

Joanna Monika Łoś<sup>1\*</sup>, Grzegorz Węgrzyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Wpłynęło w czerwcu 2011

1. Wstęp. 2. Bakteriofagi niosące geny toksyn Shiga – ogólna charakterystyka. 3. Bakteriofagi lambdoidalne. 4. Bakteriofag  $\lambda$ . 4.1. Adsorpcja i iniekcja DNA. 4.2. Faza decyzji „liza czy lizogenia”. 4.3. Rozwój lizogeniczny. 4.4. Indukcja. 4.5. Rozwój lityczny. 5. Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC). 6. Toksyny Shiga. 7. Indukcja profagów niosących geny toksyn Shiga. 8. Rola represora CI i miejsc operatorowych fagów kodujących toksyny Shiga. 9. Podsumowanie

### Enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli* (EHEC) and Shiga toxin-encoding bacteriophages

**Abstract:** *Escherichia coli* is a bacterium naturally present in the mammalian intestine, occupying this habitat as a commensale. Most *E. coli* strains are lysogenic and the prophage status usually does not changes their relations with the host. However, some strains of this bacterium, including enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), carry virulence genes, and thus are capable of causing disease in humans. Infection of humans by these strains causes hemorrhagic colitis and may result in hemolytic-uremic syndrome, a severe complication, which can be fatal. The major virulence factors of EHEC are Shiga toxins, encoded by genes located on genomes of lambdoid prophages. Effective production and release of these toxins depend mostly on the induction of Shiga toxin-converting prophages. Many antibiotics used to treat bacterial infections stimulate induction of Shiga toxin-converting prophages, enhancing severity of the disease symptoms. Hence, treatment with antibiotics is restricted if infection with EHEC is confirmed or even suspected, which causes serious therapeutic problems. In this light, understanding the mechanisms of prophage induction and regulation of development of lambdoid phages in human intestine is important to facilitate the discovery of procedures preventing or alleviating Shiga toxin-caused diseases. In this article, we present an overview of EHEC and Shiga toxin-converting phages, providing also the background for molecular biology of lambdoid bacteriophages (which is important to understand mechanisms of control of development of phages carrying Shiga toxin genes) and discussing recently published reports in this field.

1. Introduction. 2. Bacteriophages carrying Shiga toxin genes – general characteristics. 3. Lambdoid bacteriophages. 4. Bacteriophage  $\lambda$ . 4.1. DNA adsorption and injection. 4.2. Decision phase: “lysis or lysogeny”. 4.3. Lysogenic development. 4.4. Prophage induction. 4.5. Lytic development. 5. Enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli* (EHEC). 6. Shiga toxins. 7. Induction of prophages carrying Shiga toxin genes. 8. Role of the CI repressor and operator sites of Shiga toxin-encoding bacteriophages. 9. Concluding remarks

**Słowa kluczowe:** bakteriofagi lambdoidalne, enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli*, indukcja profaga

**Key words:** Enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli*, lambdoid bacteriophages, prophage induction.

## 1. Wstęp

Mimo iż większość szczepów *Escherichia coli* to bakterie występujące w jelicie człowieka jako komensale, występują wśród nich również szczepy patogenne dla ludzi. Przykładem są enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC), powodujące krwawe biegunki, ze stosunkowo często występującymi poważnymi powikłaniami, jak np. zespół hemolityczno-mocznicowy [98]. Zakażenia szczepami EHEC mają najczęściej charakter lokalnych epidemii, czego przykładem były niedawne liczne infekcje, które miały miejsce w Niemczech i które doprowadziły do kilkudziesięciu zgonów zakażonych osób [71].

Szczepy EHEC produkują różnorodne czynniki infekcyjne, niemniej jednak najgroźniejszymi z nich są toksyny Shiga. To właśnie działanie tych toksyn powoduje najpoważniejsze powikłania związane z infekcjami

tymi bakteriami [62]. W przeciwieństwie do wielu innych czynników infekcyjnych, toksyny Shiga kodowane są nie w chromosomie bakterii, ale w genomie bakteriofagów występujących w szczepach EHEC w postaci profagów [41]. W związku z powyższym efektywna ekspresja tych genów (zwanymi *stx*) następuje dopiero po indukcji profaga i rozpoczęcia przez bakteriofaga rozwoju litycznego. Związana z tym masowa produkcja toksyn Shiga oraz ich uwolnienie po spowodowanej przez faga lizie komórki bakteryjnej skutkuje ich specyficznym działaniem na komórki ludzkie, wywołującym charakterystyczne objawy chorobowe.

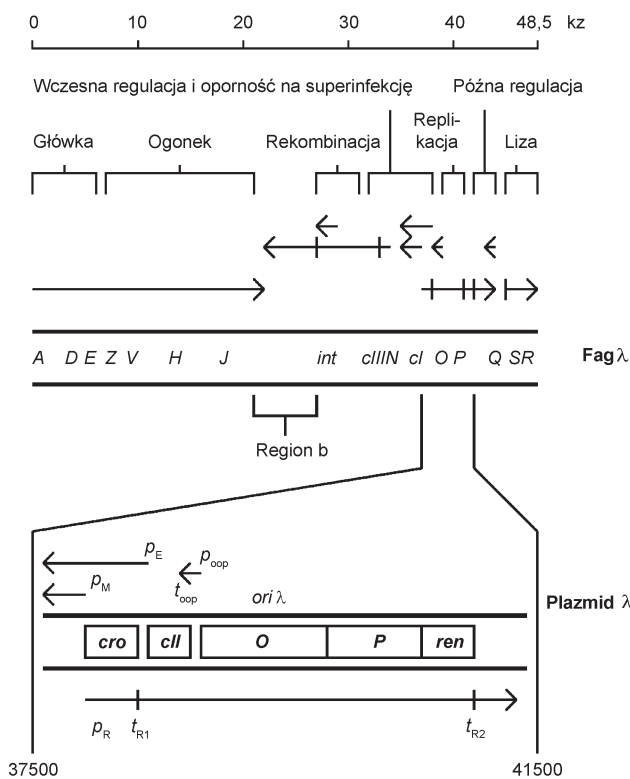
W tym artykule podsumujemy aktualną wiedzę o szczepach EHEC i bakteriofagach kodujących toksyny Shiga oraz przedyskutujemy problemy związane z potencjalnym zapobieganiem zakażeniom i ich efektem oraz leczeniem, w przypadku gdy do zakażenia doszło.

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel. (58) 523 6387; fax: (58) 523 5501; e-mail: [jlos@biotech.ug.gda.pl](mailto:jlos@biotech.ug.gda.pl)

## 2. Bakteriofagi niosące geny toksyn Shiga – ogólna charakterystyka

Bakteriofagi przenoszące geny toksyn Shiga zostały zidentyfikowane w 1983 roku. Genomy tych bakteriofagów stanowi dwuniciowy, liniowy DNA o długości od około 40 do 70 tysięcy par zasad (kpz) [73]. Na podstawie ich budowy morfologicznej można wyróżnić kilka typów. Jedne są zbudowane z ikozaedralnej główki i krótkiego cienkiego ogonka np. 933W i  $\phi 24_B$  [3]. Inne składają się z wydłużonej ikozaedralnej główki oraz długiego, cienkiego ogonka np. H-19B [81] i 2851 [83]. Mogą też posiadać ikozaedralną główkę i gruby, długi ogonek np.  $\phi P27$  [51]. Fagi z krótkim ogonkiem wykorzystują do adsorpcji białko YaeT. Jest to białko zewnętrznej błony, szeroko rozpowszechnione i konserwowane ewolucyjnie u bakterii Gram-ujemnych. Fagi z długimi ogonkami adsorbują się zwykle na ligandach powierzchniowych, takich jak OmpC [81].

Bakteriofagi przenoszące geny toksyn Shiga należą do fagów lambdoidalnych, których genom zbudowany jest w podobny sposób jak u faga  $\lambda$  (Rys. 1). Składa się on z bloków genów, kodujących białka odpowiedzialne za konkretne funkcje. Skutkiem tego jest to, że genomy fagów lambdoidalnych wykazują mozaikowatą budowę



Rys. 1. Uproszczona mapa genomu bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidów od niego pochodzących. Zaznaczone są rejony genomu kodujące białka pełniące funkcje w poszczególnych procesach zachodzących podczas rozwoju bakteriofaga (tworzenie główki i ogonka, rekombinacja, replikacja, regulacja ekspresji genów, liza komórki gospodarza). Strzałkami zaznaczone są główne transkrypty, a poprzeczne linie oznaczają położenie głównych terminatorów transkrypcji

gdyż często dochodzi pomiędzy nimi do rekombinacji i wymiany genów [35]. Mimo podobieństw w morfologii i strukturze genomu mają zróżnicowaną sekwencję nukleotydową [14]. Poza kodowaniem toksyny Shiga, część z tych fagów koduje również kinazę serynowo-treoninową oraz zawiera geny dla rzadkich tRNA izoleucyny i argininy, które to aminokwasy znajdują się w toksynie oraz we wspomnianej wcześniej kinazie [63]. Bakteriofagi te są zdolne do infekcji i lizogenizacji laboratoryjnych [1] oraz pochodzących z ludzkiego jelita szczepów *E. coli* zarówno niepatogennych jak i patogennych, również tych posiadających już profaga kodującego toksynę Shiga. Powstałe w ten sposób lizogeny są zdolne do produkcji toksyn oraz infekcyjnych cząstek fagowych. Powoduje to rozprzestrzenianie się genów toksyn wśród innych szczepów *E. coli* oraz innych szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae* [72]. Fagi te w podobny sposób powodują transdukcję genów toksyny Shiga również u zwierząt [15]. Wydaje się że jedynym możliwym ograniczeniem w rozprzestrzaniu się tych fagów w jelitach ssaków jest brak odpowiedniego gospodarza, wrażliwego na danego faga [75]. Kolejnym ważnym czynnikiem umożliwiającym rozprzestrzenianie się genów tych toksyn, jak i innych genów są defektywne profagi. Okazuje się, że część z nich, po zakażeniu komórki innym fagiem indukuje się i jest uwalniana z komórki bakteryjnej jako DNA mogące transformować inne bakterie. Stanowią więc one ważne elementy genetyczne o dużej zdolności do rozprzestrziania się wśród komórek bakteryjnych [5].

Ponieważ – jak wspomniano powyżej – bakteriofagi niosące geny toksyn Shiga należą do rodziny fagów lambdoidalnych, poniżej omówione zostaną pokrótce mechanizmy kontroli rozwoju faga  $\lambda$ , najlepiej poznanego członka tej rodziny. Poznanie bowiem tych mechanizmów jest kluczowe dla zrozumienia specyfiki regulacji zarówno procesów zachodzących podczas rozwoju fagów niosących geny toksyn Shiga jak i produkcji tych toksyn.

