

Mechanizmy kontroli ekspresji genów w regulacji rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych

Sylwia Bloch

Bakteriofagi lambdoidalne to grupa wirusów bakteryjnych, zaliczanych do rodziny *Siphoviridae*, których najlepiej poznanym przedstawicielem jest bakteriofag λ , modelowy organizm w biologii molekularnej. Fagi te wykazują podobieństwo w budowie strukturalnej wirionu, organizacji genomu oraz w przebiegu cyklu życiowego. Bakteriofagi lambdoidalne odgrywają istotną rolę w procesie zmienności genetycznej gospodarza, prowadzącym m.in. do selekcji nowych wirulentnych szczepów bakteryjnych. Przykładem takich bakterii są patogenne szczepy *Escherichia coli* produkujące toksyny Shiga (STEC, ang. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*). Toksyny te są głównymi czynnikami zjadliwości bakterii STEC, natomiast kodujące je geny (*stx*) zlokalizowane są w genomach fagów lambdoidalnych, tzw. fagów Stx, występujących w bakteriach w postaci profagów.

Bakterie STEC są przyczyną wielu zatruc pokarmowych. W przypadku dzieci i osób starszych istnieje podwyższone ryzyko wystąpienia tego typu infekcji. Głównym rezerwuarem tych bakterii jest przede wszystkim bydło, a także inne zwierzęta domowe. Człowiek najczęściej zakaża się poprzez spożycie zanieczyszczonej żywności (wołowina, warzywa, owoce) lub wypicie skażonej wody oraz niepasteryzowanego mleka. Istotny z epidemiologicznego punktu widzenia problem związany ze szczepami STEC wynika z szerokiego spektrum ich różnorodności fenotypowej oraz trudności diagnostycznych. Konsekwencją horyzontalnego transferu genów jest wymiana informacji genetycznej pomiędzy bakteriami i tworzenie nowych, a zarazem nietypowych szczepów bakteryjnych. Interesującym przykładem nowopowstałego szczepu są bakterie *E. coli* O104:H4 zdolne do produkcji toksyn Shiga i odpowiedzialne za wybuch epidemii w Niemczech (w maju 2011 roku), która swoim zasięgiem objęła cały świat. W wyniku tej epidemii odnotowano ponad 4000 zachorowań, w tym ponad 830 przypadków z powikłaniami w postaci zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) oraz 54 zgony (problem ten omówiony jest w pracy [1] z cyklu publikacji składających się na tę rozprawę doktorską).

Zarówno bakteriofag λ , jak i fagi Stx zaliczane są do tzw. fagów łagodnych, które charakteryzuje możliwość rozwoju zarówno lizogenicznego, jak i litycznego. Decyzja o wyborze jednej z dwóch alternatywnych dróg rozwojowych w dużej mierze zależy od warunków środowiskowych oraz stanu fizjologicznego komórki bakteryjnej. Podczas rozwoju lizogenicznego dochodzi do integracji genomu faga z chromosomem gospodarza, a faza ta

określana jest jako stadium profaga. Na tym etapie materiał genetyczny wirusa ulega replikacji wraz z DNA komórki bakteryjnej, a ekspresja większości fagowych genów jest zahamowana. Na poziomie molekularnym za zjawisko to odpowiedzialne jest białko cI (represor faga λ), które wiążąc się do sekwencji operatorowych prowadzi do zahamowania procesu transkrypcji z wczesnych promotorów p_L i p_R . Stan lizogenii jest etapem przejściowym w rozwoju faga, gdyż na skutek pojawienia się niekorzystnych dla komórki warunków rozwojowych następuje indukcja profaga i rozpoczęcie przez faga cyklu litycznego. Dochodzi wówczas do wycięcia fagowego DNA, replikacji materiału genetycznego jako niezależnego, pozachromosomowego elementu genetycznego oraz syntezy białek regulatorowych i strukturalnych, kodowanych przez geny zlokalizowane w genomie bakteriofaga. W konsekwencji tego procesu powstają potomne cząstki fagowe, które w wyniku lizy komórki gospodarza zostają uwolnione na zewnątrz.

