

Molekularne mechanizmy kontroli rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych kodujących toksyny Shiga

Dariusz Nowicki

Toksyny Shiga wytwarzane są przez bakterie naturalnie występujące w środowisku i należą do jednych z najsilniej działających toksyn. Pierwsze doniesienia na temat schorzeń wywołanych tymi toksynami sięgają końca XIX wieku i związane one były z infekcjami pałeczkami *Shigella dysenteriae*. Dziś, najpoważniejsze zagrożenie stanowią szczepy związane z przedstawicielami grupy Shiga-toksycznych *Escherichia coli* - STEC, u których produkcja toksyn stanowi o zjadliwości szczepów. Prowadzone w późniejszych latach badania pozwoliły na szczegółowy opis budowy i funkcji tych białek zaliczanych do egzotoksyn typu A₁B₅. Pojedyncza podjednostka A wchodząca w skład kompleksu jest cząsteczką efektorową, natomiast podjednostka B (w postaci pentameru) odpowiada za wiązanie do specyficznych receptorów Gb₃ na błonie komórkowej komórek nabłonków. Wiązanie to poprzedza transport retrogradowy do wnętrza komórek nabłonka, gdzie w następstwie proteolizy, uwalniana jest do cytozolu aktywna podjednostka A toksyny. Aktywność N-glikozydazy pozwala podjednostce A na modyfikację cząsteczki 28S rRNA rybosomów. Specyficzność miejsca cięcia reszty adeniny w pozycji 4324 kwasu nukleinowego powoduje upośledzenie wiązania czynnika elongacyjnego w procesie translacji i w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia funkcji komórek eukariotycznych.

Środowiskowym rezerwuarem szczepów STEC jest trzoda chlewna, bydło i inne zwierzęta gospodarcze, w których bakterie te stanowią naturalny składnik flory przewodu pokarmowego. STEC są czynnikiem etiologicznym zatruc pokarmowych u ludzi. Do zakażeń dochodzi poprzez kontakt z zakażonymi produktami rolnymi pochodzącymi z hodowli zwierząt takimi jak mięso bądź niepasteryzowane mleko, a także poprzez zakażone warzywa, owoce czy nawet woda. Zakażenia zwykle przebiegają w postaci łagodnych zatruc pokarmowych. Jednak w niektórych przypadkach, dotyczących głównie osób z deficytem odporności (takich jak osoby starsze i dzieci), często dochodzi do rozwoju ciężkich powikłań. Za rozwój najpoważniejszych objawów odpowiedzialne są szczepy z grupy enterokrwotocznych *E. coli* EHEC (wyodrębnionej ze szczepów STEC). Wśród nich są to: biegunka krwotoczna, małopłytkowa plamica zakrzepowa oraz zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS). Powikłania te stanowią bezpośrednie zagrożenie zdrowia i życia pacjentów, gdyż śmiertelność w grupie osób, u których doszło do rozwoju HUS, dochodzi

do 10%. Należy podkreślić, iż w dalszym ciągu słabo poznana ekologia i etiologia zakażeń szczepami STEC stanowi ogromne wyzwanie epidemiologiczne oraz ekonomiczne. Może o tym świadczyć ostatnia epidemia na skalę światową z 2011 roku, która rozprzestrzeniła się z Niemczech, dotykając ponad 4000 osób, z których aż 830 zapadło na powikłania w postaci zespołu hemolityczno-mocznicowego oraz odnotowano 54 przypadki śmiertelne. Tak duża skala zachorowań przełożyła się także na wymierne straty ekonomiczne, związane zarówno z koniecznością pomocy epidemiologiczno-sanitarnej, jak również ze względu na straty producentów żywności, których koszty ocenia się na 3-6 mld Euro.

