

„Rola małych, niekodujących cząsteczek RNA w regulacji rozwoju bakteriofaga Φ 24B oraz jego gospodarza, bakterii *Escherichia coli* produkującej toksynę Shiga”
mgr Natalia Lewandowska

Bakterie *Escherichia coli* produkujące toksynę Shiga, określane jako STEC (ang. Shiga toxin-producing *E. coli*), stanowią wysoce patogenne drobnoustroje odpowiedzialne za ciężkie choroby przewodu pokarmowego oraz zagrażające życiu powikłania ogólnoustrojowe u człowieka. Wirulencja STEC jest bezpośrednio związana z obecnością w ich genomach bakteriofagów Stx przenoszących geny niebezpiecznej dla zdrowia ludzi toksyny Shiga. Fagi Stx należą do rodziny fagów lambdoidalnych i wykazują znaczne podobieństwa w organizacji genomu oraz przebiegu cyklu życiowego do bakteriofaga λ , najlepiej poznanego faga łagodnego. Jednym z najdokładniej scharakteryzowanych przedstawicieli tej grupy wirusów bakteryjnych jest bakteriofag Φ 24_B, stanowiący model badawczy w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Podczas infekcji fag łagodny wprowadza do komórki bakteryjnej gospodarza swoje liniowe, dwuniciowe DNA i wybiera jedną z dwóch alternatywnych dróg rozwojowych: lizogeniczną lub lityczną. W trakcie lizogenii genom faga integruje się z chromosomem gospodarza, przyjmując formę profaga i replikuje się pasywnie wraz z genomem bakteryjnym. W tym stadium większość genów fagowych (w tym geny kodujące toksynę Shiga) pozostaje nieaktywna na poziomie transkrypcyjnym, a produkcja toksyny jest skutecznie zahamowana. Indukcja profaga, do której dochodzi pod wpływem działania różnych czynników zewnętrznych, inicjuje cykl lityczny. DNA faga ulega wówczas wycięciu z chromosomu gospodarza, replikuje się niezależnie od genomu bakterii, a następnie ulega transkrypcji i stanowi matrycę do syntezy fagowych białek strukturalnych oraz enzymów litycznych. Proces ten prowadzi ostatecznie do lizy komórki gospodarza i uwolnienia do światła jelita potomnych cząstek fagowych wraz z dużymi ilościami toksyny Shiga. Indukcja profaga może być wywołana przez różnorodne czynniki środowiskowe i fizjologiczne, w tym promieniowanie UV, nadtlenuk wodoru oraz niektóre antybiotyki, dlatego nie powinny być one stosowane w leczeniu tego typu infekcji. Samo działanie toksyny Shiga polega na zahamowaniu syntezy białek poprzez zablokowanie translacji na etapie elongacji, co prowadzi do śmierci komórek i uszkodzenia tkanek. Klinicznie, infekcje STEC manifestują się krwawą biegunką, bólem brzucha oraz wymiotami, a u 15–20% przypadków dochodzi do rozwoju ciężkich

powikłań, takich jak krwotoczne zapalenie jelita grubego, zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS) lub zakrzepowa plamica małopłytkowa (TTP). Szczególnie podatne na rozwój powikłań są dzieci poniżej piątego roku życia oraz osoby w podeszłym wieku, przy czym odnotowywana w tych grupach wiekowych śmiertelność może sięgać nawet 87%. Obecnie stosowane strategie terapeutyczne skierowane przeciwko bakteriom STEC mają swoje ograniczenia, a antybiotykoterapia jest niezalecana, ponieważ może stymulować indukcję profaga i uwalnianie toksyny, a tym samym nasilać objawy infekcji.

