

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

lek. wet. Magdalena Gonet

**Ocena stabilności, podatności na proteolizę oraz efektu
enteropatogennego enterotoksyn SEC i SEL
Staphylococcus aureus oraz *Staphylococcus epidermidis***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Higieny Żywności
i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Promotor:
prof. dr hab. Jacek Bania
Promotor pomocniczy:
dr inż. Justyna Schubert

WROCŁAW 2023

*Panu prof. dr hab. Jackowi Bani, mojemu Promotorowi
składam serdeczne podziękowania za pomoc, życzliwość, cierpliwość,
wrozumiałość, ogromne wsparcie i pomoc przy tworzeniu niniejszej pracy.*

*Szczególnie dziękuję mojej Promotor pomocniczej dr inż. Justynie Schubert
za pomoc, cenne wskazówki oraz przyjacielskie wsparcie podczas realizacji
badań.*

*Bardzo dziękuję Panu dr hab. Danielowi Krowarschowi za poświęcony czas,
przekazaną wiedzę oraz pomoc podczas badań z zakresu stabilności białek.*

*Również dołączam podziękowania Koleżankom i Kolegom
z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
za wspólnie spędzone lata w tak milej, życzliwej oraz przyjacielskiej atmosferze.*

Część wyników zawartych w tej pracy została opublikowana w następujących artykułach:

Aleksandra Tabiś, **Magdalena Gonet**, Justyna Schubert, Arkadiusz Miązek, Marcin Nowak, Alicja Tomaszek, Jacek Bania. Analysis of enterotoxigenic effect of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* enterotoxins C and L on mice. *Microbiol. Res.* 2022, 258, 126979. DOI:10.1016/j.micres.2022.126979.

Magdalena Gonet, Daniel Krowarsch, Justyna Schubert, Aleksandra Tabiś, Jacek Bania. Stability and resistance to proteolysis of enterotoxins SEC and SEL produced by *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2023, 20, 32-37. DOI: 10.1089/fpd.2022.0059.

Praca została wykonana w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr 2017/27/B/NZ7/00715:

Ocena stabilności i aktywności wymiotnej enterotoksyn gronkowców koagulazoujemnych. Ocena zagrożenia bezpieczeństwa żywności.

Spis treści

Wykaz skrótów użytych w monografii	6
Streszczenie	7
Abstract	9
1. Wstęp.....	11
1.1. Charakterystyka i występowanie bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i>	11
1.2. Chorobotwórczość bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i>	12
1.3. Enterotoksyny <i>S. aureus</i> i ich aktywność biologiczna	13
1.4. Enterotoksyny gronkowców koagulazoujemnych.....	16
1.5. Stabilność enterotoksyn gronkowcowych	18
2. Cel pracy	20
3. Materiały i metody	22
3.1. Materiały.....	22
3.1.1. Szczepy bakterii	22
3.1.2. Podłoża mikrobiologiczne.....	22
3.1.3. Białka rekombinowane.....	22
3.1.4. Zestawy analityczne i odczynniki	22
3.1.5. Aparatura	23
3.1.6. Szczep myszy	24
3.1.7. Zgoda Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.....	24
3.1.8. Oprogramowanie	24
3.2. Metody.....	25
3.2.1. Wytworzenie rekombinowanych enterotoksyn SEC i SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i>	25
3.2.2. Ograniczona proteoliza enterotoksyn SEC i SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> przy użyciu pepsyny i tripsyny.....	27
3.2.3. Określenie stabilności chemicznej oraz termicznej enterotoksyn SEC i SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i>	28
3.2.4. Badanie efektu enteropatogennego enterotoksyn SEC i SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> w modelu myszy domowej.....	29
3.2.5. Histopatologiczne badanie jelita myszy po dożołądkowym podaniu enterotoksyn SEC i SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i>	29
3.2.6. Analiza morfometryczna	30
3.2.7. Statystyczna analiza danych.....	30

4.	Wyniki.....	31
4.1.	Ograniczona proteoliza enterotoksyn SEC i SEL <i>S. aureus</i> oraz <i>S. epidermidis</i> przy użyciu pepsyny i trypsyny.....	31
4.2.	Ocena zawartości II-rzędowych struktur białkowych w enterotoksynach SEC i SEL <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	36
4.3.	Ocena stabilności termicznej i chemicznej enterotoksyn SEC i SEL <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>	37
4.4.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEC i SEL <i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i> myszom na podstawowe parametry fizjologiczne.....	41
4.5.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEC <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> na wybrane parametry morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego myszy po 4 godzinach od podania enterotoksyn.....	42
4.6.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEC <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> na wybrane parametry morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego myszy po 24 godzinach od podania enterotoksyn.....	44
4.7.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEC <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> na wybrane parametry morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego myszy po 48 godzinach od podania enterotoksyn.....	47
4.8.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> na wybrane parametry morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego myszy po 4 godzinach od podania enterotoksyn.....	49
4.9.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> na wybrane parametry morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego myszy po 24 godzinach od podania enterotoksyn.....	51
4.10.	Wpływ dożołądkowego podania enterotoksyn SEL <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> na wybrane parametry morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego myszy po 48 godzinach od podania enterotoksyn.....	53
5.	Dyskusja.....	56
6.	Wnioski.....	63
7.	Wykaz literatury.....	64

