

# **Kontrola replikacji fagów lambdoidalnych niosących geny toksyn Shiga w świetle potencjalnych nowych metod ich wykrywania i terapii zakażeń enterokrwotocznymi szczepami *Escherichia coli***

Bożena Nejman-Faleńczyk

Bakterie *Escherichia coli* występują powszechnie w środowisku i stanowią składnik prawidłowej flory bakteryjnej jelita grubego człowieka. Bakterie te zaliczane są do organizmów symbiotycznych, jednakże w obrębie gatunku występują również szczepy patogenne dla człowieka. Przykładem takich patogennych bakterii są *E. coli* produkujące toksynę Shiga (STEC) z których najbardziej szkodliwe są enterohemolityczne szczepy *E. coli* (EHEC). Najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy jest bakteria *E. coli* O157:H7. Bakterie te wykazują zdolność adhezji do nabłonka jelitowego, z łatwością adaptują się do zmiennych warunków środowiska, wykazują oporność na niskie temperatury oraz niskie pH.

Bakterie STEC były przyczyną niedawnej epidemii w Niemczech i 15 innych krajach europejskich (w maju 2011 r.), w wyniku której wg danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) odnotowano 4075 zachorowań i 50 zgonów. Pierwsze masowe zachorowania ludzi na skutek infekcji bakteriami STEC zanotowano w USA, w 1982 r. Głównym rezerwuarem tych bakterii są zwierzęta domowe, głównie bydło, owce, kozy, u których bytują one w przewodzie pokarmowym. Źródłem infekcji mogą być niedosmażone kotlety w hamburgerach, krwiste wołowe steki, mleko, ale także niedokładnie umyte warzywa i owoce, czy też zanieczyszczona woda.

Głównym czynnikiem wirulencji bakterii STEC są produkowane przez nie toksyny Shiga. Geny kodujące te toksyny (*stx1* i *stx2*) zlokalizowane są w genomach bakteriofagów, występujących w bakteriach w postaci profagów. Bakteriofagi te są blisko spokrewnione z fagiem  $\lambda$  i zaliczane do grupy tzw. bakteriofagów lambdoidalnych. Wykazują one duże podobieństwo do faga  $\lambda$  pod względem budowy morfologicznej, organizacji genomu, czy też cyklu życiowego. W zależności od warunków panujących w komórce gospodarza mogą wybrać jedną z dwóch dróg rozwojowych – cykl lizogeniczny, bądź lityczny. W stadium profaga genom bakteriofaga jest zintegrowany z chromosomem bakteryjnym i wraz z nim replikowany. Na skutek działania różnych czynników możliwa jest indukcja profaga i uruchomienie cyklu litycznego. Dochodzi wówczas do wycięcia fagowego DNA oraz ekspresji genów kodujących białka biorące udział m.in. w procesie replikacji materiału genetycznego faga (jako element pozachromosomowy), w procesie produkcji potomnych

wirionów oraz w procesie lizy komórki gospodarza. Ekspresja genów kodujących toksyny Shiga jest hamowana w stadium profaga i zachodzi efektywnie dopiero po jego indukcji.

Mechanizm replikacji DNA faga  $\lambda$  jest procesem złożonym i wieloetapowym. W procesie tym oprócz białek fagowych wykorzystywane są także produkty genów gospodarza m.in. białka replikacyjne oraz białka szoku termicznego. W pierwszym etapie replikacji, inicjatorowe białko  $\lambda O$  wiąże się do czterech 19-nukleotydowych powtórzeń (tzw. iteronów), położonych w obrębie *ori $\lambda$* . Następnie fagowe białko  $\lambda P$  dostarcza bakteryjną helikazę DnaB do tworzącego się kompleksu replikacyjnego. Przywrócenie aktywności helikazy i rearanżacja kompleksu jest możliwa dzięki oddziaływaniu trzech białek szoku termicznego: DnaK, DnaJ i GrpE. Dochodzi do rozwinięcia dwuniciowej struktury DNA i utworzenia widełek replikacyjnych. Na tym etapie przyłączane są kolejne białka: gyraza, białka SSB, primaza oraz holoenzym polimerazy III DNA. W ostatnim etapie inicjacji replikacji dochodzi do aktywacji transkrypcyjnej *ori $\lambda$*  (transkrypcja z promotora  $p_R$ ). Jest to sygnał do rozpoczęcia syntezy nowej nici DNA. Rolę aktywatorów transkrypcji z promotora  $p_R$  faga  $\lambda$  pełnią m.in. bakteryjne białka DnaA, SeqA i DksA, natomiast alarmom odpowiedzi ścisłej – czterofosforan guanozyny (ppGpp) hamuje transkrypcję z tego promotora.