## 3. Bakteriofagi lambdoidalne

Cechą charakterystyczną wszystkich fagów lambdoidalnych jest podobna organizacja genomu. Zbudowany jest on z bloków genów, z których każdy odpowiada za poszczególne funkcje np.: blok genów regulacyjnych, replikacyjnych czy strukturalnych. Powoduje to, że geny odpowiedzialne za poszczególne procesy mają podobną lokalizację w genomie np.: gen represora *ci* jest położony zawsze pomiędzy promotorami  $p_L$  i  $p_R$ . Kolejną cechą tych fagów jest to, że geny znajdują się pod kontrolą podobnie działających promotorów oraz są regulowane przez podobne procesy jak np.: antyterminacja transkrypcji. Również powstające białka wykazują podobieństwo w funkcji, np. żaden z fagów lambdoidalnych nie

koduje własnej polimerazy, ale każdy ma swoje białka antyterminatorowe [12]. Dzięki takiej budowie genomu łatwo dochodzi do wymiany poszczególnych modułów genów pomiędzy fagami lambdoidalnymi. Proces ten zachodzi poprzez horyzontalny transfer genów, który może nastąpić albo w procesie homologicznej rekombinacji, dzięki krótkim sekwencjom homologicznym znajdującym się na granicy genów, albo rekombinacji niehomologicznej, w przypadkowym miejscu w genomie. Niehomologiczna rekombinacja może prowadzić do uszkodzenia regionów kodujących, co z kolei może powodować eliminację takiego faga z naturalnego środowiska. W związku z tym pozostaną tylko te, które w wyniku takiej rekombinacji nie mają uszkodzonych żadnych istotnych genów [10]. Skutkiem tych procesów jest powstanie bakteriofaga o genomie, który składa się z bloków genów pochodzących od różnych fagów, czyli charakteryzuje się mozaikową budową genomu np.: geny strukturalne faga  $\lambda$  mają inną zawartość par GC niż geny regulacyjne, co może świadczyć o tym, że pochodzą z innego źródła [13].

Bakteriofagi posiadają również dodatkowe elementy genetyczne nazwane w literaturze anglojęzycznej „moron” (od ang. *more* – więcej), ponieważ zwiększają one ilość DNA w genomie faga. Są to geny, pochodzące z zewnętrznego źródła, nie związane z funkcją sąsiadujących genów, posiadające własny promotor i terminator. Mogą dawać korzyść gospodarzowi lub być wykorzystane w czasie rozwoju faga [29]. Do wymiany tych elementów genetycznych pomiędzy bakteriofagami może dojść, gdy tę samą bakterię atakują różne fagi, lub gdy w zaatakowanej bakterii znajdują się profagi [28]. W genomach niektórych bakterii, np. enterokrwotocznych *E. coli* (EHEC), może być nawet do kilkunastu profagów lambdoidalnych, co prowadzi do łatwej rekombinacji z genomem infekującego faga. Niektóre profagi są defektywne, a ich geny mogą być wykorzystywane przez bakterię, np. produkty genów ogonka znajdujących się pod kontrolą regulacyjnych systemów bakterii mogą działać jako bakteriocyny [30]. Mechanizm wymiany dodatkowych elementów genetycznych prowadzi między innymi do przenoszenia przez bakteriofagi genów kodujących czynniki wirulencji takie jak toksyny Shiga, białka błony zewnętrznej czy enzymy zmieniające strukturę LPS [91]. Bakteriofagi są więc ważnymi pośrednikami w horyzontalnym transferze genów pomiędzy bakteriami, oraz wpływają na różnorodność bakterierynych genomów [58, 61].

#### 4. Bakteriofag $\lambda$

Najlepiej poznanym przedstawicielem fagów lambdoidalnych jest bakteriofag  $\lambda$  (Rys. 2). W tym rozdziale, w przypadku podstawowych informacji będziemy odno-



Rys. 2. Wirion bakteriofaga  $\lambda$ .  
Zdjęcie spod mikroskopu elektronowego TEM  
(dzięki uprzejmości dr Grażyny Konopy, Uniwersytet Gdański).

sić się do opublikowanych stosunkowo niedawno artykułów przeglądowych [59, 93, 95], w których czytelnik znajdzie szersze dane literaturowe, ograniczymy się natomiast do cytowania jedynie najważniejszych i najnowszych prac oryginalnych dotyczących bakteriofaga  $\lambda$ .

Genom faga  $\lambda$ , schematycznie przedstawiony na Rys. 1., stanowi linowa, dwuniciowa cząsteczka DNA o długości 48502 par zasad zakończona 12-nukleotydowymi lepкими końcami. Bakteriofag  $\lambda$  został sklasyfikowany do rzędu *Caudovirales* i rodziny *Siphoviridae*. Wirion zbudowany jest z ikozaedralnej główki o średnicy 54 nm i ogonka nie posiadającego kurczliwej pochewki o średnicy 15 nm i długości 150 nm. Na końcu ogonka znajduje się włókienko końcowe o średnicy 2 nm i długości 25 nm. Badania nad bakteriofagiem  $\lambda$  zaczęto w połowie XX wieku. Od tego czasu stał się on organizmem modelowym, dzięki któremu poznano regulację podstawowych procesów genetycznych takich jak: represja i aktywacja promotorów, antyterminacja transkrypcji czy rekombinacja DNA [95]. Wykorzystywany jest również jako najprostszy model do badania czynników mających wpływ na wybór alternatywnych dróg rozwojowych. Jest to kluczowe dla efektywnej propagacji tego faga, w różnych warunkach wzrostu komórek gospodarza [95]. Poniżej przedstawione zostaną dwie alternatywne drogi rozwojowe bakteriofaga  $\lambda$  i poszczególne ich etapy.

#### 4.1. Adsorpcja i iniekcja DNA

Infekcja rozpoczyna się od adsorpcji faga na powierzchni komórki bakteryjnej [95]. Podczas tego procesu dochodzi do specyficznego oddziaływania pomiędzy fagowym białkiem J, budującym włókienko końcowe, a bakteryjnym białkiem LamB, tworzącym porynę maltozową. Poryna ta umożliwia transport maltozy do wnętrza komórki i jest umiejscowiona wzdłuż komórki gospodarza na błonie zewnętrznej. Adsorpcja faga zależy od obecności jonów  $Mg^{2+}$ , które neutralizują ujemny ładunek na powierzchni błony. Pierwotnie wyizolowany bakteriofag  $\lambda$  miał dodatkowo sześć długich włókien przyspieszających adsorpcję, jednak zostały one utracone przez mutację w genie *stf*. Efektem tego było zwiększenie lysinek fagowych co znacznie ułatwiło pracę z tym bakteriofagiem. Natomiast w warunkach naturalnych, czyli w jelitach ssaków, gdzie znajdują się sole żółciowe i węglowodany, do adsorpcji faga na powierzchni komórki potrzebne jest jeszcze jedno białko zewnętrznej błony gospodarza: Ag43, które bierze udział w autoagregacji komórek *Escherichia coli*. Białko to może działać jako dodatkowe miejsce wiązania faga z komórką bakteryjną w środowisku o niskim stężeniu jonów dwuwartościowych [95].

Po zaadsorbowaniu się cząstki fagowej na powierzchni błony dochodzi do przesunięcia związanego wirionu z białkiem LamB do bieguna komórki. Tutaj znajduje się największa koncentracja białka ManY, niezbędnego do iniekcji fagowego DNA. Białko to umiejscowione jest w błonie wewnętrznej i jest jednym z elementów budujących system transportujący mannozę. Tak się dzieje jeśli komórkę gospodarza zainfekuje mała liczba cząstek fagowych od 1 do 5 na jedną komórkę (niskie m.o.i. czyli wielokrotność zakażenia). Przy większej liczbie bakteriofagów iniekcja może nastąpić w miejscu zaadsorbowania się faga. W procesie tym biorą też udział następujące białka fagowe: V (główne białko ogonka), G i H (białka łączące włókienko końcowe z ogonkiem) oraz Z (łączy główkę z ogonkiem oraz jest związane z końcem DNA wystającym do ogonka) [17]. Podczas wprowadzania fagowego materiału genetycznego do wnętrza komórki dochodzi do niespecyficznego wiązania z białkami gospodarza np. HU. Powoduje to kondensację DNA fagowego i wepchnięcie go na skutek gradientu ciśnienia osmotycznego pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem zewnętrznym do upakowanej cytoplazmy gospodarza [34].

#### 4.2. Faza decyzji „liza czy lizogenia”

Po iniekcji następuje cyrkularyzacja fagowego DNA dzięki 12-nukleotydowym końcom *cos*, które są liganowane przez ligazę gospodarza. Na tym etapie fag musi „podjąć decyzję” o wyborze jednej z alternatywnych

drog rozwojowych: litycznej bądź lizogennej (do szczegółowych odnośników literaturowych odsyłamy czytelnika do prac przeglądowych: [59, 95]). Po cyrkularyzacji genomu faga, bakteryjna polimeraza RNA rozpoczyna transkrypcję z dwóch wczesnych promotorów fagowych:  $p_L$  i  $p_R$ . Pierwszymi genami transkrybowanymi z promotora  $p_R$  są *cro* i *cII*. Natomiast z promotora  $p_L$  transkrybowany jest gen *N*, kodujący białko antyterminatorowe. Tworzy ono kompleks z białkami bakteryjnymi powodujący, że polimeraza RNA nie rozpoznaje terminatorów w operonach  $p_L$  i  $p_R$ , co umożliwia transkrypcję kolejnych genów. Z kolei białko CII (produkt genu *cII*) jest aktywatorem promotora  $p_E$ , z którego rozpoczyna się transkrypcja genu *cI*. Współzawodnictwo pomiędzy białkiem Cro (produkt genu *cro*), decydującym o rozwoju litycznym, a białkiem CI (produkt genu *cI*), decydującym o rozwoju lizogenicznym, jest kluczowym procesem przy decyzji „liza czy lizogenia”. Związane jest to z oddziaływaniem obu tych białek z regionami operatorowymi  $O_L1$ ,  $O_L2$  i  $O_L3$  promotora  $p_L$  oraz  $O_R1$ ,  $O_R2$  i  $O_R3$  promotora  $p_R$ , w wyniku czego dochodzi do zahamowania transkrypcji z tych promotorów [59].