Za przenoszenie genów toksyn Shiga (*stx*) w komórkach gospodarza odpowiedzialne są wirusy bakteryjne zaliczane do grupy bakteriofagów lambdoidalnych, sklasyfikowanych w obrębie rodzaju *Caudovirales* (zaliczanych do rodzin *Siphoviridae* bądź *Podoviridae*, odpowiednio długo- bądź krótko-ogonkowe). Ich cykl życiowy, morfologia i aranżacja genomu wykazuje podobieństwo do modelowego w biologii molekularnej faga λ . Wirusy te są zdolne do infekcji komórki gospodarza poprzez wiązanie się do białka błonowego BamA i wprowadzenie materiału genetycznego do komórki bakteryjnej. Bakteriofagi te cechują się zdolnością do integracji genetycznej z chromosomem gospodarza i występowania w postaci profaga. Na tym etapie rozwoju ekspresja większości genów jest zahamowana (z wyjątkiem genu represora *cI*), a stan taki nazywany jest lizogenią. Warto nadmienić, iż silnie konserwowane ewolucyjnie wśród *Enterobacteriaceae* białko BamA stanowi uniwersalny cel molekularny dla rozwoju infekcji fagowych. Ta istotna cecha umożliwia horyzontalny transfer genów, w tym także przenoszenie czynników wirulencji, nie tylko w obrębie szczepów STEC. Za najbardziej powszechny szczep związany z zakażeniami szczepami EHEC uważa się O157:H7, który był przyczyną pierwszej dużej epidemii w 1982 roku w USA. Obecnie odnotowuje się pojawianie się nowych serotypów *E. coli* zdolnych do wytwarzania toksyn Shiga, które cechują się większą zjadliwością i odpornością na czynniki środowiskowe jak niskie pH i zmiany temperatury, jak również opornością na antybiotyki. Ze względu na położenie genów *stx* w genomach poznanych bakteriofagów *Stx* w obrębie genów odpowiedzialnych za lizę komórki gospodarza pozostają one pod kontrolą późnych promotorów fagowych p_R , a produkcja toksyn jest ściśle związana z rozwojem litycznym wirusów. Do wytwarzania toksyn może dojść tylko po indukcji profaga oraz wycięciu jego DNA z chromosomu gospodarza. W konsekwencji prowadzi to do powielania materiału genetycznego wirusa w procesie replikacji, a następnie do ekspresji elementów strukturalnych faga oraz składaniu jego wirionów potomnych. Ostatecznie dochodzi do lizy komórki

gospodarza i propagacji wirusa w środowisku. Wraz z uwolnionymi cząsteczkami wirusa do światła jelita uwalniane jest także białko toksyny.

Bakteriofagi nie posiadają własnych kompletnych systemów odpowiedzialnych za samodzielnie przeprowadzenie procesu replikacji fagowego DNA oraz syntezy elementów struktury. Wykorzystują one w tym celu maszynę komórkową gospodarza. Na wybór jednej z dróg rozwoju: liza lub lizogenia, kluczowy wpływ ma stan fizjologiczny komórek bakteryjnych, a także czynniki środowiskowe, takie jak zasobność w substancje odżywcze, temperatura otoczenia, wartość pH. W celu koordynacji procesów życiowych zachodzących w zmiennych warunkach otoczenia komórek, bakterie wytworzyły szereg mechanizmów kontroli pozwalających na utrzymanie stabilności metabolicznej i genetycznej. Dzisiejszy stan wiedzy niedostatecznie wyjaśnia w jaki sposób rozwój bakteriofagów lambdoidalnych w komórkach gospodarza podlega regulacji z udziałem takich procesów.

Indukcja wirusa z formy profaga, wymaga aktywacji bakteryjnej odpowiedzi SOS w komórkach. Do tej odpowiedzi dochodzi w wyniku oddziaływania czynników prowadzących do powstawania uszkodzeń nici DNA. Do takich czynników należą: występujący naturalnie w przewodzie pokarmowym nadtlenek wodoru a także niektóre antybiotyki, których aktywność prowadzi w sposób pośredni lub bezpośredni do uszkodzeń materiału genetycznego. Aktywacja cyklu litycznego odbywa się wtedy poprzez unieczynnienie białka represora CI przez bakteryjne białko RecA a w konsekwencji do replikacji potomnych cząstek fagowych. Taki mechanizm indukcji sprawia, iż zwalczanie zakażeń STEC za pomocą antybiotyków jest znacznie ograniczone, i może stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia pacjenta.