Zdarzeniem warunkującym przejście faga z rozwoju lizogenicznego w cykl lityczny jest etap indukcji profaga, zachodzący w odpowiedzi na pojawienie się sygnałów bakteryjnej odpowiedzi SOS, świadczących o uszkodzeniu DNA komórki gospodarza. Na poziomie molekularnym dochodzi wówczas do autoproteolizy fagowego białka cI, stymulowanej przez bakteryjne białko RecA. W wyniku tego procesu, białko cI nie jest w stanie dłużej pełnić funkcji represora. Dochodzi zatem do odblokowania promotorów p_L i p_R , ekspresji fagowych genów, a w konsekwencji do wycięcia profaga z genomu bakteryjnego i zapoczątkowania cyklu litycznego. Proces indukcji profagów lambdoidalnych może zostać wymuszony przez szereg czynników, takich jak niskie pH, jony metali ciężkich, promieniowanie UV, antybiotyki oraz nadtlenuk wodoru.

Ze względu na fakt, że geny *stx* zlokalizowane są w rejonie genów późnych genomu faga (pod kontrolą promotora p_R), ich efektywna ekspresja następuje wyłącznie po indukcji profaga i rozpoczęciu przez niego cyklu litycznego. Dochodzi wówczas do produkcji dużej ilości toksyn Shiga, które w wyniku lizy komórki bakteryjnej pojawiają się w jelitach człowieka, gdzie atakują komórki nabłonka. W wyniku działania toksyn następuje zahamowanie syntezy białek, a w konsekwencji obumieranie komórek eukariotycznych. W rezultacie pierwszym objawem infekcji STEC jest krwawa biegunka, jednak często dochodzi do powikłań i rozwoju schorzeń, takich jak np. zespół hemolityczno-mocznicowy.

W świetle powyższych doniesień, szczegółowe wyjaśnienie procesów regulacji ekspresji genów, zachodzących podczas rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych, wydaje się być kluczowe dla zrozumienia podstaw patogenności bakterii STEC, a także w przyszłości może przyczynić się do opracowania alternatywnych terapii zwalczania tego typu infekcji.

Celem mojej pracy było zatem poznanie specyficznych mechanizmów kontrolujących ekspresję genów podczas rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych.

Obiektem moich badań stały się bakteriofagi: λ , jako modelowy organizm w biologii molekularnej oraz $\Phi24_B$, przedstawiciel fagów Stx. Wyboru tego dokonałam celem sprawdzenia, czy przynależność ww. fagów do grupy bakteriofagów lambdoidalnych sprawia, że wykazują one podobieństwo nie tylko w organizacji genomu, ale także na poziomie podstawowych procesów regulujących ich cykl życiowy.

W pierwszym etapie pracy sprawdziłam, czy rodzaj induktora ma wpływ na przebieg indukcji profagów lambdoidalnych, a co za tym idzie na regulację ekspresji genów podczas rozwoju litycznego fagów λ oraz $\Phi24_B$. W swoich badaniach zastosowałam antybiotyki, mitomycynę C, a także nadtlenek wodoru, powodujące uszkodzenia w DNA. W przeciwieństwie do mitomycyny C, nadtlenek wodoru uważany jest za naturalny czynnik wymuszający indukcję fagów Stx podczas zakażeń bakteryjnych przewodu pokarmowego człowieka. Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań nad pierwotniakiem z rodzaju *Tetrahymena* oraz komórkami neutrofilami, które uwalniają nadtlenek wodoru w wyniku kontaktu z bakteriami STEC, czego konsekwencją jest produkcja toksyn Shiga.

