



# VEROCYTOTOXIN-PRODUCERENDE BAKTERIOFAGER I E. COLI

Specialeprojekt i Biologi-bioteknologi, KU

Patricia Espenhain Sørensen

13. juni 2017



## Verocytotoxin-producerende *E. coli* (VTEC) / (STEC)

- Vigtig fødevarebåren human patogen → DK: 190, WW: 265.000
- Varierende alvorlighed manifestationer: (Blodigt) diarre + følgesygdomme: Hæmolytisk Uræmisk Syndrom (HUS)
- Stort arsenal of virulensfaktorer; *vtx* (+ *eae*)

## Verocytotoksin (VT) familien

- *vtx* gener båret af VT-bakteriofager (fager).
- To grupper: VT1 and VT2
- Signifikante forskelle i biologisk aktivitet → subtyper and varianter

## VT-fag identifikation og bestemmelse af biologiske egenskaber

- Forståelse af forskelle i VT-fag virulens
- Undgå induktioner af fager

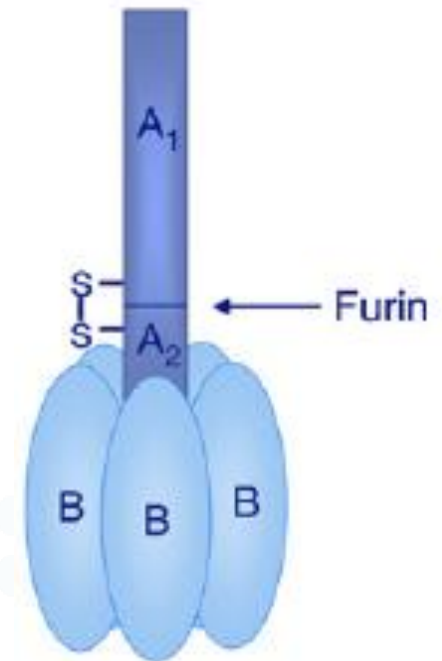
*At bestemme hvilke VT fager (og vtx gener) der oftest findes hos danske patienter med VTEC-infektion og at studere disse fagers biologiske egenskaber og forskelle – hvilket inkluderer VT toksicitet, induktion af lytisk cyklus, transfektion samt overlevelse af inficerede bakterier.*

- Kombination af *in silico*, *in vitro* and *in vivo* eksperimenter



## Verocytotoxin (VT)

- Subunit-struktur: AB<sub>5</sub> toksin
- Operon-struktur: *vtxA*, *spacer*, *vtxB*
- Binding til specifikke glykolipidreceptorer
  - B subunit = genkendelse + binding
  - A subunit = Internalisering + spaltning/aktivering
  - A<sub>1</sub>: ribosom binding → Ødelægger proteinsyntese
- Cytotoksicitet: Vero Celler



Modent holotoxin

## VT klassificering

- VT1: Næsten identisk med Stx (prototype; *Shigella dysenteriae*)
- VT2: Genetisk og immunologisk forskellig (55-60% identitet) + heterogen
- 10 Subtypes: Holotoksin proteiner
- Varianter: Aminosyreforskelle