Białko CI działa jako dimer w którym każdy z monomerów zbudowany jest z dwóch domen. Jedną z nich jest domena N-terminalna zawierająca motyw helisa-zwrot-helisa, odpowiadająca za wiązanie do DNA. Natomiast druga domena C-terminalna zawiera harmonijkę  $\beta$  biorącą udział w tworzeniu dimerów i interakcji pomiędzy dimerami. W tej domenie znajduje się też miejsce autoproteolizy białka CI, do której dochodzi podczas indukcji profaga. Dimery białka CI kooperatywnie wiążą się do operatorów  $O_L1$  i  $O_L2$  hamując aktywność promotora  $p_L$  oraz do operatorów  $O_R1$  i  $O_R2$  hamując aktywność promotora  $p_R$ . Następnie dochodzi do zagięcia DNA i oddziaływania pomiędzy ustawionymi naprzeciwko siebie tetramerami CI związanymi z wyżej wymienionymi miejscami operatorowymi, tworząc oktamer. Powoduje to powstanie pętli na DNA, która wzmacnia aktywność promotora  $p_M$ , zaktwowanego po związaniu białka CI w operatorze  $O_R2$ . Z tego promotora następuje efektywna transkrypcja genu *cI*. Podczas rozpoczęcia transkrypcji polimeraza RNA może wiązać się zarówno do promotora  $p_R$  jak i  $p_M$ , ale szybkość tworzenia kompleksu otwartego na promotorze  $p_R$  jest wyższa niż na  $p_M$ . Ponadto jeśli polimeraza RNA jest związana jednocześnie z tymi promotorami, to na  $p_M$  nie dochodzi do utworzenia kompleksu otwartego. Otwarcie kompleksu transkrypcyjnego zachodzi dzięki specyficznym oddziaływaniom między polimerazą RNA a dwoma regionami bogatymi w pary AT, które znajdują się przed miejscem „start” na DNA. Powoduje to owinięcie DNA wokół polimerazy RNA w czym bierze udział C-terminalna domena podjednostki  $\alpha$  polimerazy RNA. Promotor  $p_M$  jest słabym promotorem bez aktywacji przez białko CI. Dochodzi do wiąza-

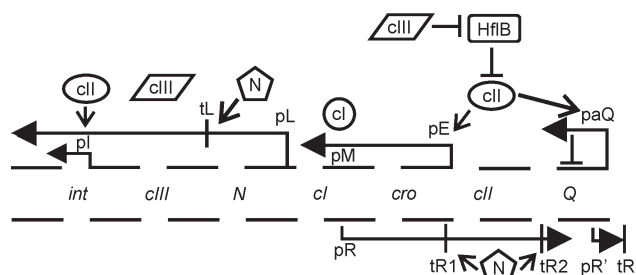
nia tetramerów CI w operatorach  $O_L3$  i  $O_R3$  co stabilizuje powstałą pętlę i efektywnie hamuje promotory  $p_L$ ,  $p_R$  jak i  $p_M$ . Współdziałanie dimerów CI podczas wiązania do operatorów nie jest konieczne w rozwoju faga  $\lambda$ , ale powoduje, że mniejsza ilość tego białka jest potrzebna do ustanowienia decyzji o lizogenicznym rozwoju bakteriofaga [7].

Białko Cro zbudowane jest z jednej domeny i wiąże się również jako dimer do tych samych miejsc operatorowych, ale w odwrotnej kolejności niż białko CI [59]. Do niedawna uważano, że białko Cro wiążąc się z operatorem  $O_R3$  hamuje promotor  $p_M$ , uniemożliwiając produkcję wystarczającej ilości białka CI do rozpoczęcia cyklu lizogenicznego, a przez to powoduje rozpoczęcie rozwoju litycznego. Ostatnie badania pokazały, że związanie Cro do tego operatora nie jest konieczne do hamowania promotora  $p_M$  podczas indukcji profaga [6]. Wydaje się, że rolą białka Cro w cyklu litycznym po związaniu do operatorów jest zahamowanie transkrypcji z promotorów  $p_L$  i  $p_R$ . Powoduje to zatrzymanie transkrypcji genów *cII* i *cIII*, których produkty białkowe, odpowiednio CII i CIII, pozytywnie wpływają na ilość białka CI. Zaprzestanie produkcji białka CII podczas rozwoju litycznego jest istotne również dlatego, że jest ono toksyczne dla komórek gospodarza. Białko to przez wiązanie do podjednostki  $\beta$  polimerazy RNA może hamować transkrypcję bakteryjnych genów. Także nadprodukcja tego białka powoduje zahamowanie replikacji genomu gospodarza.

W zależności od tego, którego białka Cro czy CI jest więcej w komórce bakteryjnej, bakteriofag wybiera odpowiednią drogę rozwoju. Zależy to od warunków fizjologicznych w jakich znajduje się komórka gospodarza. Rozwojowi litycznemu sprzyjają korzystne warunki wzrostu komórek gospodarza, takie jak: bogata pożywka, wysoka temperatura i niskie m.o.i. zakażającego faga. Natomiast rozwojowi lizogenicznemu sprzyjają niekorzystne warunki wzrostu, czyli: uboga pożywka, niska temperatura oraz duża liczba fagów infekująca tą samą komórkę bakteryjną [95]. Również w populacji bakterii rosnących w takich samych warunkach, komórki większe, czyli będące w lepszej kondycji częściej będą lizowane po zakażeniu bakteriofagiem  $\lambda$  niż te mniejsze [82].

#### 4.3. Rozwój lizogeniczny

Kluczowym białkiem w rozwoju lizogenicznym jest białko CII, od którego aktywności zależy poziom białka CI. Białko CII tworzy tetramery zbudowane z podobnych dimerów. Każdy z monomerów tego białka zawiera motyw helisa-zwrot-helisa, ale tylko dwa monomery biorą udział w wiązaniu do DNA. Białko to jest aktywatorem trzech promotorów fagowych:  $p_E$ ,  $p_I$  i  $p_{aQ}$  (Rys. 3). Stymulacja tych promotorów polega na związaniu się



Rys. 3. Schemat mechanizmu wyboru rozwoju lizogenicznego faga lambda. Nazwy genów znajdują się pomiędzy przerywanymi liniami symbolizującymi genom faga  $\lambda$ . Strzałki wzdłuż przerywanych linii pokazują kierunek transkrypcji z promotorów. Strzałki odchodzące od białka N pokazują antyterminację, a od białka CII aktywację promotorów. Tępo zakończone linie oznaczają hamowanie aktywności białka lub genu

białka CII w miejscu zachodzącym na rejon  $-35$  promotora i oddziaływaniu z podjednostką  $\alpha$  polimerazy RNA. Aktywacja promotora  $p_E$  powoduje transkrypcję genu *cI*. Dzięki temu powstaje pula białka CI aktywująca, po związaniu z  $O_R2$ , własny promotor  $p_M$  [59].

Z kolei na matrycy mRNA tworzonego z promotora  $p_I$  powstaje białko Int niezbędne w procesie integracji genomu faga  $\lambda$  z chromosomem gospodarza (Rys. 3). Gen *int* jest także pod kontrolą promotora  $p_L$ , ale powstające z niego transkrypty są degradowane zanim dojdzie do translacji białka Int. Dochodzi tutaj do tzw. retroregulacji. Polega ona na tym, że za genem *int* znajduje się region *sib* tworzący strukturę szpilki do włosów. Jest to struktura rozpoznawana przez bakteryjną RN-azę III, która degraduje mRNA dla białka Int. Region *sib* jest transkrybowany, ponieważ polimeraza RNA jest w kompleksie z antyterminatorowym białkiem N, przez co nie rozpoznaje terminatora  $t_{LI}$  położonego pomiędzy genem *int* a regionem *sib*. Natomiast gdy transkrypcja genu *int* zachodzi z promotora  $p_I$  polimeraza RNA nie jest związana z białkiem N i zatrzymuje się na terminatorze  $t_{LI}$ . Region *sib* nie jest transkrybowany i dochodzi do efektywnej translacji białka Int.

Ostatnim promotorem aktywowanym przez tetramer białka CII jest promotor  $p_{aQ}$ , w wyniku czego powstaje RNA antysensowny do transkryptu białka Q (Rys. 3). Białko to jest kolejnym czynnikiem antyterminatorowym umożliwiającym transkrypcję genów strukturalnych bakteriofaga  $\lambda$  oraz genów kodujących białka powodujących lizę komórki gospodarza. Dzięki aktywności  $p_{aQ}$  nie dochodzi do złożenia i uwolnienia cząstek fagowych w komórce lizogenicnej fagiem  $\lambda$ . W aktywacji promotorów  $p_I$  i  $p_{aQ}$ , ale nie  $p_E$  może brać udział oprócz białka CII również bakteryjne białko SeqA [95]. Schemat przedstawiający początkową fazę wyboru rozwoju lizogenicznego jest przedstawiony na Rys. 3.

Ilość białka CII w komórce zależy od różnych czynników zarówno bakteryjnych jak i fagowych. Pierwszym z nich jest antysensowny transkrypt powstający

z fagowego promotora  $p_{O'}$ , tzw. OOP RNA. Jest on komplementarny do końca 3' transkryptu dla białka CII, co uniemożliwia translację i powstanie tego białka. Stabilność OOP RNA zależy z kolei od wydajności jego poliadenylacji przez bakteryjną poli(A) polimerazę I, PAP I, co powoduje degradację tak zmodyfikowanego mRNA przez RN-azę III. W wolno rosnących komórkach gospodarza dochodzi do wydajniejszej poliadenylacji OOP RNA, a co za tym idzie do powstania większej ilości białka CII, mogącego aktywować promotory  $p_E$ ,  $p_I$  i  $p_{aQ}$  [33].

Kolejnym białkiem bakteryjnym wpływającym na ilość białka CII, w tym przypadku wpływającego na jego stabilność, jest proteaza HflB (FtsH), która degraduje białko CII (Rys. 3). Dzieje się tak dzięki odpowiedniej sekwencji sygnałowej znajdującej się na C-końcu monomeru CII. Na stabilność białka CII ma także wpływ temperatura. Im jest ona niższa tym powstaje więcej stabilnych tetramerów białka CII. W temperaturze poniżej 20–25°C dochodzi tylko do rozwoju lizogenicznego. W wyższych temperaturach przeważają monomery i dimery białka CII, które są efektywnie degradowane przez proteazę HflB. Natomiast aktywność tej proteazy jest hamowana przez bakteryjne alarmony głodu cAMP i ppGpp, których ilość wzrasta w komórkach gospodarza podczas hodowli w ubogiej pożywce. Prowadzi to do zwiększenia stabilności białka CII. Nukleotyd ppGpp jest również negatywnym regulatorem promotora  $p_R$  oraz pozytywnym promotorów  $p_E$ ,  $p_I$  i  $p_{aQ}$  aktywowanych przez białko CII [95].

Następnym czynnikiem mającym wpływ na stabilność białka CII jest fagowe białko CIII. Jest ono zbudowane z 54 aminokwasów i zawiera centralną  $\alpha$ -helisę biorącą udział w aktywności tego białka. CIII chroni białko CII przed degradacją przez proteazę HflB. Dzieje się tak dlatego, ponieważ białko CIII jest kompetywnym inhibitorem proteazy HflB, który wiąże się do miejsca degradacji w tej proteazie, bardziej efektywnie niż CII. W ten sposób, samemu ulegając trawieniu, hamuje degradację CII [36].