Badania rozpoczęłam od wyselekcjonowania fagowych genów do analiz z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Oprócz genów kodujących białka kluczowe w rozwoju fagów lambdoidalnych, moje zainteresowanie wzbudziły także geny i otwarte ramki odczytu, których funkcja nie została dotychczas dokładnie poznana, w szczególności te zlokalizowane w rejonie *exo-xis* (pomiędzy genami *exo* i *xis*) w genomach analizowanych fagów. W obrębie rejonu *exo-xis* faga λ zidentyfikowano dwa geny: *ea22* oraz *ea8.5* oraz pięć otwartych ramek odczytu (ORF): *orf60a*, *orf63*, *orf61*, *orf73* i *orf55*, z których cztery: *orf60a*, *orf63*, *orf61* oraz *orf73*, charakteryzują się wysoko zakonserwowaną wśród przebadanych fagów lambdoidalnych sekwencją nukleotydową. W przeciwieństwie do bakteriofaga λ , rejon *exo-xis* faga $\Phi24_B$, zawiera dodatkowe ORF i pozbawiony jest homologa genu *ea8.5*, który w przypadku faga λ koduje białko Ea8.5, pełniące prawdopodobnie funkcję regulatorową. Zachowana ewolucyjnie wśród fagów lambdoidalnych sekwencja zlokalizowanych w obrębie rejonu *exo-xis* otwartych ramek odczytu może świadczyć o ich istotności biologicznej, a być może nawet niezbędności w regulacji rozwoju tych fagów. Celem testowania tej hipotezy przeprowadziłam szereg doświadczeń w warunkach nadekspresji, wprowadzając do komórek bakteryjnych na plazmidach dodatkowe kopie całych rejonów *exo-xis* fagów λ albo $\Phi24_B$ (odpowiednio pGAW3775 albo pSBe.x.r. $\Phi24_B$) [2]. Z przeprowadzonych doświadczeń

wynika, iż w warunkach nadekspresji rejonów *exo-xis* faga λ oraz faga $\Phi24_B$ nastąpił wzrost liczby cząstek fagowych, a także poziomu fagowego DNA po indukcji wymuszonej zarówno mitomycyną C, jak i nadtlenkiem wodoru, z równoczesnym obniżeniem przeżywalności komórek bakteryjnych *E. coli* [3].

Mając na uwadze powyższe obserwacje postanowiłam uwzględnić geny oraz ORF z rejonów *exo-xis* fagów λ oraz $\Phi24_B$ w analizach z wykorzystaniem qRT-PCR. Zaobserwowałam, że profil ekspresji fagowych genów i ORF, zależy od rodzaju zastosowanego czynnika indukującego, mitomycyny C i nadtlenu wodoru, a także od samego faga. Wykazałam, że przypadku indukcji profaga $\Phi24_B$ mitomycyną C wysoki poziom ekspresji, zbliżony do genu *N*, osiągają homologi *orf60a*, *orf63* oraz *orf73* faga λ . W przypadku zastosowania nadtlenu wodoru odnotowałam z kolei wysoki poziom mRNA tylko dla homologów genu *ea22* oraz *orf73*. W przeciwieństwie do faga $\Phi24_B$, profil ekspresji wybranych genów oraz ORF faga λ po indukcji nadtlenkiem wodoru jest zbliżony do tego zaobserwowanego w przypadku indukcji mitomycyną C. Wyniki wskazują, iż poziom ekspresji genu *ea22* oraz wszystkich analizowanych ORF był podwyższony w stosunku do ilości mRNA genu *ea8.5*, a także genów regulatorowych *N*, *cro* oraz *Q* [3].

W świetle otrzymanych wyników nasuwa się wniosek, że pomimo wysokiego podobieństwa sekwencji w rejonie *exo-xis* badanych fagów lambdoidalnych, zaproponowanie wspólnego mechanizmu regulacji ekspresji genów podczas procesu indukcji jest niezwykle trudne i wymaga przeprowadzenia dalszych analiz. Wydaje się, iż proces ten zależy od sposobu inicjacji cyklu litycznego, a geny i ORF zlokalizowane w badanym rejonie *exo-xis* odgrywają w tym procesie znaczącą rolę [3].