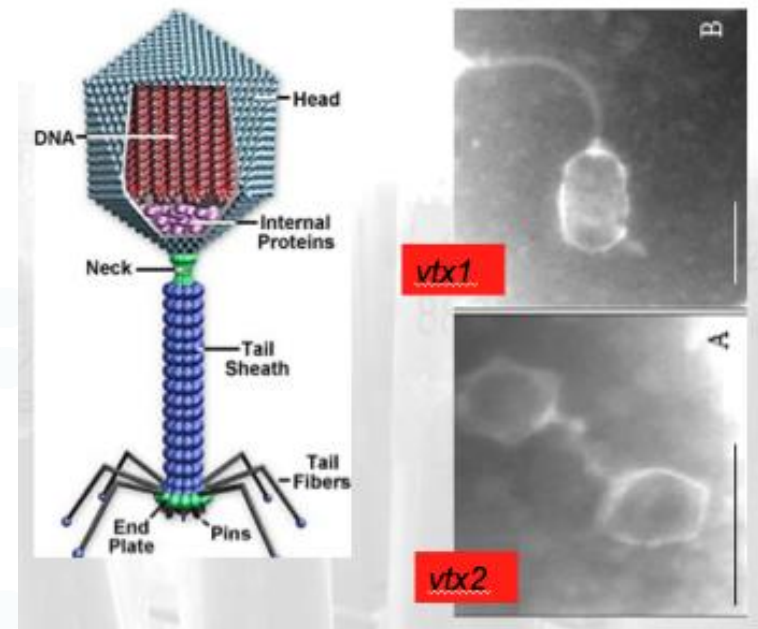
Toxin subtype	A subunit nucleotides (Amino acids)	Intergenic region No. of nucleotides sequence	B subunit nucleotides (Amino acids)
<i>stx</i> , <i>stx</i> <sub>1a</sub> & <i>stx</i> <sub>1d</sub>	948 (315)	9 gggggtaaa	270 (89)
<i>stx</i> <sub>1c</sub>	948 (315)	10 gggggtaaa <sup>a</sup>	270 (89)
<i>stx</i> <sub>2a</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub> & <i>stx</i> <sub>2d</sub> <sup>b</sup>	960 (319)	11 aggagtaagY <sup>c</sup> agtgataagc <sup>d</sup>	270 (89)
<i>stx</i> <sub>2b</sub>	960 (319)	12 caggagttaaat <sup>e</sup> ctggagttaaat <sup>f</sup> cgggagttaaat <sup>g</sup>	264 (87)
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	960 (319)	12 aaggagtaaga	264 (87)
<i>stx</i> <sub>2f</sub>	960 (319)	12 caggggtgaat	264 (87)
<i>stx</i> <sub>2g</sub>	960 (319)	12 aaggagtaagc <sup>h</sup> aaggagtaagt <sup>i</sup>	270 (89)