Etap podjęcia decyzji o wyborze rozwoju lizogenicznego lub litycznego u fagów lambdoidalnych jest ściśle regulowany i zależy zarówno od stanu fizjologicznego komórki gospodarza, jak i od czynników regulatorowych kodowanych w genomie faga. Głównym czynnikiem kontrolującym przełączenie pomiędzy cyklami życiowymi faga jest represor CI – białko wiążące DNA, które hamuje transkrypcję z głównych promotorów fagowych (p_L i p_R), zapobiegając jednocześnie ekspresji większości fagowych genów, w tym tych kodujących białka związane z lizą oraz toksynę Shiga. Wejście faga w cykl lityczny wymaga inaktywacji represora CI. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych mechanizmów tego procesu jest aktywacja bakteryjnej odpowiedzi SOS w następstwie uszkodzenia DNA, prowadząca do zależnej od RecA autokatalitycznej degradacji zarówno represora LexA gospodarza, jak i fagowego represora CI. Oprócz regulacji zależnej od odpowiedzi SOS, kodowane w genomie faga antyrepresory (w tym Cro, Ant, Roi i D_ant) mogą antagonizować działanie CI poprzez konkurencję o wiązanie w obrębie miejsc operatorowych głównych promotorów fagowych, umożliwiając w ten sposób ekspresję genów, których produkty białkowe odpowiadają za lizę komórki bakteryjnej. Ostatecznie dominacja represorów lub antyrepresorów w komórce determinuje kierunek rozwoju faga.

Oprócz białek regulatorowych, małe, niekodujące RNA (sRNA) okazały się funkcjonować jako istotne modulatory ekspresji genów nie tylko u bakterii, ale i u bakteriofagów. Prokariotyczne cząsteczki sRNA mają zazwyczaj długość od 50 do 550 nukleotydów i regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez parowanie się z docelowymi mRNA lub poprzez oddziaływanie z białkami w celu modulowania ich aktywności. Najlicniejsza grupa bakteryjnych sRNA działa poprzez komplementarne wiązanie się z docelowym mRNA. Można tu wyodrębnić dwie podgrupy: sRNA zakodowane w pozycji *cis* oraz *trans*. Geny *cis*-kodowanych cząsteczek

sRNA są zlokalizowane w genomie, w tym samym rejonie co ich geny docelowe, ale na nici antysensownej. Częsteczki te wykazują pełną komplementarność z docelowym transkryptem, co prowadzi do wysoce swoistej regulacji, często poprzez hamowanie translacji lub indukowanie degradacji mRNA. Natomiast geny cząsteczek sRNA zakodowanych w pozycji *trans* są zlokalizowane w innych rejonach genomu niż docelowe miejsca wiązania dla tych cząsteczek i z reguły wiążą się z docelowymi transkryptami w obrębie krótszych sekwencji o niepełnym stopniu komplementarności. Dla stabilnego wiązania często wymagają obecności białek opiekuńczych, takich jak Hfq lub ProQ, oraz zazwyczaj pełnią funkcję globalnych regulatorów, oddziałując na wiele różnych mRNA, których produkty są zaangażowane m.in. w odpowiedź na stres czy proces adaptacji komórki do warunków środowiskowych.

U eukariontów wyodrębnia się klasę wyjątkowo krótkich regulatorowych RNA, tzw. mikroRNA, które podobnie jak prokariotyczne sRNA odgrywają kluczową rolę w regulacji potranskrypcyjnej. Częsteczki te, zwykle o długości 19–25 nukleotydów, powstają z dłuższych prekursorów i zostały dobrze scharakteryzowane pod względem mechanizmu biogenezy oraz pełnionych funkcji. Co istotne, wirusy infekujące komórki eukariotyczne również posiadają geny kodujące mikroRNA. Częsteczki te regulują ekspresję zarówno genów samego wirusa, jak i gospodarza, ułatwiając infekcję oraz utrzymanie wirusa w komórce.