Wykaz użytych skrótów

A ₀	intensywność początkowa prążków odpowiadających enterotoksynom
BCA	kwask bicinchoninowy
BSA	albumina surowicy bydłowej
CD	dichroizm kołowy
CoNS	gronkowce koagulazoujemne (ang. <i>coagulase-negative staphylococci</i>)
CoPS	gronkowce koagulazododatnie (ang. <i>coagulase-positive staphylococci</i>)
F(t)	zmiana intensywności prążków odpowiadającym niestrawionym proteolitycznie enterotoksynom w czasie (t).
GdmCl	chlorowodorek guanidyny
GdmCl _{1/2}	wartość przejścia denaturacyjnego
k	szybkość proteolizy
m	kooperatywność denaturacji chemicznej
MHC II	główny układ zgodności tkankowej II (ang. <i>major histocompatibility complex II</i>)
p	wartość prawdopodobieństwa
PAS	barwienie histologiczne z wykorzystaniem kwasu nadjodowego (ang. <i>periodic acid Schiff</i>)
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PIC	mieszanina inhibitorów proteinaz (ang. <i>Protease Inhibitor Cocktail</i>)
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS
SEI SAGs	superantygeny podobne do enterotoksyn (ang. <i>Staphylococcal Enterotoxin-like Superantigens</i>)
SEM	błąd standardowy średniej (ang. <i>Standard Error of the Mean</i>)
SePI	wyspa patogenności <i>S. epidermidis</i> (ang. <i>Staphylococcus epidermidis Pathogenicity Island</i>)
SEs	enterotoksyny gronkowcowe (ang. <i>Staphylococcal Enterotoxins</i>)
SFP	gronkowcowe zatrucie pokarmowe (ang. <i>staphylococcal food poisoning</i>)
SPF	wolne od specyficznych patogenów (ang. <i>specific pathogen free</i>)
t _{1/2}	czas połowicznej proteolizy enterotoksyn
TCR	receptor limfocyту T (ang. <i>T-cell receptor</i>)
TSST-1	toksyna wstrząsu toksycznego 1 (ang. <i>toxic shock syndrome toxin-1</i>)
UE	Unia Europejska
ΔG_{den}	entalpia swobodna denaturacji
ΔH_{den}	entalpia denaturacji

Streszczenie

Enterotoksyny wytwarzane przez *Staphylococcus aureus* należącego do grupy gronkowców koagulazododatnich, uważane są obecnie za jedyne czynniki gronkowcowych zatruc pokarmowych, co znajduje odzwierciedlenie w regulacjach prawnych dotyczących bezpieczeństwa żywności. Stwierdzono jednak, że gronkowce koagulazoujemne również mogą posiadać geny enterotoksyn i ekspresjonować je w żywności. Analiza sekwencji genomów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* wykazała, że jedynym gatunkiem gronkowców koagulazoujemnych posiadającym geny enterotoksyn jest *Staphylococcus epidermidis*, a jedynymi genami enterotoksyn, które posiada są *sec_{epi}* oraz *sel_{epi}*, kodujące enterotoksyny SEC_{epi} oraz SEL_{epi}. Białka te są ortologiami enterotoksyn SEC oraz SEL *S. aureus*. Sekwencje SEC_{epi} oraz SEL_{epi} różnią się od ortologicznych enterotoksyn *S. aureus*. Biorąc pod uwagę różnice w sekwencjach aminokwasowych enterotoksyn SEC i SEL pomiędzy *S. epidermidis* i *S. aureus* założono, że białka mogą mieć różne właściwości wynikające z możliwych różnic w strukturze, a co za tym idzie mogą mieć różny wpływ na bezpieczeństwo żywności. W pracy porównano wybrane właściwości SEC_{epi} wytwarzanej przez *S. epidermidis* z najbliższym, pod względem podobieństwa sekwencji, ortologiem *S. aureus*, tj. SEC₃ i odległym ortologiem, tj. SEC_{bov}, a także SEL_{epi} wytwarzanej przez *S. epidermidis* z SEL wytwarzaną przez *S. aureus*. Enterotoksyny oceniano pod względem podatności na proteolizę z udziałem pepsyny i trypsyny, stabilności termicznej i chemicznej określonej za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego oraz fluorymetrii i właściwości enteropatogennych po dożołądkowym podaniu enterotoksyn w modelu myszy domowej. Wykazano, że enterotoksyny SEC_{epi} i SEL_{epi} *S. epidermidis* oraz ortologiczne enterotoksyny SEC₃, SEC_{bov} i SEL *S. aureus* wykazują niską podatność na proteolizę z udziałem pepsyny i trypsyny. Badane enterotoksyny SEC i SEL *S. epidermidis* oraz ortologiczne enterotoksyny *S. aureus* cechują się wysoką stabilnością termiczną i chemiczną. Wskazuje to, że enterotoksyny *S. epidermidis* mogą przetrwać warunki spotykane w przewodzie pokarmowym człowieka oraz warunki spotykane w trakcie obróbki termicznej żywności w podobnym stopniu jak enterotoksyny *S. aureus*. Wykazano też, że enterotoksyny SEC są bardziej termostabilne niż SEL. Dlatego w żywności przetworzonej termicznie SEC mogą stanowić większe zagrożenie niż SEL. Wykazano różnice w kooperatywności denaturacji chemicznej enterotoksyn SEC i SEL. Różnice te mogą wpływać na szybkość odzyskiwania natywnej konformacji białek po denaturacji, wpływając na aktywność biologiczną enterotoksyn SEC i SEL w organizmie człowieka. Dożołądkowe podanie enterotoksyn SEC_{epi} i SEL_{epi}

