

**„Rola genów i otwartych ramek odczytu zlokalizowanych  
w rejonie *exo-xis* fagów lamdoidalnych w rozwoju tych fagów”  
mgr Aleksandra Dydecka**

W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się informacje na temat infekcji wywołanych przez enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (ang. Enterohemorrhagic *E. coli* – EHEC). Występowanie bakterii EHEC ma zasięg globalny. Świadczą o tym zatrucia pokarmowe wykrywane w różnych krajach świata m.in. w USA, Kanadzie, Japonii, a także w państwach Unii Europejskiej. Jedną z największych epidemii wywołanych enterokrwotocznymi szczepami *E. coli* odnotowano w Japonii, w 1996 roku. Zarejestrowano wówczas ponad 10 tysięcy zachorowań, z których większość dotyczyła dzieci w wieku szkolnym (Watanabe, 1999). W Europie do największej w ostatnich latach epidemii doszło w 2011 roku, w Niemczech. Odnotowano wówczas 54 przypadki śmiertelne. Źródłem infekcji okazały się importowane z Egiptu kiełkujące nasiona kozieradki, które skażone były pałeczkami *E. coli* O104:H4 (Frank i wsp., 2011; Bloch i wsp., 2012). Głównym rezerwuarem bakterii EHEC jest bydło, ale występują one także w przewodach pokarmowych innych zwierząt hodowlanych: owiec, kóz i drobiu, jednakże nie wywołują u nich objawów chorobowych. Wydalane ze zwierzęcymi odchodami bakterie przedostają się na pola uprawne, skąd mogą zanieczyszczać wodę, owoce i warzywa, które z kolei stanowią bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia człowieka (Gyles, 2007).

Za objawy związane z infekcjami bakteriami EHEC odpowiedzialne są produkowane przez nie toksyny Shiga. Kodujące te czynniki wirulencji geny *stx* zlokalizowane są w genomach bakteriofagów określanych mianem fagów przenoszących geny toksyn Shiga (w skrócie Stx), występujących w bakteriach w postaci profagów. Fagi Stx należą do rodziny fagów lamdoidalnych i wykazują duże podobieństwo do dobrze poznanego faga  $\lambda$  na poziomie organizacji genomu oraz pod względem przebiegu cyklu życiowego (Campbell, 1994). Należy podkreślić, iż szczepy EHEC uwalniają niebezpieczną dla człowieka toksynę Shiga wyłącznie po indukcji profaga, w wyniku litycznego rozwoju faga Stx. Uwolniona w jelitach toksyna przedostaje się do światła naczyń krwionośnych i wraz z krwią jest rozprzestrzeniana po organizmie m.in. do organów takich jak nerki czy mózg (Muniesa i wsp., 2012). W większości przypadków efektem infekcji jest ostre zatrucie pokarmowe, objawiające się ostrym, nagłym bólem brzucha i krwawą biegunką. Zdarza się jednak, że dochodzi do powikłań i rozwoju przewlekłych schorzeń takich jak np. zespół hemolityczno-mocznicowy, które mogą prowadzić do śmierci pacjenta, szczególnie jeśli infekcja dotyczy dziecka lub osoby starszej (Karakulska, 2002; Serna & Boedeker, 2008).

Podobnie jak bakteriofag  $\lambda$ , fagi Stx również należą do tzw. fagów łagodnych. W zależności od warunków środowiska mogą one wybrać jedną z dwóch dróg rozwojowych, lityczną bądź lizogeniczną. Decyzja odnośnie wyboru ścieżki rozwojowej jest zależna przede wszystkim od stanu fizjologicznego komórki gospodarza i liczby cząstek wirusowych infekujących bakterie. Droga lityczna prowadzi do namnożenia faga, produkcji dużej ilości toksyny Shiga i lizy komórki gospodarza. Z kolei w stadium lizogenicznym, genom bakteriofaga jest zintegrowany z chromosomem bakteryjnym w formie profaga i wraz z nim replikowany. Stan lizogenii jest etapem przejściowym w rozwoju fagów. Na skutek działania różnych czynników wywołujących bakteryjną odpowiedź S.O.S, takich jak np. promienie UV, antybiotyki, czy reaktywne formy tlenu, możliwa jest indukcja profaga i uruchomienie cyklu litycznego (Kobiler i wsp., 2005; Węgrzyn & Węgrzyn 2005). Co ciekawe, wykazano, że w organizmie człowieka takim naturalnym induktorem może być nadtlenek wodoru, który jest produkowany przez pojawiające się podczas infekcji bakteryjnej neutrofile (Łoś i wsp., 2013).