Podczas gdy większość dotąd opisanych prokariotycznych sRNA jest dłuższa (powyżej 50 nt) i nie podlega procesowi dojrzewania, najnowsze doniesienia wskazują, że małe RNA podobne do mikroRNA mogą również funkcjonować w systemach bakteryjnych, a ich geny zlokalizowane są zarówno w genomie bakterii, jak i faga. Częsteczki te stanowią jednak niewielką frakcję opisanych dotąd fagowych i bakteryjnych sRNA, przy czym cząsteczki sRNA fagowego pochodzenia zostały dużo słabiej poznane, niż te zakodowane w genomach bakterii. Częsteczkom tym poświęciliśmy pracę przeglądową, włączoną do niniejszej rozprawy doktorskiej jako **praca nr 1**. W pracy tej dokonaliśmy szczegółowej analizy opisanych w literaturze sRNA fagowego pochodzenia, proponując ich podział ze względu na procesy, które kontrolują. W ten sposób zidentyfikowaliśmy sRNA uczestniczące w regulacji m.in.: (i) replikacji DNA faga, (ii) procesu lizogenizacji bakterii, (iii) podziału komórkowego, a także mające wpływ

na (iv) metabolizm komórki, (v) jej odpowiedź na stres, a nawet (vi) patogenność [**praca nr 1**].

Wśród opisanych w **pracy nr 1** regulatorowych sRNA wspomniana została również fagowa cząsteczka 24B_1, której odkrycie w 2015 roku stanowiło istotny punkt zwrotny w badaniach nad prokariotycznymi cząsteczkami sRNA, podobnymi do eukariotycznych mikroRNA. 24B_1 to 20-nukleotydowa cząsteczka sRNA powstająca z 80-nukleotydowego transkryptu prekursorowego produkowanego przez niosącego geny toksyny Shiga bakteriofaga $\Phi 24_B$. Cząsteczka ta stanowi pierwsze funkcjonalne sRNA o rozmiarze mikroRNA, które zidentyfikowano u bakteriofagów. Rola, znaczenie i funkcje tej cząsteczki zostały szczegółowo opisane przeze mnie i innych współautorów w **pracy nr 2**. W artykule tym zbadaliśmy wpływ cząsteczki 24B_1 na rozwój faga oraz jego gospodarza, bakterii *E. coli*, w warunkach jej nadekspresji. Dodatkowa kopia genu *24B_1* została wprowadzona do komórek na plazmidzie. W serii eksperymentów analizujących fizjologiczne aspekty rozwoju faga potwierdziliśmy, że pod względem funkcjonalnym cząsteczka 24B_1 stymuluje utrzymanie stanu profaga w komórkach *E. coli*. Zaobserwowaliśmy m.in., że nadekspresja fagowego sRNA 24B_1 z naturalnego promotora (p_{24B_1}) znacząco wpływa na wydajność plonu fagowego. Podczas infekcji z wykorzystaniem dzikiego typu faga $\Phi 24_B$ podwyższony poziom cząsteczki 24B_1 spowodował spadek efektywności produkcji potomnych cząstek fagowych (plonu fagowego) w cyklu litycznym, podczas gdy wydajność adsorpcji faga do powierzchni komórek gospodarza była istotnie zwiększona na wczesnych etapach infekcji. Pomimo zwiększonej wydajności adsorpcji, komórki bakteryjne z nadekspresją 24B_1 wykazywały obniżoną efektywność lizy oraz zwiększoną przeżywalność w porównaniu do szczepów kontrolnych. Efekty te towarzyszyły wyższemu odsetkowi lizogenów wśród komórek, które przetrwały infekcję, co wskazuje, że zwiększony poziom 24B_1 w komórce stymuluje rozwój faga w kierunku lizogenii. Tendencja ta była obserwowana przy różnych wartościach m.o.i. (ang. multiplicity of infection) oraz w warunkach sprzyjających zarówno lizogenii, jak i rozwojowi litycznemu. Chociaż przeżywalność bakterii była niższa w warunkach bogatych w składniki odżywcze, sprzyjających cyklowi litycznemu, to jednak lizogeny stanowiły większość komórek, które przetrwały infekcję.