Bakteriofagi lambdoidalne kodujące toksyny Shiga mimo znacznego podobieństwa do bakteriofaga λ nie są jednak grupą homogeną. Wykazują one między sobą pewne różnice genetyczne, zarówno w sekwencji poszczególnych genów jak i ich aranżacji. Różnice te mogą mieć istotny wpływ na regulację rozwoju tych bakteriofagów w komórkach gospodarza *E. coli*, a także przekładać się na ilość wytwarzanej przez nie toksyny. Ponadto, niewielka jest też dziś wiedza o tym, jaką rolę odgrywają procesy wewnątrzkomórkowe w efektywności rozwoju bakteriofaga na poszczególnych jego etapach. Co więcej, dotychczas nie opracowano skutecznych i jednocześnie bezpiecznych dla pacjentów metod walki z zakażeniami powodowanymi przez szczepy typu STEC. Badania nad podstawowymi mechanizmami regulacji cyklu rozwojowego bakteriofagów są więc niezbędne i kluczowe w rozwiązaniu problemu patogenności bakterii, z którymi są one związane.

Dlatego, przeprowadzone przeze mnie badania, które stały się przedmiotem tej rozprawy doktorskiej, miały na celu identyfikację molekularnych mechanizmów leżących u podstaw regulacji rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych kodujących toksyny Shiga i ich wykorzystanie w kontroli rozwoju wirusów oraz patogenyzy szczepów STEC.

W moich badaniach posłużyłem się modelowymi przedstawicielami bakteriofagów lambdoidalnych: Φ 24B, 933W, P22, P27, P32 (Stx) oraz bakteriofagiem λ , aby zbadać, w jaki sposób zmiany w komórkach gospodarza wpływają na przebieg ich cyklu życiowego. Ze względu na fakt, iż replikacja materiału genetycznego jest istotnym etapem warunkującym dalsze etapy rozwoju bakteriofagów, wykorzystałem plazmidy zawierające origin replikacji pochodzące od tych wirusów. Dobrany w ten sposób zróżnicowany zestaw przedstawicieli wirusów lambdoidalnych oraz faga λ a także pochodzących od nich plazmidów, jako modeli replikonów (zdolnych do niezależnej replikacji w komórkach *E. coli*) posłużył do weryfikacji hipotezy: czy rozwój badanych bakteriofagów podlega jednakowej regulacji za pośrednictwem globalnych mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórce gospodarza?

Jedną z podstawowych reakcji komórki w odpowiedzi na bodźce stresowe ze środowiska zewnętrznego jest kontrola ścisła metabolizmu. Jak wykazano wcześniej, spowolnienie wzrostu komórek gospodarza prowadzi do obniżonej wydajności rozwoju bakteriofagów, a głodzenie komórki może całkowicie zahamować go całkowicie. Rezultaty przeprowadzonych badań wykazały, iż odpowiedź ścisła i nadprodukcja alarmonu głodu, cztero- i pięcioletfosforanu guanozyny (p)ppGpp (produktu syntezy przeprowadzanej przez białka RelA/SpoT) efektywnie hamuje rozwój badanych przedstawicieli bakteriofagów lambdoidalnych. Produkt genu *relA*, syntetaza I ppGpp, jest enzymem związanym z rybosomem i odpowiada za produkcję alarmonu w sytuacji deficytu aminokwasów (głodzenie aminokwasowe). Natomiast produkt genu *spoT*, ppGpp syntetaza II ppGpp, jest aktywowana w odpowiedzi na inne czynniki środowiskowe jak zmiany pH, jony metali, stres osmotyczny, temperatura, posiada jednocześnie zdolność do hydrolizy czterofosforanu guanozyny, stąd jest on niezbędny w procesie metabolizmu cząsteczki alarmonu. W sytuacji pogorszenia warunków otoczenia aktywacja kontroli ścisłej metabolizmu prowadzi do zahamowania większości kosztownych energetycznie procesów (synteza stabilnych RNA, replikacja DNA). Dzieje się tak głównie poprzez wpływ ppGpp na aktywność polimerazy RNA i zahamowanie transkrypcji z wielu promotorów. W przypadku mutacji w genach *relA*, komórki niezdolne są do syntezy ppGpp podczas głodzenia aminokwasowego, co nazywane jest odpowiedzią zrelaksowaną i skutkuje brakiem zahamowania syntezy RNA w warunkach niedoboru aminokwasów. ppGpp oddziałuje na główne etapy cyklu życiowego