Wiadomo, że na poziomie molekularnym wybór odpowiedniej drogi rozwoju przez bakteriofaga  $\lambda$  jest zależny od obecności określonych białek fagowych. Kluczowe jest tutaj współzawodnictwo pomiędzy istotnym dla rozwoju litycznego białkiem Cro, a głównym represorem cyklu litycznego, białkiem cI, które hamuje transkrypcję z dwóch wczesnych promotorów fagowych:  $pL$  i  $pR$ , umożliwiając tym samym utrzymanie faga w stanie lizogenii. Co istotne, do autoproteolizy białka cI dochodzi podczas odpowiedzi S.O.S. Trzecim istotnym dla tego etapu białkiem jest cII będące aktywatorem trzech promotorów fagowych  $pE$ ,  $pI$  oraz  $paQ$  (Węgrzyn *i in.*, 2005). Aktywacja tych promotorów prowadzi do powstania produktów wykazujących właściwości „pro-lizogeniczne” (Łoś i wsp., 2008). Pomimo, iż podstawy biochemiczne reakcji zachodzących na etapie podjęcia przez faga  $\lambda$  decyzji „liza czy lizogenia” zostały stosunkowo dobrze poznane, to wiedza w zakresie regulacji tego procesu nie jest nadal kompletna (Łoś i wsp., 2008; Węgrzyn i wsp, 2012; Bloch i wsp., 2013). Co więcej, dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na istotne różnice w rozwoju fagów  $\lambda$  i Stx (Nejman i wsp., 2009, 2011), w związku z tym wiedza wynikająca z badań dotyczących bakteriofaga  $\lambda$  nie powinna odnosić się do fagów Stx bez eksperymentalnej weryfikacji. W tym świetle, szczegółowe poznanie regulacji rozwoju fagów Stx, a przede wszystkim etapu wyboru określonej drogi rozwoju oraz wszelkich czynników zaangażowanych w lityczny rozwój tych fagów, wydają się być kluczowe dla zrozumienia podstaw patogenności szczepów EHEC.

Z dostępnych do tej pory danych literaturowych oraz wcześniejszych badań zespołu, do którego dołączyłam na początku moich studiów doktoranckich wynikało, iż w rozwój lityczny fagów Stx mogą być zaangażowane produkty słabo scharakteryzowanego rejonu znajdującego się pomiędzy genami *exo* i *xis* w genomach tych fagów. W przypadku faga  $\lambda$  rejon ten składa się z dwóch genów *ea22* i *ea8.5* oraz pięciu otwartych ramek odczytu (ORF): *orf60a*, *orf63*, *orf61*, *orf73* i *orf55*. Natomiast u przedstawiciela fagów Stx, bakteriofaga  $\Phi 24_B$ , rejon ten zawiera dodatkowe otwarte ramki odczytu i pozbawiony jest genu *ea8.5*. Pierwsze doniesienia na temat roli rejonu *exo-xis* w regulacji rozwoju litycznego faga  $\lambda$  pojawiły się w 2002 roku. Wówczas to wykazano, że rejon ten wpływa na regulację cyklu komórki bakteryjnej, wywołując tymczasowe zatrzymanie podziału komórki oraz zahamowanie procesu inicjacji replikacji DNA. Zasugerowano również, że efekt ten wpływa stymulująco na wydajność replikacji fagowego DNA podczas cyklu litycznego ze względu na większą dostępność bakteryjnych białek replikacyjnych, z których fag korzysta na tym etapie rozwoju (Sergueev i wsp., 2002). Kolejne doniesienia w tym temacie wskazują, że rejon *exo-xis* wpływa na obniżenie poziomu transkrypcji z promotorów zależnych od białka cII i istotnych z punktu widzenia cyklu lizogenicznego, czyli *pE*, *pI* oraz *paQ* (Łoś i wsp., 2008). Co ciekawe, w warunkach nadekspresji rejonu *exo-xis* dochodzi także do obniżenia wydajności lizogenizacji i przeżywalności bakterii *E. coli* po infekcji fagami  $\lambda$  oraz  $\Phi 24_B$ , a tym samym również do zwiększenia wydajności indukcji tych profagów (Łoś i wsp., 2008; Bloch i wsp., 2013). Dowiedziono również, że profil ekspresji kluczowych genów fagowych, jak i genów oraz otwartych ramek odczytu z rejonu *exo-xis* jest odmienny podczas procesu infekcji oraz indukcji profaga (Bloch i wsp., 2014).