Zgodnie z wynikami eksperymentów fizjologicznych, dodatkowo przeprowadzone analizy z wykorzystaniem RT-qPCR wykazały, że nadekspresja cząsteczki 24B_1 prowadzi

do zmian w ekspresji genów fagowych. Podczas gdy poziomy ekspresji badanych genów we wczesnych etapach infekcji były początkowo podobne w komórkach bakteryjnych z naturalnym i podwyższonym poziomem produkcji 24B_1, to jednak geny związane z lizogenią, takie jak *cl*, *cII* i *cIII*, wykazywały znacznie wyższy poziom ekspresji w późniejszych etapach infekcji, w wariancie z nadekspresją 24B_1. Geny te kodują kluczowe białka regulatorowe ścieżki lizogenicznej, co potwierdza wcześniejsze obserwacje, że 24B_1 sprzyja ustanowieniu lizogenii.

Oprócz wpływu na rozwój faga i ekspresję jego genów, nadekspresja cząsteczki 24B_1 spowodowała również zmiany w metabolizmie komórki gospodarza, przyczyniając się do przeprogramowania szlaków energetycznych komórki bakteryjnej na bardziej sprzyjające utrzymaniu stanu lizogenii. Podwyższony poziom 24B_1 spowodował istotne obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, nie wpływając przy tym na tempo wzrostu bakterii ani przeżywalność komórek. Z kolei analiza metabolomu w warunkach nadekspresji 24B_1 dodatkowo wykazała zaburzenia w centralnym metabolizmie węgla, charakteryzujące się obniżeniem poziomu fumaranu i akumulacją NAD^+ , kluczowych metabolitów z cyklu kwasu cytrynowego. Zastanawiając się, z czego może wynikać spadek poziomu fumaranu w komórce, analizie poddaliśmy sekwencje genów kodujących podjednostki enzymu dehydrogenazy bursztynianowej Sdh, który jest odpowiedzialny za przemianę bursztynianu w fumaran. Wykonana analiza bioinformatyczna pozwoliła zidentyfikować potencjalne miejsce wiązania dla 24B_1 w regionie 5' mRNA genu *sdhB*. Badania wiązania RNA *in vitro* za pomocą metody różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym (ang. mobility gelshift assay) wykazały, że dojrzała cząsteczka 24B_1, w przeciwieństwie do swojego prekursora, jest zdolna do wiązania się z tym fragmentem mRNA, chociaż oddziaływanie to było stosunkowo słabe, co sugeruje, że dodatkowe czynniki lub specyficzne warunki panujące w komórce mogą być wymagane do efektywnego wiązania *in vivo*. Wiązanie to, choć słabe, może wskazywać na bezpośrednie działanie 24B_1 na ekspresję genu *sdhB*, co może skutkować obniżeniem poziomu enzymu w komórce oraz zaburzeniem cyklu Krebsa na etapie przemiany bursztynianu w fumaran. W efekcie prowadzi to do nagromadzenia się NAD^+ (albowiem nie ulega przemianie do NADH) oraz do spadku poziomu ATP w komórce wskutek zaburzenia całego procesu przemian energetycznych. Przypuszcza się, że niski poziom ATP w komórce może upośledzać działanie proteaz

zależnych od ATP, co sprawia, że represory cyklu litycznego pozostają aktywne i kierują faga na drogę rozwoju lizogenicznego.

Analizy strukturalne cząsteczek wykazały ponadto, że dojrzała cząsteczka 24B_1 posiada mniej rozbudowaną strukturę drugorzędową niż jej prekursor, co zwiększa jej dostępność do oddziaływań międzycząsteczkowych *in vivo*. Z drugiej strony jednak, dalsze badania wykazały, że białko opiekuńcze Hfq wiąże formę prekursorową 24B_1, natomiast nie oddziałuje z dojrzałą cząsteczką, co sugeruje rolę Hfq w stabilizacji prekursora lub w procesie biogenezy, a nie na poziomie działania dojrzałego sRNA.