bakteriofagów, negatywnie wpływając na powielanie materiału genetycznego poprzez blokowanie aktywacji transkrypcyjnej origin, replikacji faga oraz przez hamowanie transkrypcji z kluczowych w wyborze litycznej drogi rozwoju promotorów fagowych. W początkowym etapie pracy przygotowałem lizogenne szczepy bakteryjne w izogenicznych komórkach *E. coli* typu dzikiego oraz mutantów w genach *relA* i *relA* oraz *spoT* (ppGpp⁰), bądź ich odpowiedniki transformowane odpowiednim plazmidem pochodzącym od bakteriofaga. Eksperymenty, które przeprowadziłem wykazały, że już podstawowe fizjologiczne stężenia alarmonu w komórce wpływają na regulację rozwoju wszystkich pięciu badanych bakteriofagów Stx. Kontrola ta odbywa się na etapie rozwoju litycznego wirusów, a cząsteczka alarmonu negatywnie wpływa na replikację DNA zarówno bakteriofagów jak i plazmidów od nich pochodzących. Ta wyjątkowa wrażliwość na regulację niskimi stężeniami (p)ppGpp istotnie odróżnia fagi Stx od faga λ. Ponadto udało mi się wykazać, iż nadprodukcja czterofosforanu guanozyny jest w stanie istotnie obniżyć ekspresję z późnych promotorów fagowych i syntezę białka zielonej fluorescencji (GFP) ekspresowanego pod kontrolą promotora genów toksyn. Informacja ta wydaje się wyjątkowo istotna, gdyż można na jej podstawie wnioskować, iż w warunkach naturalnych stan taki prowadziłby do zmniejszenia produkcji toksyn, a co za tym idzie również zjadliwości szczepów STEC [1].

Wykorzystanie standardowej antybiotykoterapii w zwalczaniu zakażeń typu STEC może przynieść odwrotne do zamierzonych skutki zdrowotne. Dzieje się tak ze względu na niekontrolowaną indukcję profagów z genomu gospodarza *E. coli*, związaną z mechanizmem działania większości antybiotyków, prowadzącego do aktywacji odpowiedzi SOS, a co za tym idzie produkcji toksyn w układzie pokarmowym. Na kolejnym etapie pracy, pochyłając się nad problemem braku alternatyw dla walki z STEC/EHEC, postanowiłem szerzej przyjrzeć się słabo poznanym właściwościom przeciwbakteryjnym grupy roślinnych metabolitów pośrednich, izotiocyanianów (ITC). Związki te stanowią dziś cenny obiekt badań, ze względu na ich potencjał chemoprewencyjny czy właściwości antyoksydacyjne, w procesach nowotworzenia. W mojej pracy chciałem sprawdzić aktywność związków naturalnie występujących w diecie człowieka pod kątem ich wykorzystania w terapii przeciw EHEC. W badaniach nie ograniczyłem się tylko do określenia właściwości antybiotycznych związków, lecz podjąłem się próby wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania ITC. W przypadku braku istniejących sposobów leczenia analizy te są niezbędne, aby określić możliwość i skuteczność wykorzystania tych związków w zwalczaniu zakażeń tymi patogenami. Wykazaliśmy m.in. silne działanie antybiotyczne naturalnych przedstawicieli izotiocyanianów: fenetylu (PEITC), benzylu (BITC), allilu (AITC) oraz sulforafanu (SFN).