Informacje te niewątpliwie świadczą o istotności wspomnianego rejonu w regulacji rozwoju fagów  $\lambda$  i Stx. Uzasadnione wydało się zatem zbadanie funkcji poszczególnych otwartych ramek odczytu i genów z rejonu *exo-xis*, tym bardziej, że tylko jeden gen z tego rejonu, *ea8.5*, został wcześniej szczegółowo scharakteryzowany. Wykazano, że gen *ea8.5* koduje białko regulatorowe o specyficznej strukturze, zawierające homeodomenę oraz motyw palca cynkowego, których obecność wskazuje na jego zdolność do wiązania DNA, a co za tym idzie możliwość tworzenia kompleksów nukleoproteinowych (Kwan i wsp., 2013). Co więcej, wskazano na udział Ea8.5 na etapie podjęcia przez faga decyzji „liza czy lizogenia” i wykazano jego negatywny wpływ na aktywność promotorów *pI* oraz *paQ* (Łoś i wsp., 2008). Ze względu na fakt, iż obserwowane efekty zahamowania aktywności tych promotorów w warunkach nadekspresji genu *ea8.5* nie były tak spektakularne jak w przypadku obecności w komórce wielu kopii całego rejonu *exo-xis* na plazmidzie (Łoś

i wsp., 2008), zasugerowano udział także innych produktów z tego rejonu w tej regulacji. Mając to na uwadze, podjęłam się realizacji badań mających na celu analizę biologicznego znaczenia innych sekwencji z rejonu *exo-xis*. Z racji tego, że wcześniejsze badania dotyczące rejonu *exo-xis* były prowadzone w warunkach jego nadekspresji, postanowiono zastosować odmienne podejście, oparte na konstrukcji fagowych mutantów delecyjnych pozbawionych sekwencji całego rejonu, jak i poszczególnych otwartych ramek odczytu. Mutanty zostały przygotowane z wykorzystaniem techniki rekombinacji homologicznej (Nejman-Faleńczyk i wsp., 2015), a głównym celem prowadzonych przeze mnie badań było wyjaśnienie roli wybranych elementów genetycznych rejonu *exo-xis* w procesie rozwoju fagów lambdoidalnych. W swoich badaniach wykorzystałam bakteriofaga  $\lambda$ , jako modelowego wirusa w biologii molekularnej, oraz faga  $\Phi 24_B$ , przedstawiciela fagów Stx.