*stx* = *vtx*

Reference: Scheutz et al. 2012

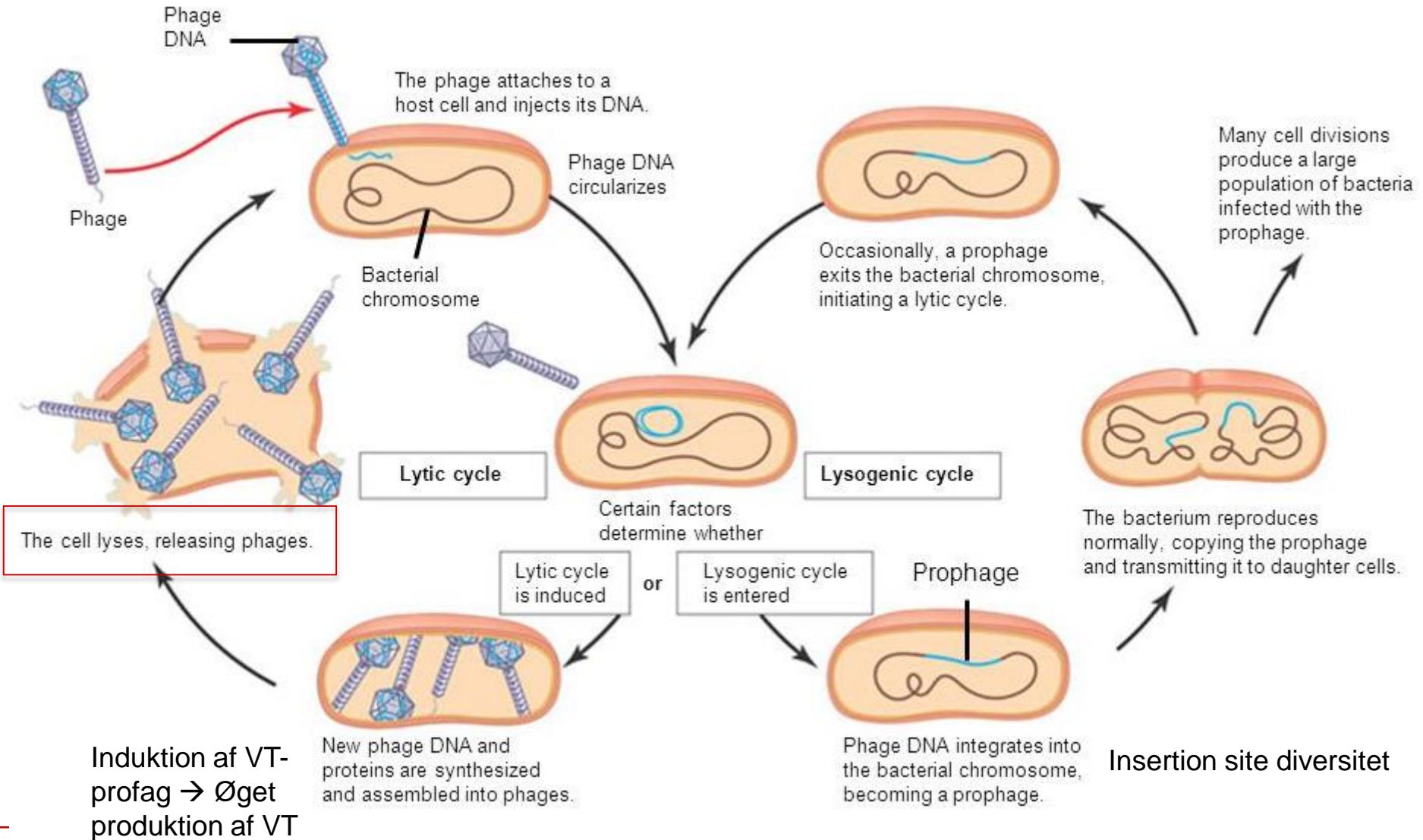
## VTEC-fager

- Bakteriofag = virus der inficerer bakterier
- VT-fager = fager der bærer et *vtx* gene/operon
- Lambdoid bakteriofagfamilie
- Mosaicisme
  - Genetisk + morfologisk
  - Rekombination
- Genetisk *vtx* reservoir



Reference: Maite Muniesa

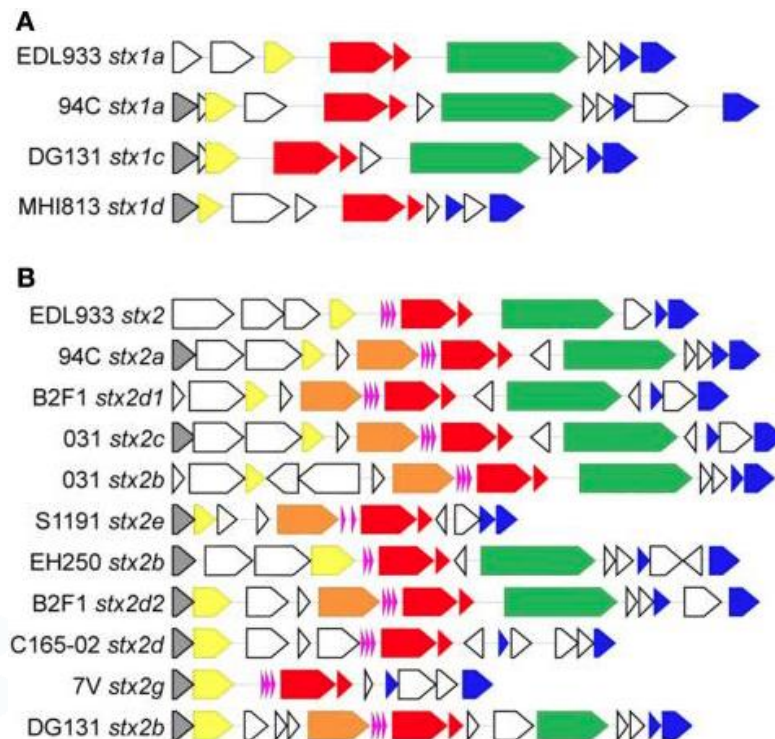
## Den lytiske og lysogene cyklus for temperate VT-fager