S. epidermidis podobnie jak podanie enterotoksyn SEC₃ i SEL*S. aureus* wywołało szereg zmian histopatologicznych w jelicie myszy. Wskazuje to, że enterotoksyny *S. epidermidis* mogą wywoływać zmiany enteropatogenne w przewodzie pokarmowym w podobnym stopniu jak enterotoksyny *S. aureus*. Uzyskane wyniki wskazują, że ze względu na wysoką stabilność termiczną i chemiczną oraz niską podatność na proteolizę i potwierdzone właściwości enteropatogenne w modelu myszy, enterotoksyny wytwarzane w żywności przez *S. epidermidis* mogą stanowić zagrożenie bezpieczeństwa żywności porównywalne z zagrożeniem stwarzanym przez enterotoksyny *S. aureus*.

Słowa kluczowe: enterotoksyny gronkowcowe, *S. aureus*, *S. epidermidis*, gronkowce koagulazo-ujemne, stabilność białek, ograniczona proteoliza, model myszy, histopatologia.

Abstract

Enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus*, which belongs to the group of coagulase - positive staphylococci, are considered to be the only factors of staphylococcal food poisoning, what is reflected in the legal regulations on food safety. However, it has been found that coagulase-negative staphylococci may also carry enterotoxin genes and express them in food. Analysis of the genome sequences of bacteria from *Staphylococcus* genus showed that the only species of coagulase-negative staphylococci harboring the enterotoxin genes is *Staphylococcus epidermidis*, and the only enterotoxin genes it possesses are *sec_{epi}* and *sel_{epi}*, encoding enterotoxins SEC_{epi} and SEL_{epi}. These proteins are orthologs of *S. aureus* enterotoxins SEC and SEL. The SEC_{epi} and SEL_{epi} sequences differ from orthologous *S. aureus* enterotoxins. Taking into account the differences in the amino acid sequences of SEC and SEL enterotoxins between *S. epidermidis* and *S. aureus*, it was assumed that these proteins may have different properties resulting from possible differences in their structure, and thus may have a different impact on food safety. To prove this assumption, a selected properties of SEC_{epi} produced by *S. epidermidis* were compared with the closest, in terms of sequence similarity, *S. aureus* ortholog, i.e., SEC₃ and a distant ortholog, i.e., SEC_{bov}, then SEL_{epi} produced by *S. epidermidis* was compared with SEL produced by *S. aureus*. Enterotoxins were evaluated for susceptibility to proteolysis by pepsin and trypsin, thermal and chemical stability determined by circular dichroism spectroscopy, and fluorimetry, then enteropathogenic properties of enterotoxins were assessed after their intragastric administration in a mouse model. It was shown that *S. epidermidis* SEC_{epi} and SEL_{epi} and orthologous *S. aureus* SEC₃, SEC_{bov} and SEL enterotoxins exhibit low susceptibility to proteolysis with pepsin and trypsin. The tested *S. epidermidis* SEC and SEL enterotoxins and orthologous *S. aureus* enterotoxins were highly thermostable also exhibiting high chemical stability. This indicates that *S. epidermidis* enterotoxins can resist the conditions encountered in the human digestive tract and the conditions encountered during thermal food processing to a similar extent as *S. aureus* enterotoxins. It has also been shown that SEC-type enterotoxins are more thermostable than SEL, thus, in thermally processed foods, SEC may pose a greater risk than SEL. Differences in the chemical denaturation cooperativity of SEC and SEL have been demonstrated. These differences may affect the rate of recovery of the native conformation of proteins following denaturation, and impact the biological activity of SEC and SEL in the human body. Intragastric administration of *S. epidermidis* SEC_{epi} and SEL_{epi}, similarly to the *S. aureus* SEC₃ and SEL, induced a number of histopathological changes in the mouse intestine. This indicates that *S. epidermidis* enterotoxins may cause

enteropathogenic changes in the gastrointestinal tract to a similar extent as *S. aureus* enterotoxins. The obtained results indicate that due to the high thermal, chemical stability and low susceptibility to proteolysis as well as confirmed enteropathogenic properties in the mouse model, enterotoxins produced in food by *S. epidermidis* may pose a threat to food safety comparable to the risk posed by *S. aureus* enterotoxins.

Keywords: staphylococcal enterotoxins, *S. aureus*, *S. epidermidis*, Coagulase-negative staphylococci (CoNS), protein stability, limited proteolysis, mice model, histopathology.