Badania rozpoczęte zostały od zbadania wpływu usunięcia całego rejonu *exo-xis* lub poszczególnych jego fragmentów na wymuszoną nadtlenciem wodoru lub światłem UV indukcję profaga [**praca nr 1**]. Uzyskane wyniki wskazują, że delecja rejonu *exo-xis* z genomu faga  $\Phi 24_B$  skutkuje drastycznym upośledzeniem procesu indukcji profaga z komórek bakteryjnych *E. coli* po potraktowaniu ich nadtlenciem wodoru, natomiast nie wywołuje takiego efektu przy zastosowaniu jako induktora światła UV. Wykrywana liczba cząstek fagowych uwalnianych po indukcji nadtlenciem wodoru mutantu  $\Phi 24_B \Delta \textit{exo-xis}$  odpowiada poziomowi indukcji spontanicznej, czyli oznaczonej wartości z próby kontrolnej bez dodatku induktora. Co ciekawe, delecja rejonu *exo-xis* z genomu faga  $\lambda$  skutkuje jedynie nieznacznym opóźnieniem procesu indukcji wywołanej nadtlenciem wodoru. Ponadto, w porównaniu z fagiem typu dzikiego, delecja rejonu *exo-xis* z genomu faga  $\Phi 24_B$  skutkuje znacznym obniżeniem poziomu ekspresji fagowych genów regulatorowych oraz genów bakteryjnych biorących udział w odpowiedzi S.O.S. Podobny, aczkolwiek nie tak spektakularny efekt wywołało usunięcie sekwencji rejonu *exo-xis* z genomu faga  $\lambda$ . Z kolei usunięcie z genomów fagów  $\lambda$  i  $\Phi 24_B$  poszczególnych otwartych ramek odczytu lub genów zlokalizowanych w rejonie *exo-xis* wywołuje opóźnienie procesu wymuszonej nadtlenciem wodoru indukcji, jedynie w przypadku mutantów delecyjnych faga  $\Phi 24_B$ . Co ciekawe, światło UV nie powoduje takiego efektu w żadnym z analizowanych mutantów delecyjnych [**praca nr 1**]. Na tej podstawie wysunięty został wniosek, że zakodowane w rejonie *exo-xis* produkty mają znaczenie w indukowanej nadtlenciem wodoru odpowiedzi S.O.S. Podjęłam się zatem wykonania funkcjonalnej charakterystyki wybranych otwartych ramek odczytu. Mając na uwadze, że dobrze zachowane ewolucyjnie sekwencje mogą mieć istotne znaczenie

biologiczne, zdecydowałam się szczegółowo zbadać trzy kolejne ORF (*orf60a*, *orf63* i *orf61*) znajdujące się na początku rejonu *exo-xis* i wyróżniające się bardzo wysoko zakonserwowanymi w genomach fagów lambdoidalnych sekwencjami.

Jako pierwszy analizie poddany został *orf63*. W kolejnej **pracy nr 2** wykazaliśmy, że otwarta ramka odczytu *orf63* jest funkcjonalnym genem, kodującym małe białko zawierające struktury  $\alpha$ -helikalne. Wpływ usunięcia sekwencji kodującej Orf63 badałam na różnych etapach rozwoju fagów  $\lambda$  oraz  $\Phi24_B$ . W pierwszej kolejności dokonałam analizy wpływu delecji tej sekwencji na proces indukcji profagów wymuszonej nadtleniem wodoru. Rozwój lityczny fagów analizowałam w czasie na podstawie pojawiających się potomnych cząstek fagowych. Zaobserwowałam, że w porównaniu z fagami typu dzikiego, u mutantów  $\lambda\Delta orf63$  oraz  $\Phi24_B\Delta orf63$  nastąpiło obniżenie wydajności rozwoju litycznego, a w przypadku mutantu delecyjnego  $\Phi24_B$  dodatkowo także opóźnienie momentu uwolnienia pierwszych potomnych cząstek fagowych. Co ciekawe, wykonując analizę kinetyki litycznego rozwoju tych fagów (w doświadczeniu typu „one step growth”) zaobserwowałam jedynie nieznaczne podwyższenie plonu fagowego u mutantów. Wskazuje to niewątpliwie na upośledzenie wydajności procesu indukcji profaga przy braku funkcjonalnego białka Orf63. Dodatkowo przeprowadzona analiza ekspresji genów fagowych podczas procesu indukcji profagów lambdoidalnych typu dzikiego oraz mutantów fagowych z delecją *orf63* wykazała obniżenie poziomu ekspresji u obydwu mutantów delecyjnych. Z kolei, analiza ekspresji genów wykonana w doświadczeniu komplementacji, z wykorzystaniem lizogennych mutantami delecyjnymi komórek gospodarza, dodatkowo niosących plazmid z kopią usuniętego genu: pUC18\_ $\lambda$ \_*orf63* lub pUC18\_ $\Phi24_B$ \_*orf63*, pozwoliła zaobserwować przywrócenie ekspresji analizowanych genów do pierwotnego poziomu jedynie w przypadku mutantu  $\lambda\Delta orf63$ . Ponieważ uzyskane wyniki są zbliżone do wyników uzyskanych dla bakteriofaga typu dzikiego, tj. bez wprowadzonych zmian w jego genomie, można przypuszczać, że funkcje rejonu *exo-xis* zostały w pełni przywrócone. Efekt ten nie został natomiast zaobserwowany w doświadczeniu z komplementacją delecji *orf63* u faga  $\Phi24_B$ . Może świadczyć to o tym, że do prawidłowej regulacji rozwoju litycznego fagów Stx potrzebna jest odpowiednia ilość białka Orf63, która w tym przypadku nie została jednak osiągnięta. Oprócz wspomnianych powyżej efektów, usunięcie sekwencji *orf63* z genomów fagów  $\lambda$  oraz  $\Phi24_B$  wywołało również wzrost wydajności lizogenizacji oraz zwiększenie frakcji bakterii, które przeżyły infekcję. Wyniki te są zgodne z tymi opisanymi powyżej i niewątpliwie świadczą o ważnej funkcji Orf63 w litycznym rozwoju fagów lambdoidalnych [**praca nr 2**]. Co ciekawe, doświadczenia przeprowadzone przez innych naukowców (Blasche i wsp., 2013)

