parallel Strategies to Alter the Host Specificity of Bacteriophage T7. *Biology (Basel)*. 2021 Jun 20;10(6):556. doi: 10.3390/biology10060556. PMID: 34202963; PMCID: PMC8234382.

Igazolom továbbá, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2025. október 29.

.....

Dr. Fehér Tamás