Kolejnym czynnikiem, który przeanalizowałam było światło UV. Wykazałam, iż promieniowanie UV ma wpływ na stabilność wirionów fagów lambdoidalnych oraz ich zdolność do infekcji bakterii *E. coli*. Dowiodłam, iż wiriony faga $\Phi24_B$, w przeciwieństwie do faga λ , cechuje znacznie wyższy poziom wrażliwości na światło UV (w dawce 50 J/m²). Różnice te wynikają najprawdopodobniej z uszkodzeń kapsydów faga $\Phi24_B$, zaobserwowanych z wykorzystaniem technik mikroskopii elektronowej. Stosując metodę qRT-PCR wykazałam, że po infekcji bakterii *E. coli* wirionami faga $\Phi24_B$ (po ich uprzednim potraktowaniu światłem UV) poziom ekspresji genów *N* i *cro* był znacznie obniżony w porównaniu do poziomu uzyskanego w przypadku infekcji nienaświetlonymi cząstkami fagowymi. Takich zmian nie zaobserwowałam w przypadku faga λ . Uzyskane wyniki wskazują, iż mimo przynależności do tej samej grupy fagów lambdoidalnych, fagi Stx są

bardziej wrażliwe na światło UV niż fag λ , a to z kolei może mieć przełożenie na różnice w regulacji ich podstawowych procesów życiowych [4].

W następnym etapie moich badań skupiłam się na zbadaniu wpływu procesu poliadenylacji RNA na regulację ekspresji genów fagów λ oraz $\Phi24_B$, podczas ich rozwoju litycznego. W komórkach *E. coli* za proces przyłączania reszt adeniny do końca 3' cząsteczki mRNA, powodujący destabilizację transkryptu, odpowiada enzym poli(A) polimeraza I (PAP I), produkt bakteryjnego genu *pcnB*. W badaniach wykorzystywałam szczep *E. coli* MG1655 $\Delta pcnB::kan$, niezdolny do syntezy PAP I. Przeprowadzona przeze mnie analiza poziomu ekspresji kluczowych genów wirusowych (*xis*, *cIII*, *N*, *cI*, *cro*, *cII*, *oop*, *O*, *Q*, *R*) wykazała, że 40 minut po potraktowaniu lizogennych komórek *E. coli* mitomycyną C, w mutantach $\Delta pcnB::kan$ nastąpił znaczny wzrost ilości analizowanych fagowych transkryptów w porównaniu do bakterii dzikiego typu. Zjawisko to było przejściowe, bowiem w kolejnych minutach trwania eksperymentu, w komórkach *E. coli* zdolnych do produkcji enzymu PAP I odnotowałam podwyższenie poziomu ekspresji większości genów faga $\Phi24_B$ oraz niektórych genów faga λ . U podłoża wyżej opisanych różnic w ekspresji fagowych genów leży prawdopodobnie obniżenie tempa wzrostu bakterii *E. coli* dzikiego typu w odpowiedzi na warunki stresowe wywołane dodaniem mitomycyny C, po czym chwilowy wzrost poziomu PAP I i krótkotrwałe nasilenie procesu poliadenylacji powstałych transkryptów fagowych a następnie, w późniejszych czasach, wyraźny spadek poziomu PAP I oraz wydajności poliadenylacji [5].

Za duży sukces podczas realizacji pracy doktorskiej mogę uznać odkrycie pierwszej regulatorowej fagowej cząsteczki mikroRNA o nazwie 24B_1, zidentyfikowanej w bakteriiach *E. coli* podczas indukcji profaga $\Phi24_B$. Sekwencja kodująca 24B_1 znajduje się w rejonie *lom-vb_24B_43* genomu faga $\Phi24_B$ i nie występuje w genomie faga λ . Za pomocą analiz *in silico* zidentyfikowałam dwa potencjalne miejsca wiązania dla cząsteczki 24B_1 w genomie faga $\Phi24_B$. Jedno z tych miejsc jest zlokalizowane powyżej fagowego genu *S*, a drugie znajduje się w obrębie sekwencji genu *d_ant*, który koduje białko, pełniące prawdopodobnie funkcję anty-represora. W badaniach mających na celu określenie roli cząsteczki 24B_1 w rozwoju faga $\Phi24_B$, zarówno pod kątem fizjologicznym, jak i w regulacji ekspresji genów, wykorzystywałam mutanta delecyjnego $\Phi24_B\Delta24B_1$. Wskutek usunięcia z genomu faga $\Phi24_B$ sekwencji kodującej 24B_1 nastąpiło obniżenie wydajności procesu lizogenizacji bakterii, przyspieszenie momentu indukcji profaga wymuszonej mitomycyną C i zarazem zwiększenie liczby potomnych cząstek fagowych podczas cyklu litycznego, a także obniżenie wydajności adsorpcji fagów na powierzchni komórki gospodarza. Okazało się