z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego, wykazały, że Orf63 oddziałuje z białkiem YqhC. Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym, umożliwiającym produkcję enzymu (YqhD) odpowiedzialnego z kolei za obniżenie poziomu, powstających w komórce w warunkach stresu oksydacyjnego, reaktywnych form tlenu. Wydaje się, że Orf63 bezpośrednio hamuje aktywność YqhC a pośrednio również YqhD i tym samym zapobiega wyciszeniu komórkowej odpowiedzi na warunki stresu oksydacyjnego. Skutkiem tego, wzrasta w komórce poziom reaktywnych form tlenu i następuje uruchomienie odpowiedzi SOS, a tym samym lityczny rozwój faga [praca nr 2].

W kolejnej **pracy nr 3**, wykazałam, że za promowanie rozwoju litycznego fagów  $\lambda$  i Stx odpowiadają również dwie inne otwarte ramki odczytu znajdujące się pomiędzy genami *exo* i *xis*, a mianowicie *orf61* i *orf60a*. Z analizy ich sekwencji nukleotydowej, a także analizy domniemanej sekwencji aminokwasowej ich potencjalnych produktów wynika, że są one bardzo dobrze zachowane w genomach fagów lambdoidalnych (wykazują ponad 90% podobieństwo). Mając to na uwadze postanowiłam zbadać ich znaczenie biologiczne. W tym celu wykorzystywałam zrekombinowane profagi z delecją *orf61* lub *orf60a*. Zaobserwowałam, że usunięcie tych sekwencji z genomu faga  $\Phi_{24B}$  wywołuje opóźnienie indukcji profaga oraz obniżenie wydajności rozwoju litycznego po zastosowaniu jako induktora nadtlenu wodoru. Co ciekawe, opóźnienia indukcji profaga nie odnotowałam po usunięciu żadnej z analizowanych sekwencji z genomu faga  $\lambda$ , natomiast w określonych czasach po indukcji wszystkich badanych mutantów delecyjnych nadtlaniem wodoru, zauważyłam wyższą przeżywalność komórek gospodarza. Następnie przetestowałam znaczenie wprowadzonych zmian delecyjnych w procesie infekcji komórek bakteryjnych ww. fagami. Analizując wewnątrzkomórkowy cykl rozwojowy faga podczas jednego cyklu infekcyjnego, nie zauważyłam znaczących różnic pomiędzy mutantami a fagami typu dzikiego. Z kolei odnotowałam wzrost przeżywalności komórek bakteryjnych po infekcji fagami pozbawionymi sekwencji *orf60a* lub *orf61* w porównaniu do infekcji bakteriofagami typu dzikiego. Chcąc zbadać przyczynę takiego efektu, sprawdziłam efektywność procesu lizogenizacji bakterii *E. coli* ww. fagami. Proces tworzenia lizogenów okazał się być bardziej wydajny w przypadku wszystkich analizowanych mutantów. Na tej podstawie wysunęłam wniosek, że *orf61* oraz *orf60a* pełnią funkcję regulacyjną, szczególnie na etapie decyzji o wyborze określonej drogi rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych. Warte uwagi są również wyniki analizy adsorpcji fagów do powierzchni komórek bakteryjnych. Zaskakująco, wydajność tego procesu w przypadku mutantów  $\Phi_{24B}$  pozbawionych *orf60a* oraz *orf61* okazała się niższa w porównaniu do faga typu dzikiego. Pozwala to spekulować, że produkty