Toksyny uwolnione w wyniku rozpadu komórki bakteryjnej w jelicie atakują komórki nabłonka wiążąc się do specyficznych glikolipidów (Gb3) zlokalizowanych na ich powierzchni. Następnie wnikają do wnętrza komórek, gdzie łączą się z dużą podjednostką rybosomu eukariotycznego 60S i w konsekwencji hamują syntezę białek. Zahamowanie produkcji białek prowadzi do obumierania komórek nabłonka jelitowego, a tym samym przerwania jego ciągłości. W konsekwencji toksyny przedostają się do światła naczyń krwionośnych znajdujących się pod nabłonkiem i z krwią rozprzestrzeniają się po organizmie. Krew z kolei przedostaje się do światła jelita, w rezultacie czego pierwszym objawem infekcji jest krwawa biegunka. Postępujący proces produkcji toksyn objawia się ponadto nagłymi bólami brzucha oraz wymiotami. W większości przypadków objawy zatrucia pokarmowego utrzymują się ok. 10 dni i są jedynym efektem tego typu infekcji. Jednakże w ok. 15-20% przypadków dochodzi do powikłań i rozwoju przewlekłych schorzeń takich jak: zespół hemolityczno-mocznicowy, małopłytkowa plamica zakrzepowa, czy też krwotoczne zapalenie okrężnicy.

Obszerna wiedza z zakresu molekularnych mechanizmów rozwoju faga  $\lambda$  oraz duże podobieństwo bakteriofagów kodujących geny toksyn Shiga do faga  $\lambda$  na poziomie budowy wirionów, organizacji genomu, czy też pod względem sekwencji materiału genetycznego, umożliwiają poznanie mechanizmu replikacji analizowanych bakteriofagów w stosunkowo

szybki sposób. Niemniej jednak, zaobserwowane różnice na poziomie podstawowych procesów regulacyjnych sprawiają, iż wiedza uzyskana w ramach badań nad procesem replikacji faga  $\lambda$  nie może być bezpośrednio przenoszona na inne bakteriofagi lambdoidalne bez naukowego potwierdzenia.

Poznanie procesu replikacji bakteriofagów kodujących geny toksyn Shiga jest istotne, gdyż obok mechanizmów regulujących rozwój bakteriofagów (w tym procesu indukcji profaga), to właśnie efektywność procesu replikacji materiału genetycznego zaindukowanego faga, wpływająca na liczbę kopii genów kodujących toksyny, ma pierwszorzędne znaczenie w regulacji poziomu syntezy toksyn, a tym samym poziomu patogenności bakterii, wpływającego na przebieg infekcji.

Celem niniejszej pracy było poznanie mechanizmu regulacji replikacji DNA fagów niosących geny *stx*, w odpowiedzi na różne czynniki mogące wpłynąć na wydajność tego procesu. Ponadto prowadzone badania miały na celu porównanie tego mechanizmu ze schematem zaobserwowanym u faga  $\lambda$  oraz wskazanie potencjalnych zastosowań praktycznych uzyskanej wiedzy.

Badania zostały przeprowadzone zarówno w oparciu o modele fagowe, jak też skonstruowane na ich bazie plazmidy. Pracę rozpoczęłam od sprawdzenia czy rejony replikacyjne fagów niosących geny toksyn Shiga mogą istnieć jako samodzielne replikony w komórkach bakteryjnych. W tym celu skonstruowanych zostało sześć lambdoidalnych plazmidów replikacyjnych (pRstx2cmr, pR8624cmr, p933Wcmr, p32cmr, p27cmr oraz p22cmr) analogicznych do plazmidu  $\lambda$  (pCB104), czyli zawierających rejon *origin (ori)* bakteriofaga jako jedyne miejsce inicjacji replikacji oraz wszystkie geny i sekwencje regulatorowe niezbędne do replikacji plazmidowego DNA. Wydajna transformacja bakterii *E. coli* skonstruowanymi plazmidami i stabilne utrzymywanie się tych plazmidów w komórkach bakteryjnych, potwierdziły zasadność stosowania tego typu modeli badawczych w dalszej pracy [1].