Pierwsze szczegółowe obserwacje pozwoliły ustalić, iż aktywność ITC prowadzi do zahamowania syntezy kwasów nukleinowych w komórce bakteryjnej. Wyjątkowo interesujący okazał się fakt, iż aktywność biologiczna tych związków nie powoduje indukcji profaga, co więcej dalsze badania potwierdziły skuteczność badanych ITC w hamowaniu rozwoju bakteriofagów, także w obecności silnych induktorów takich jak mitomycyna C oraz nadtlenek wodoru. Dlatego też zainteresował mnie mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska. Wcześniejsze badania nad mechanizmem indukcji odpowiedzi ścisłej naprowadziły mnie na przeprowadzenie eksperymentów, w których udało mi się ustalić, iż obecność badanych ITC prowadzi do powstania warunków stresu metabolicznego. Natomiast wykorzystanie szczepów niosących mutacje w genach *relA* i *spoT* pozwoliło mi na ustalenie, iż produkcja alarmonu głodu indukowana jest na drodze głodzenia aminokwasowego. W kolejnych eksperymentach wykazałem, iż specyficzne aminokwasy wpływają na odwrócenie efektu działania badanych związków. Takie spostrzeżenie może świadczyć o potencjalnych oddziaływaniach ITC z poszczególnymi grupami aminowymi wolnych aminokwasów dostępnych w podłożu lub specyficzności miejsc wiązania z poszczególnymi domenami białkowymi. Ponieważ z punktu widzenia skuteczności terapii najistotniejsze jest efektywne zahamowanie syntezy toksyn Shiga, wykorzystałem model badawczy linii komórek eukariotycznych zdolnych do ekspresji receptora Gb3 wrażliwych na wiązanie toksyny. Badanie przeżywalności komórek (MTT) z wykorzystaniem linii Hela oraz Vero jest skutecznym i dokładnym testem pozwalającym uzyskać dane toksykologiczne. Traktowanie hodowli bakteryjnych EHEC wybranymi związkami z grupy ITC prowadziło do znaczącego zmniejszenia toksyczności lizatów z tych komórek, co świadczy o zahamowaniu syntezy toksyn. Badania te zostały dodatkowo potwierdzone analizą z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej umożliwiającej obserwację ekspresji białka markerowego GFP, będącego pod kontrolą promotora genu toksyn *stx*. Ponieważ odpowiedź SOS, aktywowana jest także przez genotoksyczne działanie na materiał genetyczny reaktywnych form tlenu, i indukcji profagów, sprawdziłem także możliwość powodowania przez badane ITC stresu oksydacyjnego w komórkach EHEC, oraz ich wpływ na integralność błony komórkowej. Przeprowadzone analizy wykazały brak podwyższonego stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach wystawionych na działanie związków. Ponadto, uszkodzenia błony powodowane aktywnością ITC wydają się efektem wtórnym zahamowania metabolizmu kwasów nukleinowych i indukcji odpowiedzi ścisłej niż głównym mechanizmem ich działania. Rezultaty tych badań pozwoliły na przybliżenie mechanizmu antybakteryjnego działania związków z grupy ITC, którego efektem jest indukcja odpowiedzi ścisłej w komórkach

E. coli. Wskazuje to na duży potencjał praktycznego wykorzystania badanych związków dla możliwości terapii zakażeń bakteriami niosącymi toksyny Shiga [2, 3].