Podsumowując najważniejsze osiągnięcia z **pracy nr 2**, uzyskane wyniki wskazują, że 24B_1 działa jako regulatorowe RNA kontrolujące zarówno metabolizm komórki gospodarza, jak i ekspresję genów fagowych, celem utrzymania faga w rozwoju lizogenicznym.

Dalsze badania genomu faga $\Phi 24_B$ oraz analizy transkryptomiczne doprowadziły do identyfikacji kolejnego, fagowego, bardzo małego RNA – cząsteczki UpRoi1 o wielkości zaledwie 30 nukleotydów. W **pracy nr 3** poddaliśmy tę cząsteczkę szczegółowej charakterystyce i wykazaliśmy, że w przeciwieństwie do 24B_1, cząsteczka UpRoi1 stymuluje lityczny rozwój faga. Zidentyfikowaliśmy potencjalne miejsca wiązania dla tej cząsteczki zarówno w genomie faga, jak i bakterii oraz eksperymentalnie potwierdziliśmy, że UpRoi1 bezpośrednio oddziałuje zarówno z transkryptem fagowym, jak i bakteryjnym, a wiązania te są stabilizowane przez białko opiekuńcze ProQ.

Cząsteczka UpRoi1 jest kodowana przez gen *uproi1*, który znajduje się w rejonie regulatorowym genomu faga pomiędzy genami *ant* i *roi*, ale na nici przeciwnej oraz posiada zidentyfikowane sekwencje promotora p_N i terminatora T2. Analizy ilościowe z wykorzystaniem metody RT-qPCR potwierdziły powstawanie transkryptu UpRoi1 w lizogenicnej komórce i wykazały, że jego poziom wzrasta znacząco po indukcji profaga, przy czym najwyższa ekspresja obserwowana była podczas transkrypcji z naturalnego promotora p_N . Nawet w warunkach spontanicznej indukcji, wariant z nadekspresją UpRoi1 wykazywał znacząco podwyższony poziom tego transkryptu w komórce, potwierdzając jego efektywną produkcję pomimo braku egzogenego induktora. Dalsze eksperymenty wykazały, że nadekspresja cząsteczki UpRoi1 istotnie wpłynęła na obniżenie przeżywalności bakterii po infekcji i nasilała lizę komórek w hodowli zarówno w warunkach spontanicznej, jak i wymuszonej mitomycyną C indukcji profaga. Efekt ten

towarzyszył około dziesięciokrotnemu wzrostowi liczby cząstek fagowych oraz zmniejszeniu procentowego udziału żywych komórek gospodarza w hodowli, co potwierdzają wyniki analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Lokalizacja w genomie faga oraz wysoki poziom komplementarności do potencjalnych sekwencji docelowych sugerowały, że UpRoi1 może działać jako cząsteczka RNA typu *cis*, oddziałując na niepodlegający translacji region 5'UTR transkryptu genu *roi*. Analiza wiązania RNA *in vitro* za pomocą metody różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym wykazała bezpośrednie wiązanie UpRoi1 z 100–nukleotydowym fragmentem 5'UTR mRNA genu *roi*. Białko opiekuńcze ProQ zostało zidentyfikowane jako stabilizujące ten kompleks, natomiast białko Hfq nie wykazało powinowactwa do tego kompleksu. Analizy spektroskopowe również potwierdziły tę interakcję. Obserwowane zmiany wartości absorbancji w zakresie promieniowania UV oraz zmiany w widmie dichroizmu kołowego (CD) wskazują na reorganizację strukturalną w wyniku tworzenia kompleksu. Uzyskana wartość stałej wiązania ($K_{bind} = 3,81 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) wskazuje na wysoki stopień powinowactwa, a ujemna wartość zmiany energii swobodnej Gibbsa ($\Delta G = -37,52 \text{ kJ/mol}$) świadczy o spontanicznym, termodynamicznie korzystnym i stabilnym charakterze tego wiązania. Analiza widma CD dodatkowo wykazała, że chociaż UpRoi1 samodzielnie charakteryzuje się ograniczoną stabilnością strukturalną, jego interakcja z 5'UTR mRNA genu *roi* sprzyja powstawaniu wysoko uporządkowanej konformacji bogatej w struktury helikalne.