W wyniku przeprowadzenia kolejnych doświadczeń okazało się, iż replikacja analizowanych plazmidów lambdoidalnych, podobnie jak w przypadku plazmidu  $\lambda$ , jest zależna od funkcji kodowanych w genomie gospodarza białek szoku termicznego: DnaK, DnaJ i GrpE. Jednocześnie, w odróżnieniu od plazmidu  $\lambda$ , w przypadku części analizowanych plazmidów lambdoidalnych nie zaobserwowałam zjawiska niezgodności z mutacją *dnaA46* i potwierdziłam ich zdolność do replikacji pomimo braku aktywnego białka DnaA, które w przypadku faga  $\lambda$  jest niezbędnym aktywatorem transkrypcji z promotora *p<sub>R</sub>* [1]. Wydaje się, iż ogólny schemat replikacji plazmidu  $\lambda$  oraz pozostałych analizowanych plazmidów

lambdoidalnych jest podobny, jednakże procesy regulacyjne mogą różnić się istotnymi szczegółami. Dalsze analizy wykazały, iż u podstaw zaobserwowanych różnic mogą leżeć rozbieżności w sekwencjach genów kodujących fagowe białka replikacyjne O i P [1]. Wydaje się, iż rozbieżności w sekwencjach aminokwasów, zlokalizowane w obrębie karboksylowego końca białka O oraz aminowego końca białka P mogą wpływać na zmiany w sposobie oddziaływania tych białek ze sobą, a tym samym na zmiany w rearanzacji kompleksu replikacyjnego. Skutkiem tego, replikacja jest możliwa nawet pomimo wystąpienia mniej efektywnej aktywacji transkrypcyjnej *origin*, spowodowanej brakiem aktywnego białka DnaA.

Kolejna różnica zaobserwowana na poziomie regulacji transkrypcji z promotora  $p_R$  dotyczy białka DksA, które obok ppGpp stanowi główny regulator transkrypcji w odpowiedzi na warunki głodowe. W porównaniu z regulacją transkrypcji z promotora  $p_R$  faga  $\lambda$ , białko DksA wykazuje ograniczoną zdolność pozytywnej regulacji transkrypcji z promotorów homologicznych do promotora  $p_R$  faga  $\lambda$ , pochodzących z analizowanych bakteriofagów kodujących geny toksyn Shiga [2]. Wcześniejsze badania, przeprowadzone przez innych naukowców a dotyczące wpływu białka DksA na transkrypcję z promotora  $p_R$  faga  $\lambda$  wykazały, iż białko to ułatwia wiązanie się polimerazy RNA do sekwencji promotorowej. Być może podobny mechanizm funkcjonuje w przypadku bakteriofagów kodujących geny *stx*, jednakże tu (jak wskazują uzyskane przeze mnie wyniki) wydajność stymulacji ze strony białka DksA jest obniżona (w stosunku do  $\lambda$ ), skutkiem czego prawdopodobnie zmniejsza się także powinowactwo polimerazy RNA do sekwencji promotorowej, a tym samym wydajność procesu transkrypcji. Mechanizm ten potwierdza poniekąd zaobserwowana w ramach niniejszej pracy obniżona (w porównaniu z promotorem  $p_R$  faga  $\lambda$ ) siła promotorów  $p_R$  analizowanych bakteriofagów lambdoidalnych ST2-8624 i 933W $\Delta$ tox [2]. Wydaje się, iż w warunkach normalnych taka wydajność procesu transkrypcji jest wystarczająca, jednakże w warunkach niesprzyjających do wzrostu bakterii np. podczas głodzenia aminokwasowego, na skutek zbyt niskiego poziomu transkrypcji nie dochodzi do efektywnej aktywacji transkrypcyjnej *origin*, a w konsekwencji do inicjacji replikacji fagowego DNA. Potwierdzeniem wyżej opisanego mechanizmu i znaczącej roli białka DksA może być zaobserwowane w ramach niniejszej pracy zahamowanie procesu replikacji analizowanych plazmidów lambdoidalnych (z wyjątkiem plazmidu  $\lambda$ ) w warunkach głodzenia aminokwasowego, zarówno podczas tzw. odpowiedzi ścisłej jak i rozluźnionej (odpowiednio bakterie *relA*<sup>+</sup> and *relA*<sup>-</sup>), niezależnie od obecności ppGpp [2]. Wyniki uzyskane na modelach plazmidowych potwierdziły się podczas analizy rozwoju bakteriofaga 933W $\Delta$ tox w wyżej