Ponadto, w kolejnym etapie przygotowania rozprawy postanowiłem przeprowadzić analizę mającą na celu wyjaśnić, jak jeden z podstawowych mechanizmów kontroli metabolizmu RNA w komórkach, za który odpowiedzialny jest enzym poliadenylazy RNA I (PAP I), może oddziaływać na rozwój badanych bakteriofagów lambdoidalnych. Wyniki wcześniejszych badań wykazały, iż mutacje w genie *pcnB* mają wpływ zarówno na rozwój komórek gospodarza jak i bakteriofaga λ . W przeprowadzonych badaniach określiliśmy wpływ delekcji w genie PAP I na rozwój przedstawicieli fagów lambdoidalnych Φ 24B, 933W, P22, P27, P32 oraz bakteriofaga λ . Rezultaty eksperymentów pozwoliły wykazać, iż w warunkach deficytu PAP I w komórce rozwój lityczny wirusów lambdoidalnych zachodzi istotnie mniej wydajnie niż w komórkach szczepu typu dzikiego. Przejawia się to w obniżonej zdolności do indukcji profaga, jak również w mniejszym plonie bakteriofagowym powstałym w wyniku infekcji. Co bardziej istotne, w komórkach, w których doszło do indukcji cyklu litycznego obserwuje się obniżoną efektywność syntezy DNA bakteriofagów. Dalsze szczegółowe badania wykazały, iż poważnie upośledzona zostaje zdolność bakteriofagów do lizogenizacji komórek *E. coli* czyli zintegrowania materiału genetycznego do chromosomu gospodarza. Interesującym jest fakt, iż zaobserwowany fenomen jest wspólny dla wszystkich badanych bakteriofagów, co może wskazywać na podobny mechanizm regulacji rozwoju. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest fakt, iż w komórkach pozbawionych PAP I, brak możliwości potranskrypcyjnej modyfikacji mRNA wpływa na metabolizm tych cząsteczek. Konsekwencją takiej modyfikacji może być zmiana stanu fizjologicznego komórki, poprzez obniżoną wydajność ich degradacji, ale także upośledzenie specyficznego działania regulatorowych małych RNA takich jak fagowy transkrypt *oop*. Głębsze poznanie procesów stojących u podstaw tego mechanizmu regulacji wymaga jednak dalszych badań, które mogłyby pozwolić na scharakteryzowanie molekularnych celów podlegających modyfikacji [4].

Oryginalne doniesienia, które stały się podstawą niniejszej pracy, prócz ogólnego znaczenia poznawczego dla podstawowych procesów biologicznych, mają też potencjalne znaczenie aplikacyjne. Wyniki zaprezentowanych badań wskazują, iż bakteryjne systemy kontroli ekspresji genów mogą stanowić molekularny cel w kontroli rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych niosących geny toksyn. Jednakże różnice genetyczne badanych wirusów mają istotny wpływ na efektywność kontroli rozwoju cyklu życiowego tych bakteriofagów z udziałem mechanizmów gospodarza. Ponadto udało się zidentyfikować grupę naturalnych

substancji antybiotycznych - izotiocyjanianów, oraz przybliżyć ich molekularny mechanizm działania prowadzący do aktywacji kontroli ścisłej metabolizmu na drodze głodzenia aminokwasowego.

Literatura:

1. Nowicki D, Kobiela W, Węgrzyn A, Węgrzyn G, Szalewska-Pałasz A. 2013. ppGpp-dependent negative control of DNA replication of Shiga toxin-converting bacteriophages in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 22: 5007-15.
2. Nowicki D, Maciąg-Dorszyńska M, Kobiela W, Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn A, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G. 2014. Phenethyl isothiocyanate inhibits shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by stringent response induction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4: 2304-15.
3. Nowicki D, Rodzik O, Herman-Antosiewicz A, Szalewska-Pałasz A. 2016. Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic *Escherichia coli*: insight to the mode of action. *Scientific Reports* 6: 22263.
4. Nowicki D, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. 2015. Defects in RNA polyadenylation impair both lysogenization by and lytic development of Shiga toxin-converting bacteriophages. *Journal of General Virology* 7: 1957-68.