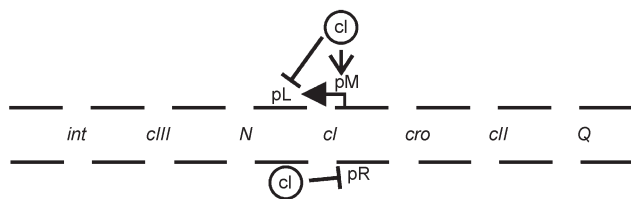
Ilość białka CIII w komórce jest zależna od temperatury, im jest ona niższa tym wydajniejsza translacja tego białka. Spowodowane jest to tworzeniem dwóch alternatywnych struktur transkryptu. W niskich temperaturach powstaje transkrypt z łatwo dostępnym miejscem Shine-Dalgarno i kodonem „start” dla rybosomu, dzięki czemu zachodzi wydajna translacja tego białka. Translacja jest również stymulowana przez wiązanie RN-azy III do mRNA, co powoduje ekspozycję miejsca przyłączenia rybosomu, a nie degradację transkryptu. W niskiej temperaturze promotor  $p_L$ , pod którego kontrolą znajduje się gen *cIII*, jest bardziej aktywny. Białko CIII powoduje też indukcję bakteryjnej odpowiedzi stresowej poprzez stabilizację czynnika  $\sigma^{32}$ , który umożliwia transkrypcję białek szoku termicznego. Tak samo jak w przypadku białka CII, dzięki trawieniu CIII przez

proteazę HflB, nie dochodzi do trawienia tego czynnika transkrypcyjnego. Powoduje to z jednej strony produkcję bakteryjnej proteazy Lon, degradującej fagowe białko N, a z drugiej strony białek DnaJ, DnaK i GrpE potrzebnych podczas replikacji genomu faga  $\lambda$ . Ilość białka CIII zależy również od ilości fagów zakażających jedną komórkę bakteryjną [95].

Przy niskim m.o.i, kiedy iniekcja fagowego DNA zachodzi na biegunach komórkowych, dochodzi również do wydajnej degradacji białka CII. Dzieje się tak dlatego że w tym miejscu jest także duża ilość proteazy HflB, która efektywnie trawi CII, do tego jest mało kopi genu CIII, a w związku z tym powstaje mniej tego białka. Przy wysokim m.o.i. gdy iniekcja genomu faga  $\lambda$  następuje w miejscu adsorpcji cząstki fagowej jest nie tylko wyższa produkcja białka CIII, ale również CII może pojawić się tam gdzie jest mniejsza ilość proteazy HflB, co zmniejsza efektywność trawienia tego białka [17].

Podczas rozwoju lizogenicznego następuje integracja genomu faga  $\lambda$  z chromosomem *Escherichia coli*. Odpowiedzialny jest za to proces rekombinacji miejscowo-specyficznej pomiędzy fagowym miejscem *attP* (POP') a bakteryjnym miejscem *attB* (BOB'). Miejsce *attP* znajduje się za genem *int* w genomie bakteriofaga, a miejsce *attB* jest pomiędzy operonami *gal* i *bio* na chromosomie gospodarza. Miejsca integracji są do siebie homologiczne tylko w części rdzeniowej O, zbudowanej z 15 par zasad i bogatej w pary AT. Pozostałe elementy P, P', B i B' tworzą proste jak i odwrócone powtórzenia oraz sekwencje palindromiczne rozpoznawane przez białka biorące udział w integracji i wycięciu DNA fagowego. W rekombinacji miejscowo-specyficznej udział bierze poza fagowym białkiem Int, także bakteryjne białko IHF, które po związaniu z DNA powoduje jego zagięcie i ekspozycję miejsca *attB*. Białko Int po rozpoznaniu miejsc *attP* i *attB* przecina obie nici zarówno fagowego jak i bakteryjnego DNA w rejonie O, a następnie łączy je ze sobą, co powoduje integrację materiału genetycznego bakteriofaga z chromosomem gospodarza. W wyniku tej reakcji genom profaga jest flankowany hybrydowymi miejscami *att*: BOP' i POB'. Miejsce *attB* rozpoznawane przez bakteriofaga  $\lambda$ , mimo że nie koduje żadnych genów jest takie same w różnych szczepach *E. coli*. Bakteriofag ten posiada też dodatkowe miejsce integracji z chromosomem gospodarza [38, 59].

Stan profaga jest bardzo stabilny dzięki aktywności promotora  $p_M$ , z którego jest transkrybowany gen *cI*. Dzięki temu białko CI utrzymuje się na stałym poziomie i efektywnie hamuje promotory  $p_L$  i  $p_R$  oraz chroni bakterię przed zakażeniem przez innego faga  $\lambda$ , czyli przed tak zwaną superinfekcją (Rys. 4). Z tego promotora dochodzi również do transkrypcji dwóch dodatkowych genów: *rexA* i *rexB*. Gen *rexB* ma dodatkowo jeszcze dwa promotory  $p_{Lit1}$  i  $p_{Lit2}$ , które są aktywne w stanie profaga. Produkt tego genu, białko RexB chroni komórkę



Rys. 4. Schemat transkrypcji genów profaga  $\lambda$  regulowanej przez białko CI. Nazwy genów znajdują się pomiędzy przerywanymi liniami symbolizującymi genom profaga  $\lambda$ . Strzałka wzdłuż przerywanej linii pokazuje kierunek transkrypcji z promotora. Strzałka odchodząca od białka CI pokazuje aktywację promotora, a tępo zakończone linie oznaczają hamowanie aktywności promotorów.

gospodarza przed śmiercią w czasie głodu aminokwasowego, związanego z aktywnością systemu genów *mazE* i *mazF*. Zapobiega również śmierci komórki bakteryjnej po utracie profaga P1, wykorzystującego system *phd-doc*, przez inaktywację bakteryjnej proteazy ClpXP. Natomiast produkty obu genów *rex* biorą udział w blokowaniu superinfekcji innymi fagami np. mutanta faga T4 w genie *rII*. W stanie profaga dochodzi do ekspresji także innych genów fagowych. Należą do nich dwa geny strukturalne ogonka G i T, gen *bet*, którego produkt białkowy bierze udział w rekombinacji homologicznej, gen *xis* związany z wycięciem genomu faga z chromosomu gospodarza oraz otwartej ramki odczytu *orf63*, której funkcja nie jest znana [60].

#### 4.4. Indukcja profaga

Indukcja jest to proces, podczas którego następuje przejście ze stanu profaga w rozwój lityczny [59, 95]. Może ona nastąpić w sposób spontaniczny lub zostać wymuszona przez czynniki powodujące uszkodzenia w DNA, takie jak: promieniowanie UV, X czy za pomocą mutagenów takich jak mitomycyna C. Promieniowanie UV generuje pęknięcia w DNA, powoduje hydratację cytozyny i uracylu oraz powstawanie kowalencyjnych wiązań, czego efektem są dimery pirymidynowe. Ponadto promieniowanie to sprawia powstawanie wolnych rodników, które mają wpływ na indukują profaga  $\lambda$ . Dodanie substancji wyłapującej wolne rodniki np., glutationu, powoduje opóźnienie w indukcji profaga [43]. Natomiast aktywny metabolit mitomycyny C alkiluje azot guaniny w strukturze DNA oraz kowalencyjnie łączy komplementarne nici DNA. Może również reagować z komórkowymi cząsteczkami tlenu tworząc wolne rodniki. Indukcję profaga  $\lambda$  mogą wywoływać także związki nie działające bezpośrednio na strukturę DNA np. norfloksacylna (NFLX) [50]. Jest to antybiotyk należący do drugiej grupy fluorochinolonów. Hamuje on aktywność gyrazy DNA wiążąc się do jej podjednostki A, która jest odpowiedzialna za oddziaływanie z DNA. Gyraza DNA wprowadza negatywne skręty do struktury DNA. Działanie NFLX powoduje zahamowanie syntezy

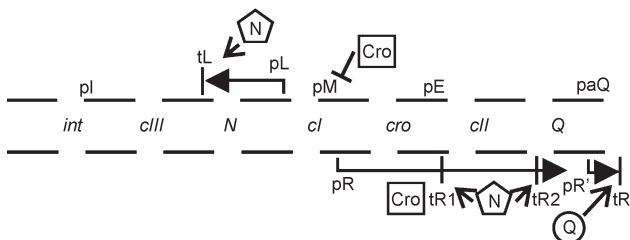
DNA i powstanie jednoniciowych fragmentów DNA. Indukcję profaga powodują również czynniki, których metabolizm w komórce prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu np. nadtlenek wodoru. Prowadzi to do oksydacji zasad DNA i uszkodzenia jego struktury.

W procesie indukcji profaga bierze udział bakteryjne białko RecA. Jest to heksamer wiążący się przy udziale ATP z jednoniciowym DNA, które powstaje w wyniku działania różnych czynników indukujących profaga. W takiej formie białko RecA jest aktywne i stymuluje autoprotolizę kolejnego bakteryjnego białka, LexA. To z kolei aktywuje geny systemu S.O.S. biorące udział w naprawie uszkodzonego DNA [25]. W podobny sposób białko RecA oddziałuje z fagowym białkiem CI, powodując jego autoprotolizę. Spadek stężenia represora CI sprawia, że promotor  $p_M$  traci swoją aktywność, a promotory  $p_R$  oraz  $p_L$  są odblokowane i rozpoczyna się z nich transkrypcja [59, 95]. Białko CII jest degradowane przez bakteryjną proteazę HflB i jest hamowane przez białko Cro. Nie dochodzi więc do aktywacji promotora  $p_E$ , z którego mógłby powstawać transkrypt dla białka CI. Następuje wycięcie profaga z chromosomu gospodarza przy udziale fagowych białek Int i Xis oraz bakteryjnych białek IHF i Fis. Brak białka CII powoduje, że promotor  $p_I$  nie jest aktywny, ale dochodzi do efektywnej transkrypcji mRNA dla białka Int z promotora  $p_L$ . W stanie profaga za genem *int* znajduje się miejsce *attBOP*, a region *sib* w wyniku cięcia w rejonie O miejsca *attP* podczas integracji, znajduje się za miejscem *attP*. Białko Xis razem z białkiem IHF powodują zagięcie DNA umożliwiając wycięcie genomu profaga w procesie rekombinacji miejscowo-specyficznej przez białko Int. Wiązanie białka Fis do DNA umożliwia przyłączenie białka Xis, co jest niezbędne do efektywnego wycięcia profaga. Po wycięciu się profaga rozpoczyna się rozwój lityczny. Dochodzi do replikacji fagowego DNA, produkcji białek strukturalnych, składania nowych cząstek fagowych i uwolnienia ich przez lizę komórki gospodarza [59, 95].

Indukcja profaga może również zajść bez udziału aktywnego białka RecA. Przykładem takiej indukcji jest indukcja zygotyczna, do której dochodzi podczas koniugacji pomiędzy komórkami bakteryjnymi. W wyniku tego procesu dawca może przekazać biorcy fragment chromosomu zawierający profaga. Brak białka CI w komórce biorcy powoduje aktywację promotorów  $p_R$  oraz  $p_L$  i rozpoczęcie rozwoju litycznego. Również wywołanie szoku solnego w komórkach lizogennych fagiem  $\lambda$  wywołuje indukcję profaga. Powodem tego może być nagły wzrost superskrętów w strukturze DNA, co sprawia że represor CI oddysocjowuje od miejsc operatorowych uwalniając promotory  $p_R$  oraz  $p_L$  [80]. Natomiast w stacjonarnej fazie wzrostu komórek bakteryjnych, przy nadekspresji genu *dsrA* również dochodzi do indukcji profaga bez udziału białka RecA [68].