również, iż podczas procesu infekcji komórek *E. coli* mutantem fagowym $\Phi 24_B \Delta 24B_1$, poziom ekspresji kluczowych genów fagowych (*xis*, *cIII*, *N*, *cI*, *cro*, *cII*, *O*, *Q*, *cat*, *S*, *R*, *d_ant*, *R1*, *Rz1*) był znacznie podwyższony w porównaniu do populacji bakterii zainfekowanych fagiem typu dzikiego. Proponowany mechanizm działania wskazuje na rolę $24B_1$ jako negatywnego regulatora ekspresji genu *d_ant*, którego produkt wpływa na aktywność represora *cI* w komórce. Konsekwencją opisanych zależności jest pośredni wpływ cząsteczki $24B_1$ na etap wyboru przez faga jednej z dwóch alternatywnych dróg rozwojowych „lizy, bądź lizogenii” [6].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, iż pomimo znaczących podobieństw w sekwencji, organizacji genomu i w przebiegu cyklu życiowego fagów lambdoidalnych, λ oraz $\Phi 24_B$, molekularne mechanizmy kontrolujące ekspresję genów podczas ich rozwoju różnią się i w dużej mierze zależą od czynników zarówno zewnętrznych jak i występujących wewnątrz komórek gospodarza. Uzyskana wiedza ma ogólne znaczenie mikrobiologiczne, a w przyszłości może przyczynić się do opracowania efektywnych metod hamujących produkcję toksyn Shiga przez szczepy STEC oraz leków skierowanych przeciwko tym patogenom.

Literatura

- [1] Bloch S, Felczykowska A, Nejman-Faleńczyk B. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak - have we learnt a lesson from it?; *Acta Biochimica Polonica*; 2012; 59(4): 483-488.
- [2] Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Łoś JM, Barańska S, Łeppek K, Felczykowska A, Łoś M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Genes from the *exo-xis* region of λ and Shiga toxin-converting bacteriophages influence lysogenization and prophage induction; *Archives of Microbiology*; 2013; 195: 693-703.
- [3] Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Dydecka A, Łoś JM, Felczykowska A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Different expression patterns of genes from the *exo-xis* region of bacteriophage λ and Shiga toxin-converting bacteriophage $\Phi 24_B$ following infection or prophage induction in *Escherichia coli*; *PLoS One*; 2014; 9(10): e108233.
- [4] Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Topka G, Dydecka A, Licznarska K, Narajczyk M, Necel A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. UV-Sensitivity of Shiga Toxin-Converting Bacteriophage Virions $\Phi 24_B$, 933W, P22, P27 and P32; *Toxins*; 2015; 7(9): 3727-3739.
- [5] Nowicki D, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Defects in RNA polyadenylation impair both lysogenization by and lytic development of Shiga toxin-converting bacteriophages; *Journal of General Virology*; 2015; 96(7): 1957-1968.

[6] Nejman-Faleńczyk B, Bloch S, Licznarska K, Dydecka A, Felczykowska A, Topka G, Węgrzyn A, Węgrzyn G. A small, microRNA-size, ribonucleic acid regulating gene expression and development of Shiga toxin-converting bacteriophage $\Phi 24_B$; *Scientific Reports*; 2015; 5:10080.