wymienionych warunkach, gdzie również zaobserwowałam zahamowanie rozwoju analizowanego faga w obu przypadkach [3].

Dalsze badania wykazały, iż cytrynian sodu będący składnikiem stosowanych w przypadku biegunek płynów nawadniających (np. Orsalitu), ma hamujący wpływ na rozwój faga 933W $\Delta$ tox, podczas gdy dodatek glukozy (także będącej składnikiem takich płynów) odwraca jego działanie [3].

Leczenie farmakologiczne infekcji wywołanych bakteriami *E. coli* produkującymi toksyny Shiga jest utrudnione ze względu na fakt, iż istnieje grupa leków (zarówno antybiotyków jak i chemioterapeutyków) stymulujących indukcję profagów, a tym samym zaostrzających przebieg choroby. W objawowym leczeniu biegunek stosowane są dwie strategie. Pierwsza polega na przegłodzeniu organizmu w początkowych etapach choroby i podawaniu jedynie doustnych płynów nawadniających, podczas gdy druga strategia opiera się na nieprzerwanej kontynuacji żywienia przez cały okres choroby. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy przemawiają na korzyść pierwszej z opisanych strategii w przypadku infekcji bakteriami STEC i oprócz znaczenia poznawczego mają potencjalne znaczenie praktyczne. Wydaje się, iż najprawdopodobniej nie ppGpp, a białko DksA odgrywa kluczową rolę w mechanizmie warunkującym zahamowanie procesu replikacji DNA bakteriofagów kodujących geny toksyn Shiga w warunkach głodzenia. Dalsze badania są konieczne by w pełni zrozumieć ten mechanizm, niemniej jednak wpływ warunków głodzenia na rozwój tych bakteriofagów wydaje się być istotny i może mieć odzwierciedlenie w samym przebiegu infekcji bakteriami STEC. Być może odpowiednia modyfikacja składu podawanych płynów nawadniających, bądź też uwzględnienie w procesie leczenia etapu głodówki, mogłoby wpłynąć na łagodniejszy przebieg choroby i zmniejszenie ryzyka wystąpienia powikłań. Uzyskana dzięki badaniom opisanym w tej pracy wiedza stanowi podwaliny rozwiązania szerokiego problemu badawczego i chociaż niewątpliwie wymaga przeprowadzenia kolejnych doświadczeń, to jednak może mieć potencjalne znaczenie w opracowywaniu terapii łagodzących skutki tego typu infekcji.

## Literatura

- [1] Nejman B., Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn G., Węgrzyn A. 2009. Plasmids derived from lambdoid bacteriophages as models for studying replication of mobile genetic elements responsible for production of Shiga toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 17: 211-220.

- [2] Nejman B., Nadratowska-Wesołowska B., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn A., Węgrzyn G. 2011. Replication of plasmids derived from Shiga toxin-converting bacteriophages in starved *Escherichia coli*. *Microbiology* 157: 220-233.
- [3] Nejman-Faleńczyk B., Golec P., Maciąg M., Węgrzyn A., Węgrzyn G. 2012. Inhibition of development of Shiga toxin-converting bacteriophages, after prophage induction in *Escherichia coli*, by either treatment with citrate or amino acid starvation. *Foodborne Pathogens and Disease* 9: 13-19.