kodowane przez te sekwencje są zaangażowane w proces tworzenia wirionów fagowych, a ich brak prowadzi do powstawania wirionów niezdolnych do skutecznej adsorpcji na powierzchni komórki gospodarza. Podejrzewa się udział kodowanych przez *orf61* oraz *orf60a* produktów w kontroli ekspresji genów kodujących białka kapsydu lub bezpośrednio uczestnictwo w interakcjach międzycząsteczkowych podczas procesu tworzenia wirionów. Chociaż szczegółowe funkcje wspomnianych produktów są jak dotąd nieznane, uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że analizowane otwarte ramki odczytu kodują funkcjonalne, istotne w rozwoju fagów lambdoidalnych białka. Świadczą o tym również wykryte za pomocą RT-qPCR transkrypty pochodzące z *orf60a* i *orf61a* (Bloch i wsp., 2014). Poza tym, eksperymenty z wykorzystaniem techniki profilowania rybosomów, mające na celu zidentyfikowanie sieci białek produkowanych przez bakteriofaga  $\lambda$ , wykazały obecność produktów białkowych kodowanych przez *orf60a* i *orf61* w komórkach *E. coli* po indukcji profaga (Liu i wsp., 2013). O obecności białka Orf61 mogą świadczyć również interakcje produktu *orf61* z produktami genów *int* oraz *orf-314*, wykryte w drożdżowym systemie dwuhybrydowym (Rajagopala i wsp., 2011). Niestety podjęte przez nasz zespół próby oczyszczenia białek Orf60a i Orf61 nie powiodły się [**praca nr 3**].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy prowadzą nie tylko do poszerzenia wiedzy teoretycznej na temat fagów lambdoidalnych (w tym fagów niosących geny toksyn Shiga), ale dostarczają również istotnych informacji na temat funkcji analizowanych genów z rejonu *exo-xis*. Uzyskane dane potwierdzają istotną rolę rejonu *exo-xis* i zakodowanych w jego obrębie produktów w regulacji rozwoju fagów lambdoidalnych, szczególnie na etapie decyzji „liza czy lizogenia”. Trzy z analizowanych przeze mnie elementów genetycznych: *orf63*, *orf61* i *orf60a* odgrywają ważną rolę w rozwoju litycznym fagów lambdoidalnych. Co istotne jednak, pomimo wysokiego podobieństwa analizowanych sekwencji, szczegółowa analiza ich roli w rozwoju fagów  $\lambda$  i Stx wykazała pewne różnice. Jest to kolejny dowód na to, że wiedza uzyskana w ramach badań przeprowadzonych na modelowym bakteriofagu  $\lambda$  nie powinna być bezpośrednio przenoszona na fagi Stx i wymagana jest jej eksperymentalna weryfikacja. Poza tym, niniejsza praca dowodzi, że pomimo wieloletnich badań nad fagiem  $\lambda$ , w jego genomie w dalszym ciągu występują niescharakteryzowane rejony sekwencji, mogące mieć istotne znaczenie biologicznie. Określenie ich funkcji może mieć znaczenie poznawcze, a w przypadku fagów Stx również praktyczne, pozwalające zidentyfikować nowe cele molekularne, na które mogłaby być ukierunkowana terapia przeciwko infekcjom EHEC.

Brak skutecznych leków przeciwko EHEC sprawia, iż wdrożenie alternatywnej terapii jest obecnie niezwykle pożądane.