#### 4.5. Rozwój lityczny

W regulacji rozwoju litycznego oprócz białka Cro ważną rolę odgrywa również białko N tworzące kompleks antyterminatorowy z polimerazą RNA i innymi czynnikami bakteryjnymi (Rys. 5). Umożliwia to transkrypcję kolejnych genów z promotorów  $p_L$  i  $p_R$ . Białko N



Rys. 5. Schemat mechanizmu wyboru rozwoju litycznego faga lambdaoidalnego. Nazwy genów znajdują się pomiędzy przerywanymi liniami symbolizującymi genom faga  $\lambda$ . Strzałki wzdłuż przerywanych linii pokazują kierunek transkrypcji z promotorów. Strzałki odchodzące od białka N i Q pokazują antyterminację. Tępo zakończone linie oznaczają hamowanie aktywności promotora

rozpoznaje specyficzną sekwencję *nutL* w powstającym transkrypcie z promotora  $p_L$ , znajdującą się pomiędzy genem *N* a promotorem oraz *nutR* zlokalizowaną na transkrypcie za genem *cro*. Miejsce *nut* zbudowane jest z dwóch elementów: *boxA* i *boxB* [59]. Białko N wiąże się do struktury szpilki do włosów w *boxB*. Powoduje to zagięcie RNA i związanie białka antyterminatorowego z polimerazą RNA. Do tego kompleksu przyłączają się bakteryjne białka stabilizujące to wiązanie. W *boxB* są to białka NusA i NusG a w *boxA* NusB i NusE (S10) [59]. Powstanie tak złożonego kompleksu umożliwia przejście polimerazie RNA przez terminatory  $t_L$  i  $t_R$ , w wyniku czego dochodzi do transkrypcji pozostałych genów z operonów  $p_L$  i  $p_R$ . Dzięki temu procesowi powstaje odpowiednia ilość białek potrzebnych podczas rozwoju litycznego bakteriofaga  $\lambda$ . Wiązanie białka N do miejsca *nutL* powoduje również represję translacji tego białka przez zablokowanie wiązania rybosomu do miejsca Shine-Dalgarno [59, 95]. Jednak w warunkach umożliwiających szybki wzrost komórek gospodarza, RN-aza III przecina sekwencję *nutL*, co powoduje uwolnienie sekwencji Shine-Dalgarno i efektywną translację białka N. Jest to istotne aby zapewnić odpowiednią ilość białka antyterminatorowego podczas rozwoju litycznego, ponieważ białko to jest degradowane przez bakteryjną proteazę Lon [95]. Antyterminacja może być także kontrolowana przez kinetykę dysocjacji białka N z polimerazą RNA i białkami Nus.

W rozwoju litycznym dochodzi do replikacji materiału genetycznego faga w wyniku czego powstaje około 100 dodatkowych kopii cząsteczek DNA. W procesie tym biorą udział fagowe białka O i P, a także bakteryjne białka szoku termicznego, białka replikacyjne i regula-

torowe. Replikacja rozpoczyna się w *ori $\lambda$* , które znajduje się w środku sekwencji genu *O*, zawierającego rejony bogate w pary AT. Produkt tego genu, białko O, wiąże się jako pierwsze w *ori $\lambda$*  tworząc strukturę O-somu. Następnie przyłącza się kompleks białka P z bakteryjną helikazą DnaB. Nie dochodzi do rozplecenia nici DNA przez helikazę, ponieważ białko P hamuje jej aktywność. Zdolność do działania białka DnaB przywracają białka szoku termicznego DnaK, DnaJ i GrpE przekształcając preprimosom tak, że helikaza odzyskuje swoją aktywność rozplatania nici DNA [93]. W inicjacji replikacji ważną rolę odgrywa również aktywacja transkrypcyjna *origin* przez bakteryjne białko DnaA. Jest to białko aktywatorowe, które po związaniu się do DNA faga stymuluje transkrypcję z promotora  $p_R$ , pod którego kontrolą są między innymi geny *O* i *P*. Białko to stymuluje wiązanie, a następnie opuszczenie promotora przez polimerazę RNA. Przesuwanie się polimerazy RNA powoduje zmiany w topologii DNA, które stymulują inicjację replikacji. Kolejnym czynnikiem aktywującym transkrypcję z tego promotora jest białko SeqA. Oba te białka konkurują ze sobą o miejsce wiązania w regionie regulatorowym promotora  $p_R$ . Następnie do kompleksu replikacyjnego dołącza się holoenzym polimerazy DNA i dodatkowe białka gospodarza biorące udział w replikacji, takie jak gyraza DNA, SSB [93]. Rozpoczyna się replikacja typu  $\theta$ , a powstały kompleks replikacyjny jest dziedziczony przez jedną z nici potomnych [93].

Od ilości białka O zależy wydajność inicjacji replikacji fagowego DNA. Białko to w wolnej formie jest degradowane przez bakteryjną proteazę ClpP/ClpX. Dopiero utworzenie kompleksu z białkami P, DnaB i DnaK w *ori $\lambda$*  chroni białko O przed degradacją przez te proteazy [93, 95]. W warunkach umożliwiających szybki wzrost komórek gospodarza białko O jest produkowane w dużym nadmiarze w porównaniu z ilością jaka jest potrzebna do wyprodukowania potomnych cząstek fagowych. Dzięki temu proteaza ClpP/ClpX nie jest w stanie strawić wystarczającej ilości tego białka aby nie dopuścić do powielenia fagowego materiału genetycznego [93, 95]. Podczas replikacji faga  $\lambda$  tworzą się dwa rodzaje kompleksów replikacyjnych: stabilne, które mogą funkcjonować przez kilka rund replikacyjnych i niestabilne. Jednak w warunkach szoku termicznego stabilne kompleksy rozpadają się w wyniku relaksacji DNA i oddysocjowania od *origin*. Podczas indukcji profaga w wyniku naświetlania światłem UV powstają tylko niestabilne kompleksy replikacyjne, które umożliwiają wydajne powielenie DNA faga, bo nie dochodzi w tych warunkach do relaksacji DNA. W tych warunkach białko RecA uniemożliwia tworzenie się stabilnych kompleksów replikacyjnych [94].

Po 5–6 rundach dwukierunkowej replikacji typu  $\theta$ , podczas której powstaje około 50 kopii genomu bakteriofaga  $\lambda$ , dochodzi do jednej rundy jednokierunkowej



replikacji typu  $\theta$ . Spowodowane jest to tym, że białko DnaA zostaje wymiareczkowane, przez związanie się w wielu miejscach na DNA bakteriofaga. Nie następuje, więc aktywacja transkrypcyjna bez której nie może zajść dwukierunkowa replikacja typu  $\theta$ . Podczas jednokierunkowej replikacji dochodzi do odepchnięcia końca 5' przez rosnący koniec 3' nowo syntetyzowanej nici i rozpoczyna się replikacja typu  $\sigma$ , czyli toczącego się koła. Następuje to w około 15 min po infekcji [95]. W wyniku tego typu replikacji tworzą się długie konkatameryczne cząsteczki DNA. Następnie są one cięte w miejscach *cos* i pakowane do równocześnie powstających główek bakteriofagowych [93, 95].

Transkrypcja genów białek budujących wirion faga  $\lambda$  zachodzi dzięki antyterminatorowemu białku Q, którego gen jest pod kontrolą promotora  $p_R$ . Rozpoznaje ono dwie specyficzne sekwencje (QBE) na DNA pomiędzy miejscem -10 a -35 promotora  $p_R$ . Podczas transkrypcji z tego promotora polimeraza RNA zatrzymuje się na specyficznej sekwencji tuż za promotorem tworząc kompleks mający cechy kompleksu zamkniętego i otwartego. Dopiero oddziaływanie z białkiem Q związanym z sekwencją QBE umożliwia powstanie stabilnego kompleksu elongacyjnego. Antyterminator może przyłączyć się do polimerazy, ponieważ dochodzi do destabilizacji oddziaływań pomiędzy podjednostką  $\sigma^{70}$  a podjednostką  $\beta$  polimerazy RNA przez nowopowstający transkrypt [57]. Białko Q współzawodniczy z podjednostką  $\sigma^{70}$  o miejsce w podjednostce  $\beta$  polimerazy RNA. Specjalne miejsca wiązania na promotorze  $p_R$  oraz oddziaływania z polimerazą sprawiają, że antyterminator Q jest specyficzny tylko dla tego promotora [16]. Związanie polimerazy RNA z białkiem Q powoduje, że nie rozpoznaje ona terminatorów i następuje transkrypcja genów strukturalnych faga oraz genów umożliwiających lizę komórki gospodarza, czyli tzw. genów późnych. Schemat przedstawiający fazę wyboru rozwoju litycznego znajduje się na Rys. 5.

W końcowym etapie rozwoju litycznego dochodzi do składania główek fagowych, w czym udział biorą również bakteryjne białka szoku termicznego GroEL i GroES [64]. Do główek pakowane jest DNA bakteriofaga, cięte w miejscach *cos*, eksponowanych przez białko IHF. Następnie do wypełnionej główki przyłączany jest ogonek i potomne cząstki fagowe uwalniają się z komórki gospodarza w procesie lizy. Liza komórki bakteryjnej zachodzi dzięki fagowym białkom S, R, Rz i Rz1. Gen S koduje dwa rodzaje holiny S105 i S107. Holina S105 niszczy błony komórkowe, a białko S107 działa jak antyholina, hamując aktywność białka S105. Holina S105 tworzy oligomeryczne pory w błonie wewnętrznej przez które wydostaje się endolizyna R, niszcząca ścianę komórkową bakterii [70]. Kolejne białko Rz, umiejscowione jest w błonie wewnętrznej a Rz1 w błonie zewnętrznej. Ich C-końce wystają do przestrzeni

peryplazmatycznej. W ostatnim etapie lizy zmieniają swoją konformację, oddziałują ze sobą i powodują połączenie błony zewnętrznej z wewnętrzną, co usuwa ostatnią barierę do uwolnienia potomnych cząstek fagowych. Ostatni etap może być istotny w naturalnym środowisku gdzie jest więcej jonów dwuwartościowych stabilizujących błonę zewnętrzną [9]. W wyniku cyklu litycznego powstaje około 100 nowych cząstek fagowych mogących zakażać kolejne komórki *Escherichia coli* [59, 93, 95].