## VT fager og Q antiterminator

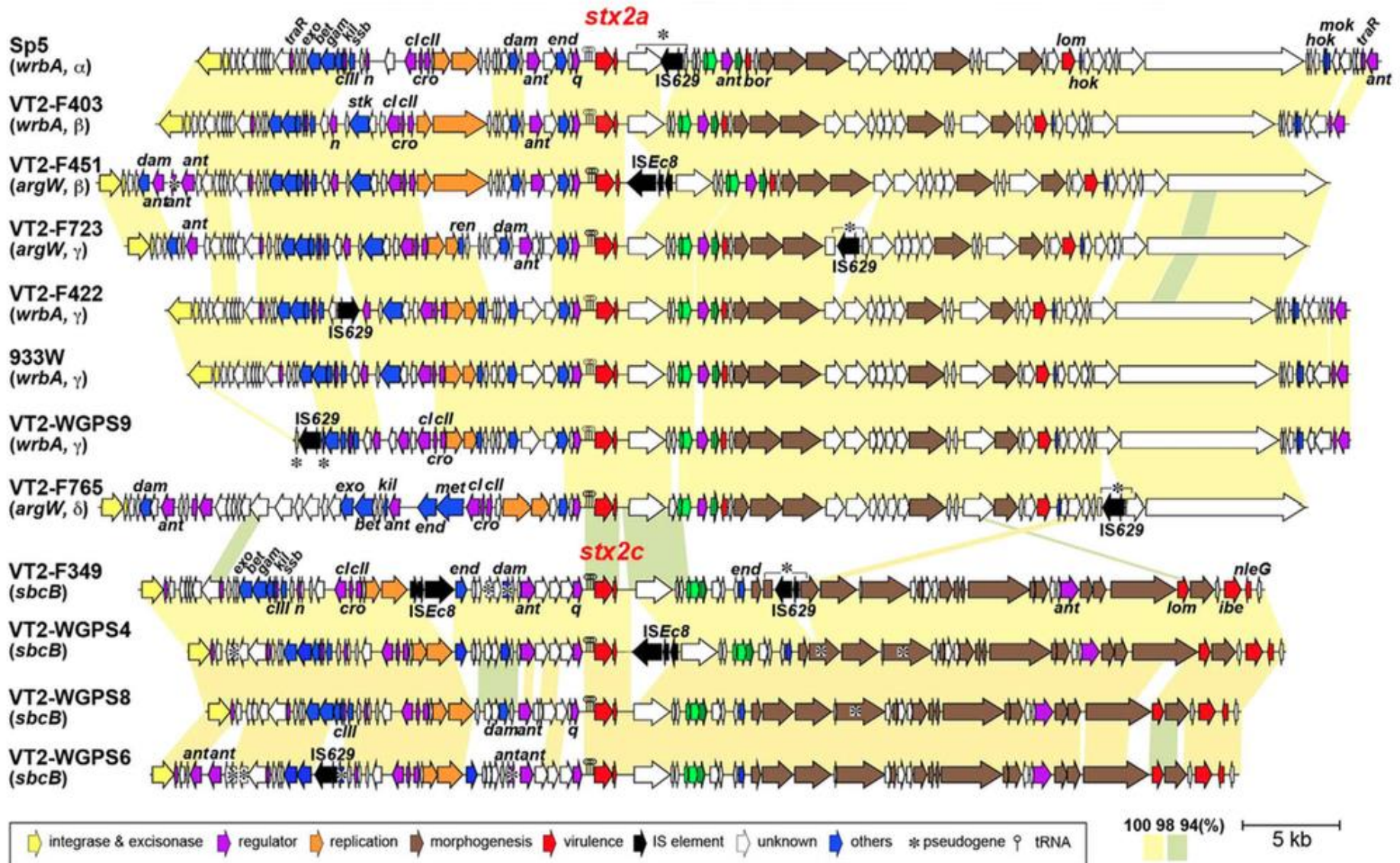
- Transcriptional antiterminator
- Kontrollere expression af late fag gener
- Placeret upstream for *vtx* gener
- → Kontrollerer VT-ekspression