Dodatkowo potwierdzone przez nas wiązanie regulatora odpowiedzi SOS, białka LexA, do regionu promotora naturalnego p_N sugeruje, że ekspresja UpRoi1 jest zintegrowana z systemem odpowiedzi SOS u gospodarza. Z kolei analizy RNA-seq i RT-qPCR wykazały zwiększoną ekspresję fagowych genów antyrepresorowych (*cro*, *roi*, *ant* i *d_ant*) w komórkach z nadekspresją UpRoi1, podczas gdy poziom transkryptu represora CI pozostawał niezmienny, co wskazuje, że regulacja sprzyja aktywności antyrepresorów i nie wpływa bezpośrednio na poziom mRNA genu *cI* w komórce.

Na tej podstawie zaproponowaliśmy zależny od cząsteczki UpRoi1 mechanizm przełączenia cyklu życiowego faga $\Phi 24_B$ [Ryc. 9 z pracy nr 3]. W regulacji tej białko LexA, pełniące rolę represora w bakteryjnym systemie odpowiedzi SOS, wiąże się z sekwencją promotorową p_N genu *uproi1* i hamuje jego transkrypcję. W wyniku uszkodzeń DNA (powstałych na skutek np. działania światła UV lub innych

czynników) w komórce gromadzą się fragmenty ssDNA, których obecność z kolei prowadzi do aktywacji białka naprawczego RecA. Aktywacja RecA inicjuje jednocześnie dwa mechanizmy inaktywacji białka CI (odpowiedzialnego za utrzymanie stanu lizogenii): bezpośrednią autoproteolizę białka CI oraz pośrednią, będącą efektem degradacji białka LexA, do której dochodzi właśnie w wyniku aktywności białka RecA. Degradacja represora LexA prowadzi do odblokowania transkrypcji genu *uproi1*. Produkowana jest wówczas cząsteczka UpRoi1, która wiąże się z 5'UTR genu antyrepresora Roi, a dokładnie w obrębie sekwencji terminatora T1 zlokalizowanej powyżej genu *roi* i pokrywającej się z jego potencjalną sekwencją promotorową p_{946} . Wydaje się, że ko-lokalizacja terminatora T1 oraz promotora stanowi zabezpieczenie przed przedwczesną transkrypcją genu *roi*. Dopiero obecność cząsteczki sRNA UpRoi1 i jej interakcja z sekwencją 5'UTR mRNA genu *roi* prawdopodobnie destabilizuje strukturę terminatora T1, umożliwiając w ten sposób zwiększoną ekspresję genu *roi* z promotora p_{946} . Dochodzi wówczas do produkcji antyrepresora Roi, którego produkt może konkurować z CI o wiązanie do miejsc operatorowych głównych promotorów fagowych p_R i p_L . W efekcie oba mechanizmy, bezpośredni i pośredni, prowadzą do zniesienia hamującego działania CI; dochodzi do transkrypcji wczesnych genów fagowych znajdujących się pod kontrolą promotorów p_R oraz p_L i następuje przełączenie cyklu życiowego faga na rozwój lityczny.