W podsumowaniu należy zaznaczyć, że poszczególne etapy rozwoju wszystkich bakteriofagów lambdoidalnych, łącznie z fagami niosącymi geny toksyn Shiga, przebiegają podobnie, aczkolwiek mogą różnić się w szczegółach. Niemniej jednak, szczegółowe poznanie mechanizmów regulujących rozwój tych fagów ma ogromne znaczenie dla zrozumienia mechanizmu patogenności szczepów EHEC.

## 5. Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC)

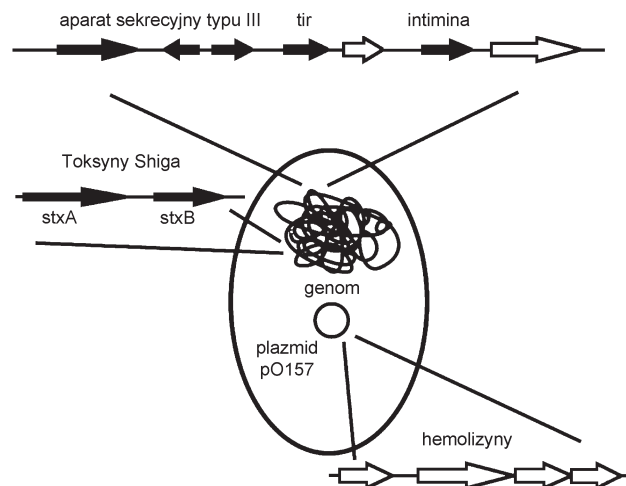
Gospodarzem dla bakteriofagów przenoszących geny toksyn Shiga są enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC). Wywołują one u ludzi krwotoczne zapalenie okrężnicy (HC) oraz zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS). Ze względu na częstość powodowania objawów chorobowych i epidemii u ludzi podzielono je na 5 seropatotypów od A do E. Najczęściej opisywane bakterie *E. coli* produkujące toksyny Shiga to O157:H7, należące do seropatotypu A, który zawiera najbardziej wirulentne szczepy EHEC. Zakażenie tą bakterią daje najsilniejsze objawy chorobowe, które najczęściej rozwijają się w zespół hemolityczno-mocznicowy, najczęściej też dochodzi do powikłań oraz do epidemii w porównaniu z innymi serotypami EHEC [27]. Infekcja tym szczepem jest najbardziej niebezpieczna u dzieci do 10 roku życia i u ludzi starszych, ponieważ u tych osób istnieje najwyższe prawdopodobieństwo wystąpienia HUS. 80% przypadków kończących się zespołem hemolityczno-mocznicowym jest spowodowana przez szczep *E. coli* O157:H7. Wśród pacjentów zakażonych EHEC z krwotocznym zapaleniem okrężnicy od 3 do 15% przypadków może rozwinąć się w HUS, z czego śmiertelność wynosi około 10% [65]. Zespół hemolityczno-mocznicowy charakteryzuje się ostrą niewydolnością nerek, anemią i małopłytkowością. Również inne organy takie jak: płuca, trzustka czy serce mogą zostać uszkodzone [28]. Część pacjentów cierpi też na problemy ze strony układu nerwowego takie jak: śpiączka, dezorientacja, letarg [65].

Rezerwuarem szczepów EHEC są przeżuwacze, głównie bydło i inne zwierzęta gospodarskie, ale występują też u zwierząt domowych np. psów oraz u dzikich zwierząt. Szczepy EHEC bytują w jelitach tych organizmów nie powodując objawów chorobowych. Do zakażenia tymi patogenami dochodzi najczęściej przez

zjedzenie zainfekowanego niedogotowanego mięsa, głównie wołowiny, lecz również przez spożycie zainfekowanego surowego mleka lub jego przetworów, np. sera czy jogurtu. Kolejnym źródłem zakażenia mogą być niedomyte warzywa hodowane na nawozach organicznych lub kielki tak hodowanych roślin. Także wypicie zainfekowanej wody czy nawet kąpiel w takiej wodzie może prowadzić do zakażenia EHEC. Kolejną drogą zakażenia tymi patogenami jest bezpośredni kontakt ze zwierzęciem lub z człowiekiem będącym nosicielem [27].

Cechą charakterystyczną dla zakażeń EHEC jest bardzo niska dawka infekcyjna wynosząca poniżej 100 komórek, wystarczająca do rozwoju objawów chorobowych. Kolejną cechą jest wysoka oporność na niekorzystne warunki wzrostu. W związku z tym, że bakterie te muszą przejść przez kwaśne środowisko żołądka wykazują dużą oporność na niskie pH. Rosną też w szerokim zakresie temperatur. Następnymi cechami tych patogenów jest niezdolność do fermentacji sorbitolu oraz nie produkują one  $\beta$ -glukuronidazy. Jednak nie wszystkie szczepy O157:H7 wykazują te właściwości i są takie, które fermentują sorbitol oraz produkują  $\beta$ -glukuronidazę [40]. Powoduje to, że mikrobiologiczne testy na obecność tej bakterii są nieskuteczne. Również testy immunologiczne nie są dostatecznie wiarygodne, ponieważ jest wiele serotypów powodujących podobne objawy chorobowe. W diagnostyce EHEC najlepiej sprawdzają się testy genetyczne oparte na wykrywaniu genów toksyny Shiga [48].

Szczepy EHEC kolonizują jelito grube człowieka, przylegając do komórek nabłonka gdzie następnie wydzielana jest toksyna Shiga. Dzięki zmysłowi gęstościowemu rozpoznają środowisko jelita i następuje aktywacja genów odpowiedzialnych za kolonizację, które znajdują się na wyspie patogenicznej *LEE*. Wyspa ta zawiera geny kodujące aparat sekrecyjny typu III, przez który wydzielane są różne białka Esp oraz białko Tir, również kodowane na *LEE*. Kolejnym genem występującym na tej wyspie jest gen *eae* kodujący główne białko adhezyjne, intyminę. Intymina znajduje się na powierzchni komórek bakteryjnych i jest rozpoznawana przez bakteryjne białko Tir umiejscowione w błonie komórek gospodarza co powoduje przyleganie bakterii do ściany jelita [27]. Intymina rozpoznaje również eukariotyczne białko nukleolinę będące na powierzchni różnych komórek, co zwiększa adhezję bakterii do komórek eukariotycznych [67]. Białko Tir wraz z białkami Esp powoduje też transdukcję sygnału w komórkach eukariotycznych, w wyniku czego dochodzi do zmiany struktury cytoszkieletu [27]. Następnie jest uwalniana toksyna Shiga, która uszkadza komórki nabłonkowe jelita oraz naczynia krwionośne, co powoduje krwawienie do światła jelita [40]. Obecność toksyny zwiększa również zdolność bakterii do przylegania do komórek nabłonka i kolonizacji jelita przez zwiększenie ilości białka nukle-



Rys. 6. Główne czynniki wirulencji enterokrwtoczących szczepów *Escherichia coli* O157:H7

oliny na powierzchni komórek eukariotycznych [67]. Toksyna ta może przedostać się do krwiobiegu i powodować uszkodzenia organów wewnętrznych, głównie nerek [40]. Ekspresja genów znajdujących się na wyspie patogenicznej *LEE* następuje w późnej fazie wzrostu wykładniczego, a genów toksyn Shiga wzrasta podczas wejścia w fazę stacjonarną wzrostu bakterii [8].

Szczepy *Escherichia coli* O157:H7 posiadają też plazmid *pO157* o wielkości od 93,6 do 104 kpb, na którym znajdują się różne geny mogące wpływać na wirulencję tej bakterii. Należy do nich enterohemolizyna (Ehly), należąca do rodziny toksyn RTX. Może ona być wykorzystywana do lizy erytrocytów i uwalniania jonów żelaza, które przyspieszają wzrost bakterii. Szczep ten posiada specjalny system transportu żelaza umożliwiający wykorzystanie hemu i hemoglobiny jako źródła żelaza [54]. Na plazmidzie może znajdować się również gen kodujący toksynę *ToxB* podobną do toksyn *Clostridium difficile* oraz gen *katP* kodujący białko o aktywności katalazy i peroksydazy [40, 41]. Główne czynniki wirulencji zostały przedstawione na Rys. 6.

## 6. Toksyny Shiga

Głównym czynnikiem wirulencji EHEC jest toksyna Shiga. Wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje tych toksyn: Stx1 i Stx2. Białko Stx1 enterohemolitycznych *Escherichia coli* jest identyczne do toksyny Shiga pochodzącej ze szczepu *Shigella dysenteriae* I. Natomiast białko Stx2 jest homologiczne z Stx1 w 55% w podjednostce A i 57% w podjednostce B. Do tego można wyróżnić kilka wariantów toksyny Stx2 różniących się między sobą sekwencją aminokwasową: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2v i inne. Komórka bakteryjna szczepu EHEC może kodować tylko toksynę Stx1 lub Stx2, może kodować też obie te toksyny lub różne warianty białka Stx2 [54]. *E. coli*

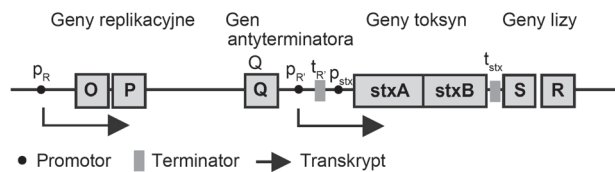
O157:H7 najczęściej koduje toksynę Stx2, która jest bardziej toksyczna dla komórek nabłonka jelita i nerek oraz częściej powoduje HUS niż toksyna Stx1.

Toksyny Shiga są podobnie zbudowane. Składają się z jednej domeny A o wielkości 32 kDa i pierścienia zbudowanego z pięciu domen B, każda o wielkości 7,7 kDa. C-koniec domeny A jest zakotwiczony wewnątrz pentameru B. Pierścień zbudowany z domen B rozpoznaje specyficzny receptor na powierzchni komórek eukariotycznych Gb<sub>3</sub> (Stx2e wiąże się z receptorem Gb<sub>4</sub>). Poprzez endocytozę toksyna zostaje wprowadzona do wnętrza komórki gdzie może ulec fuzji z lizosomem, dzięki czemu jest degradowana. Może też być transportowana do aparatu Golgiego. W takim przypadku, przechodzi następnie do retikulum endoplazmatycznego, gdzie domena A toksyny jest odcinana przez proteazę od podjednostki B. Powstaje katalitycznie aktywny fragment A1 (27 kDa) i fragment A2 (4 kDa). Uwolniony do cytoplazmy fragment A1 ma aktywność N-glikozydazy RNA i tnie specyficzne wiązanie w 28S rRNA. Powoduje to zahamowanie łączenia się amino-acylo-tRNA do podjednostki 60S rybosomu, a w konsekwencji zatrzymanie procesu syntezy białek, a to prowadzi do śmierci komórki [40].

