

„Strategie regulacji formowania makromolekularnych kompleksów inicjujących proces replikacji DNA fagów niosących geny toksyn Shiga”

Katarzyna Kozłowska

Bakterie *Escherichia coli* powszechnie występują w środowisku, jak również są istotnym składnikiem naturalnej flory bakteryjnej jelita grubego człowieka. Mimo tego, iż w większości są one komensalami, niektóre szczepy mogą także być patogenne. Do groźnych patogenów zaliczane są szczepy produkujące toksyny Shiga (STEC). Zakażenia tymi szczepami są szczególnie niebezpieczne, ponieważ do tej pory nie istnieją leki, które mogłyby pozwolić na zwalczanie infekcji. Toksyny Shiga, będące głównym czynnikiem wirulencji tych szczepów, są kodowane przez geny znajdujące się w genomach bakteriofagów Stx. Fagi te należą do grupy bakteriofagów lambdoidalnych, które to wykazują duże podobieństwo pod względem budowy do modelowego organizmu biologii molekularnej – faga λ . Bakteriofagi Stx w komórkach *E. coli* występują w formie profaga, co oznacza, że ich genom jest zintegrowany z genomem bakteryjnym. Pod wpływem różnych czynników oraz warunków panujących w komórce, możliwe jest przejście faga w cykl lityczny, co wiąże się z wycięciem jego genomu, wydajną replikacją DNA, a także produkcją toksyny. Efektywny proces powielania bakteriofagowego genomu jest niezbędny do produkcji groźnej toksyny Shiga. Zgłębienie procesów warunkujących inicjację replikacji DNA, może zatem przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów patogenności szczepów STEC.

Przebieg replikacji DNA bakteriofaga λ został już dobrze poznany, jednak sposoby jego regulacji wciąż nie są do końca jasne. Wiadomo, że jest to bardzo złożony proces angażujący zarówno białka kodowane przez faga, jak i maszynieri białkowej jego bakteryjnego gospodarza. Wielu informacji dostarczyły badania w systemie *in vitro*. Replikacja faga λ rozpoczyna się od wiązania białka O do 4 sekwencji DNA w *origin* replikacji, nazwanych iteronami. Kluczową rolę w zapoczątkowaniu procesu powielania materiału genetycznego faga λ pełni bakteriofagowe białko O oraz aktywacja transkrypcyjna *origin* replikacji. Bakteriofagi Stx wykazują nieco odmienną budowę miejsca startu replikacji DNA, jak również inicjatorowego białka O. Różnice te mogą leżeć u podstawy innej regulacji inicjacji replikacji materiału genetycznego fagów Stx w porównaniu do faga λ . Najnowsze badania pokazały, iż ten kluczowy proces w cyklu rozwojowym fagów Stx, może być mniej zależny od aktywacji transkrypcyjnej. Wykazano, że niektóre fagi Stx namnażają się w szczepach *E. coli* o zmniejszonym poziomie transkrypcji z promotora p_R , w przeciwieństwie do typu dzikiego.

W niniejszej pracy prezentuję porównanie budowy *origin* replikacji oraz białek O faga λ oraz fagów Stx. W swoich badaniach opracowałam protokoły oczyszczania białek O fagów Stx P27 oraz 933W. Zbadałam również wpływ odmiennej budowy inicjatorów oraz miejsca startu replikacji na składanie kompleksu O-some. Białka O Stx, podobnie jak białko λ O występują w formie dimeru. Podczas inicjacji replikacji DNA Stx wiązane są jedynie 4 sekwencje iteronowe, pomimo obecności 6 takich fragmentów w *ori* Stx. Funkcja pozostałych 2 iteronów nie jest jasna. Jako, że sekwencje te znajdują się w genie kodującym białka O Stx, również sekwencje samych białek są wydłużone w porównaniu do faga λ . Białka O P27 oraz 933W posiadają zatem 13 dodatkowych aminokwasów. Mogą one stanowić barierę przestrzenną, a co za tym idzie wpływać na mniejsze upakowanie kompleksu O-some Stx od struktury występującej u faga λ . Taka budowa kompleksu inicjującego replikację DNA może warunkować jej mniejszą zależność od procesów zachodzących w komórce gospodarza, również aktywacji transkrypcyjnej. Dowodów na niezależność składania O-some Stx od aktywnej transkrypcji dostarczyły badania wykonane techniką *footprinting*. Brak potrzeby angażowania elementów budowy komórki bakteryjnej do wydajnego powielania genomu bakteriofagowego, może świadczyć o specjalizacji fagów Stx..