### Cytowana literatura:

1. Blasche S, Wuchty S, Rajagopala SV, Uetz P. (2013) The protein interaction network of bacteriophage lambda with its host, *Escherichia coli*. *Journal of Virology* 87:12745-12755.
2. Bloch S, Felczykowska A, Nejman-Faleńczyk B. (2012) *Escherichia coli* O104:H4 outbreak--have we learnt a lesson from it? *Acta Biochimica Polonica*. 59 (4): 483–438.
3. Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Dydecka A, Łoś JM, Felczykowska A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2014) Different Expression Patterns of Genes from the *Exo-Xis* Region of Bacteriophage  $\lambda$  and Shiga Toxin-Converting Bacteriophage  $\Phi$ 24<sub>B</sub> following Infection or Prophage Induction in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 9(10): e108233.
4. Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Łoś JM, Barańska S, Łeppek K, Felczykowska A, Łoś M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2013) Genes from the *exo-xis* region of  $\lambda$  and Shiga toxin-converting bacteriophages influence lysogenization and prophage induction. *Archives of Microbiology*. 195(10-11):693–703.
5. Campbell A. (1994) Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annual Review of Microbiology*. 48:193-222.
6. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*. 365 (19): 1771–1780.
7. Gyles CL. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*. 85: 45–62.
8. Karakulska J. (2002) Ocena praktycznej przydatności wybranych fenotypowych i genotypowych wyznaczników patogenności enterotoksycznych i enterokrwotocznych pałeczek *E.coli*. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*. 54: 119-127.
9. Kobiler O, Rokney A, Friedman N, Court DL, Stavans J, Oppenheim AB. (2005) Quantitative kinetic analysis of the bacteriophage  $\lambda$  genetic network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(12): 4470–4475.

10. Kwan JJ, Smirnova E, Khazai S, Evanics F, Maxwell KL, Donaldson LW. (2013) The solution structures of two prophage homologues of the bacteriophage  $\lambda$  Ea8.5 protein reveal a newly discovered hybrid homeodomain/zinc-finger fold. *Biochemistry*. 52: 3612–3614.
11. Łoś JM, Golec P, Węgrzyn G, Węgrzyn A, Łoś M. (2008) Simple method for plating *Escherichia coli* bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:5113–5120.
12. Łoś JM, Łoś M., Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2008) Role of the bacteriophage *exo-xis* region in the virus development. *Folia Microbiologica*. 53(5): 443-450.
13. Łoś JM, Łoś M, Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2013) Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2(166): 1-8.
14. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüßow H. (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4065–4073.
15. Nejman B, Łoś JM, Łoś M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2009) Plasmids derived from lambdoid bacteriophages as models for studying replication of mobile genetic elements responsible for the production of Shiga toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 17:211–220.
16. Nejman-Falencyk B, Bloch S, Licznarska K, Dydecka A, Felczykowska A, Topka G, Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2015) A small, microRNA-size, ribonucleic acid regulating gene expression and development of Shiga toxin-converting bacteriophage  $\Phi$ 24<sub>B</sub>. *Scientific Report*. 5:10080.
17. 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.
18. Rajagopala SV, Casjens S, Uetz P. (2011) The protein interaction map of bacteriophage lambda. *BMC Microbiology*. 11:213.
19. Sergueev K, Court D, Reaves L, Austin S. (2002) *E. coli* cell-cycle regulation by bacteriophage  $\lambda$ . *Journal of Molecular Biology*. 324:297–307.
20. Serna A, Boedeker EC. (2008) Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*. 24: 38-47.

21. Watanabe Y, Ozasa K, Mermin JH, Griffin PM, Masuda K, Imashuku S. (1999) Factory Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infection in Japan. *Emerging Infectious Diseases*. tom 5, nr 3.
22. Węgrzyn G, Licznarska K, Węgrzyn A. (2012) Phage  $\lambda$ —new insights into regulatory circuits. *Advances in Virus Research*. 82:155-17.
23. Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2005) Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 79:1-48.

**Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:**

**Praca nr 1:** Licznarska K, **Dydecka A**, Bloch S, Topka G, Nejman-Faleńczyk B, Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2016) The role of the *exo-xis* region in oxidative stress-mediated induction of Shiga toxin-converting prophages. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, 8453135.

**Praca nr 2:** **Dydecka A**, Bloch S, Rizvi A, Perez S, Nejman-Faleńczyk B, Topka G, Gąsior T, Necel A, Węgrzyn G, Donaldson LW, Węgrzyn A. (2017) Bad phages in good bacteria: role of the mysterious *orf63* of  $\lambda$  and Shiga toxin-converting  $\Phi24_B$  bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*. 8:1618.

**Praca nr 3:** **Dydecka A**, Nejman-Faleńczyk B, Bloch S, Topka G, Necel A, Donaldson LW, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2018) Roles of *orf60a* and *orf61* in development of bacteriophages  $\lambda$  and  $\Phi24_B$ . *Viruses*. 10(10): 553.