Geny toksyn Shiga znajdują się w genomie profagów lambdoidalnych zintegrowanych z chromosomem bakteryjnym. Mogą się one znajdować na funkcjonalnych jak i kryptycznych profagach. Szczep *E. coli* O157:H7 EDL933 posiada 18 profagów i elementów pochodzenia fagowego [31]. Toksyny te są kodowane przez dwa geny: *stxA* kodujący domenę A i *stxB* kodujący domenę B. Gen *stxA* jest wydajniej transkrybowany niż gen *stxB* [32]. Znajdują się one wśród genów późnych bakteriofaga pomiędzy genami Q i S. Powoduje to, że ich ekspresja jest pod kontrolą późnego fagowego promotora  $P_R$  i antyterminatorowego białka Q. Co więcej, również uwolnienie toksyny Shiga jest regulowane poprzez lizę komórek bakteryjnych przez białka bakteriofagowe.

Szczepy EHEC nie posiadają systemu do sekrecji toksyn Shiga. Produkcja dużej ilości tych toksyn jest związana z cyklem rozwojowym faga, następuje tylko po indukcji profaga i jest uwolniona do wnętrza jelita razem z potomnymi fagami przez lizę komórki bakteryjnej. Dotyczy to zarówno toksyny Stx2 [89] jak i Stx1 [90]. Geny toksyn Stx1 i Stx2 posiadają również własne promotory, które różnią się między sobą, ale wydajność transkrypcji jest podobna [85]. Schemat przedstawiający lokalizację genów toksyny na chromosomie faga znajduje się na Rys. 7.

Promotor  $P_{stx1}$  zawiera miejsce wiązania bakteryjnego białka Fur, przez co jest zależny od stężenia jonów żelaza [11]. Wysokie stężenie tych jonów powoduje zahamowanie transkrypcji z tego promotora [92]. Natomiast aktywność promotora  $P_{stx2}$  jest niezależna od jonów żelaza. Nie posiada on miejsca wiązania białka



Rys. 7. Lokalizacja genów toksyny Shiga w genomie bakteriofaga (na schemacie przedstawiony jest jedynie fragment tego genomu – porównaj z Rys. 1)

Fur. Na ekspresję z tego promotora nie mają też wpływu warunki tlenowe wzrostu bakterii, źródło węgla, wartość pH od 6,5 do 8,5 ani różne stężenia octanu sodu. Jednak fagi które mają insercje w tym promotorze oraz posiadają gen Q podobny do genu Q faga  $\phi$ 21, produkują małą ilość toksyny w porównaniu z fagami o niezmiennym promotorze  $P_{stx2}$  i genie Q podobnym do genu Q faga 933W [49].

W związku z tym, że produkcja toksyny jest związana z indukcją profaga, zależy ona od bakteryjnego białka RecA, powodującego trawienie represora fagowego [51]. Ilość produkowanej toksyny zależy też od rodzaju bakteriofaga i od szczepu bakteryjnego [87]. Szczep O157:H7 produkuje większe ilości toksyny niż inne szczepy zarówno podczas spontanicznej indukcji jak i po indukcji spowodowanej mitomycyną C, co może mieć wpływ na większą wirulentność tych szczepów [69].

W związku z mechanizmem produkcji toksyny przez szczepy EHEC trudno jest leczyć pacjentów zakażonych tymi bakteriami. Syntezę toksyny wywołują różne antybiotyki, nie tylko te, które wywołują odpowiedź S.O.S. Wykazano, że również niektóre makrolidy, np. erytromycyna u jednych szczepów EHEC obniża produkcję białka Stx, a u innych podwyższa. Podobna sytuacja dotyczy niektórych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, które są podawane podczas biegunki będącej pierwszym objawem po zakażeniu EHEC [26]. W związku z tym podawanie antybiotyków i innych antibakteryjnych leków jest problematyczne, ponieważ może nasilić objawy chorobowe i zwiększyć ryzyko wystąpienia HUS [65] oraz spowodować rozprzestrzenianie się fagów przenoszących toksynę Shiga wśród innych szczepów bakteryjnych. Również na farmach powinno się z dużą ostrożnością używać antybiotyków aby nie sprzyjać rozprzestrzenianiu się tych fagów wśród innych szczepów *Enterobacteriaceae* [97].

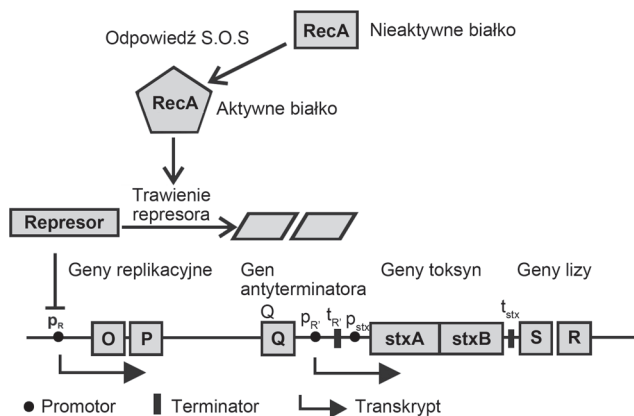
Wykazano też, że około 10% pacjentów chorych na raka i traktowanych mitomycyną C cierpi na niewydolność nerek związaną z zespołem hemolityczno-mocznicowym [51]. Być może ma to związek z wywołaniem produkcji toksyn Shiga przez bakterie EHEC bezobjawowo zasiedlające do tej pory jelito. Do niedawna nie znano czynnika w jelicie człowieka, który powoduje indukcję profagów kodujących białka Stx [27]. Nie wiadomo również dlaczego część osób jest nosicielami tych bakterii i nie wykazuje objawów chorobowych dopóki

nie zażyje odpowiedniego antybiotyku [21]. Może to być związane z naturalną florą bakteryjną jelita, co pokazano na mysim modelu. Powoduje ona zmniejszenie możliwości kolonizacji jelita i przetrwania szczepów EHEC. Może też mieć wpływ na ilość produkowanej toksyny Shiga. Jeśli naturalna flora jelitowa jest oporna na faga kodującego toksynę to ilość produkowanego białka Stx maleje. Jeśli natomiast jest wrażliwa na takiego faga to dochodzi do produkcji dużo większej ilości toksyny [23]. Wśród ludzkiej flory jelitowej znaleziono szczepy *E. coli* powodujące zahamowanie wzrostu szczepów EHEC [66].

## 7. Indukcja profagów niosących geny toksyn Shiga

Mechanizm indukcji profagów niosących geny toksyn Shiga jest podobny jak u bakteriofaga  $\lambda$ . Związany jest z aktywnością bakteryjnego białka RecA wiążącego się do jednoniciowych fragmentów DNA, co wywołuje odpowiedź S.O.S. Białko RecA bierze udział w trawieniu fagowego represora CI co powoduje wycięcie się profaga z genomu bakteryjnego i zapoczątkowuje rozwój lityczny [20]. Prowadzi to do powstania białka Q i transkrypcji z promotora  $p_R$ , pod którego kontrolą są geny *stxA* i *stxB*. Powstaje duża ilość toksyny, która jest uwalniana podczas lizy komórek bakteryjnych przez białka fagowe [86] (Rys. 8).

Wszystkie czynniki, które uszkadzają DNA wywołują indukcję profagów lambdoidalnych. Należą do nich między innymi promieniowanie UV, mitomycyna C, ale również szereg innych antybiotyków np. norfloksacyna, która początkowo była rekomendowana przy leczeniu zakażeń EHEC [50]. Indukcję tych profagów wywołują również czynniki używane do konserwacji żywności takie jak wysokie ciśnienie hydrostatyczne [2] czy promieniowanie kobaltu-60 co może mieć wpływ na rozprzestrzenianie się tych bakteriofagów [96]. Profagi kodujące toksynę Stx indukują się z większą częstością niż profagi nie posiadające genów tej toksyny [44]. W przypadku faga 933W jest to związane ze słabszym oddzia-



Rys. 8. Czynniki prowadzące do indukcji profaga i ekspresji genów toksyn Shiga

ływaniem pomiędzy rep resorem CI a miejscem operatorowym  $O_{R'2}$  w promotorze  $p_R$  [18]. Ostatnio opublikowane wyniki badań wskazały, że czynnikiem efektywnie indukującym profagi niosące geny toksyn Shiga jest nadtlenek wodoru [45, 46]. Jest to odkrycie o tyle istotne, że warunki stresu oksydacyjnego mogą potencjalnie występować w jelicie człowieka, szczególnie w warunkach infekcji bakteryjnej i zależnej od funkcji neutrofilii (wydzielających  $H_2O_2$ ) odpowiedzi immunologicznej.

Oprócz indukcji wymuszonej czynnikami wywołującymi odpowiedź S.O.S dochodzi też do indukcji spontanicznej bakteriofagów przenoszących geny toksyn Shiga. Związane jest to z różnicami w fizjologii bakterii raczej niż z różnicami w poziomie ekspresji represora i tylko mała frakcja lizogenów indukuje się spontanicznie [44]. Niewątpliwie ilość produkowanej toksyny a co za tym idzie wirulencja szczepów EHEC zależy od wydajności indukcji profagów [83] oraz wydajności procesu replikacji DNA faga wpływającego na liczbę kopii genów *stx* w komórce [55, 56].

Indukcja profagów niosących geny toksyn Shiga zależy także od miejsca integracji w genomie gospodarza. Do tej pory znaleziono 5 głównych miejsc integracji genomu fagów kodujących toksynę Shiga w chromosomie *E. coli*. Dwa najczęściej występujące miejsca to gen *yehV*, kodujący regulator transkrypcyjny i *wrbA*, kodujący oksydoreduktazę. Kolejne geny to *sbcB*, kodujący egzozonukleazę, *z2577* kodujący oksydoreduktazę i *yecE* o nieznannej funkcji [76].

Miejsce integracji zależy od rodzaju faga i od dostępności danego miejsca integracji. Fagi kodujące toksynę Stx1 najczęściej wybierają gen *yehV*. To samo miejsce wybierają też fagi kodujące toksynę Stx2, ale jeśli jest ono zajęte przez innego faga to integrują się w genie *wrbA* [78]. Natomiast fagi kodujące toksynę Stx2c integrują się w miejscu genu *sbcB*, dzięki czemu w chromosomie bakteryjnym może znajdować się kilka różnych kopii genu toksyny [84]. Ten sam bakteriofag może również integrować się w kilku miejscach w tej samej komórce bakteryjnej. Uwarunkowane jest to kodowaniem genu dla białka anty-represora, co umożliwia superinfekcję tym samym fagiem [19]. Miejsce insercji oraz utrzymanie się profaga zależy od tła genetycznego gospodarza [24]. Wykazano, że gdy z genomem bakteryjnym są zintegrowane dwa profagi kodujące toksynę Shiga to po działaniu czynnikiem indukującym indukuje się tylko jeden z nich. Wpływają one zatem nawzajem na ekspresję swoich genów [53].