W **pracy nr 3** dowiedliśmy również, że poza regulacją ekspresji genów fagowych, UpRoi1 moduluje również ekspresję genów gospodarza znajdujących się w pozycji *trans* do genu cząsteczki. Analiza transkryptomiczna wykazała obecność 158 genów z podwyższonym poziomem ekspresji oraz 83 genów z obniżonym poziomem ekspresji w komórkach z nadekspresją cząsteczki UpRoi1. Szczególnie zauważalne było znaczące podwyższenie poziomu ekspresji genów (*cheA*, *cheW*, *tar*, *tap*, *tsr*, *motA*, *motB*, *fliC* i *flgL*) zaangażowanych w ruchy chemotaktyczne i składanie wici. Profilowanie proteomiczne wykazało podwyższony poziom białek związanych z aktywnością transkrypcyjną i translacyjną, przy jednoczesnym istotnym obniżeniu poziomu DnaA, inicjatora replikacji DNA chromosomalnego. Sugeruje to możliwą redystrybucję zasobów komórkowych gospodarza na rzecz procesu replikacji genomu fagowego podczas rozwoju litycznego.

Dalsze badania z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych wraz z analizą powyższych danych transkryptomicznych pozwoliły na zidentyfikowanie mRNA genu *flgL* jako bezpośredniego celu bakteryjnego dla cząsteczki UpRoi1. Gen ten koduje

białko łączące hak i włókno w strukturze wici bakteryjnej. Przeprowadzony test różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym wykazał, że RNA UpRoi1 i 85-nukleotydowy fragment mRNA *flgL* tworzą wiązanie o wysokim powinowactwie, które może być stabilizowane przez białko opiekuńcze ProQ. Pomiar spektroskopowy potwierdził silną i spontaniczną interakcję ($K_{\text{bind}} = 4,71 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; $\Delta G = -43,75 \text{ kJ/mol}$). W kontekście fizjologicznym nadekspresja UpRoi1 zwiększała ruchliwość bakterii, co potwierdzono obserwacją wzmożonego rozproszenia komórek w agarze, w warunkach spontanicznej indukcji, skorelowaną ze wzrostem poziomu ekspresji *flgL*. Sugerujemy, że taka pozytywna, zależna od UpRoi1 regulacja może wynikać z preferencji faga do rozwoju litycznego w warunkach bogatych w składniki odżywcze i potrzeby ukierunkowania lizogennej komórki na poszukiwania takiego środowiska.

W efekcie badań nad cząsteczkami sRNA fagowego pochodzenia, wspólnie z naukowcami z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, wypracowaliśmy jeszcze jedno ważne, interdyscyplinarne rozwiązanie [**praca nr 4**]. Jest to procedura analizy wiązania małych cząsteczek sRNA z docelowymi transkryptami, łącząca technikę badania wiązania RNA *in vitro* za pomocą metody różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym z chemicznymi analizami spektroskopowymi opartymi na obserwacji zmian absorbancji w zakresie promieniowania UV oraz zmian w widmie CD. Połączenie trzech technik pozwoliło wypracować wiarygodne narzędzie do badania siły, stabilności i spontaniczności (samorzutności) procesu wiązania sRNA–mRNA.

W świetle uzyskanych dotąd wyników, możemy wskazać na przeciwstawne działanie cząsteczek 24B_1 i UpRoi1 oraz wysunąć główny wniosek, że fagowe sRNA o wielkości eukariotycznych mikroRNA mogą pełnić funkcję czynników regulatorowych kontrolujących przełączanie się cyklu życiowego faga. Podobne funkcje pełnią cząsteczki mikroRNA wirusów infekujących komórki eukariotyczne, np. herpeswirusów, które wykazują istotne podobieństwa w cyklu życiowym z łagodnymi bakteriofagami ogonkowymi, w tym fagami Stx. Obie te grupy wirusów wykazują zdolność do przełączania się pomiędzy utajonym stanem latencji/lizogenii a rozwojem litycznym. W okresie latencji herpeswirusów (lizogenii u fagów) większość genów wirusowych pozostaje nieaktywna, podczas gdy ograniczony zestaw genów aktywnych zapewnia utrzymanie genomu w komórce i unikanie mechanizmów obronnych gospodarza.