Figur: Q = gul, *vtx* = rød



Reference: Steyert et al. 2012 - Gene organization comparisons





Reference: Ogura et al. 2015 – Gene comparison of Stx2 phages of O157

## WGS / BioNumerics (BN)

- VTEC hel-genoms sekvensering (WGS) sekvenser fra SSI database
  - 2015-2017
- References sekvenser: from Scheutz et al. 2012
- Sequence extraction tool → comparison tool
  - Ekstraher *vtx* gen sekvenser fra the genom-sekvenserne lagret i *de novo*-sekvensforsøgstypen



## vtx subtype - overview

Stx	No. of sequences
Stx1	251
Stx2	268

Stx1 subtypes	No. of sequences
Stx1a	195
Stx1c	50
Stx1d	6

Stx2 subtypes	No. of sequences
Stx2a	63
Stx2b	106
Stx2c	51
Stx2d	7
Stx2e	2
Stx2f	30
Stx2g	9

Antal sekvenser i alt = **401**

VT1 + VT2 = 519 sekvenser

→ Difference = 118 med vtx1;vtx2

Stx = VT

*vtx1d, vtx2d, vtx2e, vtx2f, and vtx2g*: For få sekvenser → ingen videre undersøgelse

## Excel Pivottabel: Eksempel – Data extraction fra BioNumerics, Stx1c

|

Serotype - Fir	vtx_sub_ir	MLST ST	EAE_inSilico	Total
O128:H2	vtx1c	25 -		2
	vtx1c; vtx2	25 -		5
		811 -		1
		4748 -		4

Selektionskriterier for repræsentanter:

Mest prevalente

- Serotyper (ikke O157 → USA)
- vtx kombination
- eae
- (MLST ST)

## VT1a

- 195 sekvenser
- 3 dominerende serotyper: O157, O117 og O103 (65.5%)
- *eae* +/- = 76% / 24%
- *vtx1a* / *vtx1a+vtx2* = 58.5% / 41.5%

## VT1c

- 50 sekvenser
- Ingen dominerende serotyper + ingen O157
- *eae* +/- = 0% / 100%
- *vtx1c* / *vtx1c + vtx2b* = 38% / 62%

## VT2a

- 60 sekvenser
- 2 dominerende serotyper: O157 + O26 (+ O121)
- eae +/- = 87% / 13%
- vtx2a / vtx1a + vtx2a = 58% / 42%
- Stammer fra tilfælde med HUS + non-HUS

## VT2b

- 97 sekvenser
- 2 dominerende serotyper: O27 + O146 (ingen O157)
- eae +/- = 0% / 100%
- vtx2b / vtx1 + vtx2b = 59% / 41%

## VT2c

- 48 sekvenser
- Dominerende serotype: O157 (96%)
- eae +/- = 100% / 0%
- vtx2c / vtx1a + vtx2c = 86% / 24%



VT	Dominerende serotype(r)	eae (%)	vtx (%)	vtx1;vtx2 kombinationer
VT1a	+	+ (76)	vtx1a (58)	4
VT1c	-	- (100)	vtx1c + vtx2b (62)	1
VT2a	+	+ (87)	Vtx2a (58)	1
VT2b	+	- (100)	vtx2b (59)	2
VT2c	+	+ (100)	vtx2c (86)	1

Generelt: 1 MLST ST = 1 serotype

## *In vitro* – Vero Celle Assay (VCA)

- Kvantificering af VT-produktionen/toksicitet
- Test så meget som muligt (+/- antibiotika)

## *In silico* - Yderligere karakterisering

- BN: Q anti-terminator varianter
- PHAST/PHASTER: Bacteriophages (in *vtx* contigs)



## *In vivo* – Dyremodeller (mus)

- VT1a, VT2a and VT2b → Solide/gyldige resultater
- Kun stammer med 1 *vtx* variant → simplificer eksperimentet
- Hvordan opfører fagerne sig? → *in vitro* vs. *in vivo*



Tak for opmærksomheden!