Reaktywacja wirusa tudzież indukcja profaga uruchamia wycięcie, a następnie replikację fagowego DNA oraz jego dalszy rozwój lityczny, który prowadzi do zniszczenia komórki gospodarza i uwolnienia potomnych wirusów. U herpeswirusów mikroRNA odgrywają kluczową rolę w regulacji przełączenia pomiędzy cyklami życiowymi wirusa. Większość opisanych cząsteczek kontroluje fazę latencji poprzez hamowanie ekspresji genów litycznych, ale nieliczne sprzyjają również rozwojowi litycznemu. Te wirusowe mikroRNA często są kodowane na nici antysensownej i regulują ekspresję zarówno genów wirusowych, jak i genów gospodarza zaangażowanych m.in. w proces apoptozy, metabolizm, czy migrację komórek.

Opisane powyżej wyniki niewątpliwie wskazują, że fagowe sRNA typu mikroRNA stanowią dodatkowy mechanizm regulacji ekspresji genów i kontrolują rozwój bakteriofagów oraz interakcje fag–gospodarz. Poprzez modulowanie ekspresji genów fagowych represorów, antyrepresorów oraz genów gospodarza, te małe RNA przyczyniają się do precyzyjnej kontroli cyklu życiowego faga. Zrozumienie mechanizmów działania fagowych sRNA nie tylko pogłębia podstawową wiedzę na temat biologii fagów, ale także otwiera nowe perspektywy dla strategii terapeutycznych mających na celu ograniczenie produkcji toksyny Shiga poprzez stabilizację stanu utajonego fagów Stx w patogennych szczepach *E. coli*. W świetle tych wyników można również wskazać, że fagi Stx niosą geny cząsteczek sRNA funkcjonalnie analogiczne do eukariotycznych mikroRNA. Sprzyjająca lizogenii cząsteczka 24B_1 stanowi pierwszy dowód na istnienie mechanizmu regulacyjnego podobnego do tego funkcjonującego u wirusów infekujących komórki eukariotyczne. Następstwem tego odkrycia było zidentyfikowanie i scharakteryzowanie kolejnego fagowego sRNA, UpRoi1, które również odgrywa kluczową rolę w podejmowaniu przez faga decyzji o wyborze ścieżki rozwojowej. Poza rolą w regulacji ekspresji genów fagowych i stymulowaniu rozwoju litycznego, cząsteczka UpRoi1 kontroluje również ekspresję genów gospodarza poprzez bezpośrednie wiązanie się z mRNA genu *flgL*. Oddziaływanie to może ułatwiać rozprzestrzenianie się cząstek wirusowych poprzez stymulację migracji komórek bakteryjnych w kierunku korzystniejszego środowiska, tym samym zapewniając równowagę pomiędzy produkcją cząstek fagowych a przetrwaniem populacji gospodarza. UpRoi1, podobnie jak mikroRNA herpeswirusów, które zwiększają migrację i inwazję komórek gospodarza,

wyduje się sprzyjać rozprzestrzenianiu się wirusa poprzez kontrolę procesów życiowych bakterii.

Te obserwacje niewątpliwie potwierdzają hipotezę, że bakteriofagi łagodne niosą geny kodujące regulatorowe sRNA, pod wieloma względami przypominające cząsteczki mikroRNA funkcjonujące w komórkach eukariotycznych. Fagowe sRNA wyłaniają się zatem jako kluczowe regulatory interakcji fag–gospodarz, aktywowane przez sygnały środowiskowe, zmiany stanu metabolicznego komórki oraz zmiany w wielkości populacji bakterii celem ukierunkowania faga na właściwą ścieżkę rozwoju. Interwencja terapeutyczna zorientowana na tego typu cząsteczki sRNA lub ich interakcje z docelowymi transkryptami może stanowić nową strategię kontroli indukcji profaga i ograniczenia produkcji toksyny Shiga podczas infekcji STEC.