## 8. Rola represora CI i miejsc operatorowych fagów kodujących toksynę Shiga

Podczas powstania stanu profaga a następnie jego indukcji ważną rolę może odgrywać białko represora CI oraz miejsca operatorowe wczesnych genów faga,

tak samo jak ma to miejsce w przypadku bakteriofaga  $\lambda$ . Wykazano różnice w oddziaływaniu białka represora z miejscami operatorowymi  $O_R$  i  $O_L$  pomiędzy fagiem  $\lambda$  a fagami przenoszącymi geny toksyn Shiga, które mogą wpływać na rozwój tych fagów oraz produkcję toksyny. Bakteriofag 933W, tak jak fag  $\lambda$ , posiada trzy miejsca operatorowe  $O_R$  [37, 59, 95]. Wiązanie represora do miejsc  $O_{R1}$  i  $O_{R2}$  hamuje transkrypcję z promotora  $p_R$  i aktywuje działanie promotora  $p_M$  u obu bakteriofagów. Jednak u faga  $\lambda$  dochodzi do kooperatywnego wiązania podobnej ilości represora do obu tych miejsc. Natomiast ilość represora faga 933W potrzebna do związania się z operatorem  $O_{R2}$  jest czterokrotnie wyższa niż do operatora  $O_{R1}$ . Związane jest to z niższą zdolnością wiązania się represora do operatora  $O_{R2}$  i brakiem kooperatywności wiązania [37]. Powodować to może mniejszą stabilność lizogenów faga 933W niż faga  $\lambda$ , ponieważ mniejsze różnice w ilości represora mogą prowadzić do indukcji profaga. U obu tych fagów wiązanie represora do operatora  $O_{R3}$  powoduje zahamowanie ekspresji z promotora  $p_M$  [37, 59, 95].

Kolejną różnicą pomiędzy tymi bakteriofagami jest to, że fag 933W posiada tylko dwa miejsca operatorowe  $O_L$  a nie trzy tak jak fag  $\lambda$ . Jednak wiązanie represora 933W do tylko dwóch miejsc operatorowych jest wystarczające do zahamowania ekspresji z promotora  $p_L$ . Również miejsce cięcia represora przez białko RecA jest inne u faga 933W niż u faga  $\lambda$ . Do cięcia u faga 933W dochodzi pomiędzy leucyną a glicyną a nie alaniną i glicyną jak to ma miejsce u faga  $\lambda$  [37].

Natomiast bakteriofag H-19B posiada cztery miejsca operatorowe  $O_R$ . Represor CI faga H-19B najpierw wiąże się do operatora  $O_{R1}$ , a potem do pozostałych operatorów. Jednak ilość represora potrzebna do związania się z operatorami  $O_{R2}$  i  $O_{R3}$  jest tylko nieco wyższa niż w  $O_{R1}$ . Również siła wiązania represora do operatora  $O_{R2}$  wydaje się być niezależna od związania represora w operatorze  $O_{R1}$ . Bakteriofag H-19B tak jak fag  $\lambda$  posiada trzy miejsca  $O_L$  [79]. Białko represora fagów kodujących toksynę Shiga bierze również udział w procesie insercji drugiego takiego bakteriofaga do genomu gospodarza. Powoduje też, że podwójne lizogeny są bardziej stabilne, a co za tym idzie rzadziej dochodzi do indukcji profaga i rozpoczęcia cyklu litycznego, czyli zmniejsza ilość produkowanej toksyny [77].

## 9. Podsumowanie

Mimo intensywnej badań dotyczących bakteriofagów przenoszących geny toksyn Shiga nadal niewiele wiadomo co powoduje indukcję tych profagów, a co za tym idzie produkcję dużej ilości toksyny w jelitach człowieka [27]. Wykazano, że dodanie enterokrwotocznej *E. coli* do hodowli tkankowej ludzkich neutrofilów powo-

duje produkcję i uwolnienie toksyny Shiga. Neutrofile podczas kontaktu z patogenem wydzielają nadtlenek wodoru [88], który jest czynnikiem uszkadzającym DNA. W tym świetle ważne wydają się ostatnie doniesienia o indukcji profagów niosących geny toksyn Shiga pod wpływem działania nadtlenku wodoru [45, 46]. Warto zauważyć, że podczas stanu zapalnego wywołanego toksyną Shiga dochodzi do przenikania neutrofilów w miejsce zapalne. Toksyna ta powoduje również opóźnienie apoptozy neutrofilów, co może prowadzić do dodatkowych uszkodzeń tkanek przez te komórki [42]. Co więcej, również bakterie obecne w ludzkim jelicie mogą powodować powstawanie reaktywnych form tlenu [39], które powodują indukcję profaga  $\lambda$  i innych fagów lambdoidalnych [43].

Należy stwierdzić, że niewiele też wiadomo o rozwoju bakteriofagów niosących geny toksyn Shiga. Nasza wiedza w tym względzie opiera się głównie na znajomości procesów zachodzących podczas rozwoju faga  $\lambda$ , najlepiej poznanej przedstawiciela fagów lambdoidalnych. Problem ten dotyczy zarówno rozwoju lizogenicznego jak i rozwoju litycznego po indukcji profaga, i to zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i w warunkach powolnego wzrostu komórek bakteryjnych występujących w jelitach. Wiadomo, że rozwój bakteriofaga  $\lambda$  zależy od stanu fizjologicznego komórek gospodarza i jest zahamowany podczas powolnego wzrostu komórek bakteryjnych [47].

Konkludując, należy podkreślić iż pomimo podobieństw w budowie i funkcji pomiędzy fagiem  $\lambda$  a fagami lambdoidalnymi niosącymi geny toksyn Shiga, szczegółowe mechanizmy regulujące rozwój tych ostatnich, a co zatem idzie produkcję toksyn, pozostają niedostatecznie poznane, szczególnie przy wzięciu pod uwagę specyficznych warunków panujących w świetle ludzkiego jelita jako środowiska bytowania EHEC. Konieczne są zatem dalsze intensywne badania nad tymi mechanizmami, które w ostateczności powinny pozwolić nam poznać sposoby zapobiegania skutkom infekcji szczepami EHEC lub efektywnego leczenia.

## Piśmiennictwo

1. Acheson D.W.K., Reidl J., Zhang X., Keusch G.T., Mekalanos J.J., Waldor M.K.: *In vivo* transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. *Infect. Immun.* **66**, 4496–4498 (1998)
2. Aertsen A., Faster D., Michiels C.W.: Induction of Shiga toxin-converting prophage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1155–1162 (2005)
3. Allison H.E., Sergeant M.J., James C.E., Saunders J.R., Smith D.L., Sharp R.J., Marks T.S., McCarthy A.J.: Immunity profiles of wild-type and recombinant Shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect. Immun.* **71**, 3409–3418 (2003)
4. Altuvia S., Oppenheim A.B.: Translational regulatory signals within the coding region of the bacteriophage  $\lambda$  cIII gene. *J. Bacteriol.* **167**, 415–419 (1986)

5. Asadulghani M., Ogura Y., Ooka T., Itoh T., Sawaguchi A., Iguchi A., Nafayama K., Hayashi T.: The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog.* **5**, e1000408 (2009)
6. Atsumi S., Little J. W.: Role of the lytic repressor in prophage induction of phage  $\lambda$  as analyzed by a module-replacement approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4558–4563 (2006)
7. Babic A. C., Little J. W.: Cooperative DNA binding by CI repressor is dispensable in a phage  $\lambda$  variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17741–17746 (2007)
8. Bergholz T.M., Wick L.M., Qi W., Riordan J.T., Ouellette L.M., Whittam T.S.: Global transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium. *BMC Microbiol.* **7**, 97 (2007)
9. Berry J., Summer E.J., Struck D.K., Young R.: The final step in the phage infection cycle: the RZ and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Mol. Microbiol.* **70**, 341–35 (2008)
10. Brussow H., Hendrix R.W.: Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, **108**, 13–16 (2002)
11. Calderwood S.B., Mekalanos J.J.: Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *J. Bacteriol.* **169**, 4759–4764 (1987)
12. Campbell A., Botstein D.: Evolution of the lambdoid phages (w:) Lambda II red. Hendrix R.W., Roberts J.W., Stahl F.W., Weisberg R.A., Cold Spring Harbor, Lab. Press, New York, USA, 1983 s. 365–380
13. Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennoufi S., Dillman M.-L., Brussow H.: Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opinion Microbiol.* **6**, 417–424 (2003)
14. Creuzburg K., Kohler B., Hempel H., Schreier P., Jacobs E., Schmidt H.: Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1. *Microbiol.* **151**, 941–950 (2005)
15. Cornick N.A., Helgeson A.F., Mai V., Ritchie J.M., Acheson D.W.K.: In Vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5086–5088 (2006)
16. Deighan P., Montero Diez C., Leibman M., Hochschild A., Nickels B.E.: The bacteriophage  $\lambda$  Q antiterminator protein contacts the  $\beta$ -flap domain of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15305–15310 (2008)
17. Edgar R., Rokney A., Feeney M., Semsey S., Kessel M., Goldberg M.B., Adhya S., Oppenheim A.B.: Bacteriophage infection is targeted to cellular poles. *Mol. Microbiol.* **68**, 1107–1116 (2008)
18. Evans T., Bowers R.G., Mortimer M.: Modelling the stability of Stx lysogens. *J. Theor. Biol.* **248**, 241–250 (2007)
19. Fogg P.C.M., Gossage S.M., Smith D.L., Saunders J.R., McCarthy A.L., Allison H.E.: Identification of multiple integration sites for Stx-phage  $\phi$ 24<sub>B</sub> in the *Escherichia coli* genome, description of a novel integrase and evidence for a functional anti-repressor. *Microbiol.* **153**, 4098–4110 (2007)
20. Fuchs S., Muhldorfer I., Donohue-Rolfe A., Kerenyi M., Emody L., Alexiev R., Nenkov P., Hacker J.: Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb. Pathog.* **27**, 13–23 (1999)
21. Gamage S.D., Strasser J.E., Chalk C.L., Weiss A.A.: Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. *Infect. Immun.* **71**, 3107–3115 (2003)
22. Gamage S.D., Patton A.K., Hanson J.F., Weiss A.A.: Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infect. Immun.* **72**, 7131–7139 (2004)
23. Gamage S.D., Patton A.K., Strasser J.E., Chalk C.L., Weiss A.A.: Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157:H7 persistence and Shiga toxin production in the mouse intestine. *Infect. Immun.* **74**, 1977–1983 (2006)
24. Garcia-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., Blanch A.R.: Genotypic and phenotypic diversity among induced, stx2-carrying bacteriophages from environmental *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 329–336 (2009)
25. Giese K.C., Michalowski C.B., Little J.W.: RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *J. Mol. Biol.* **377**, 148–161 (2008)
26. Grif K., Dierich M.P., Karch H., Allerberger F.: Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 761–766 (1998)
27. Gyles C.L.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* **85**, 45–62 (2007)
28. Hendrix R.W., Smith M.C.M., Burns R.N., Ford M.E., Hatfull G.F.: Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2192–2197 (1999)
29. Hendrix R.W., Lawrence J.G., Hatfull G.F., Casjens S.: The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol.* **8**, 504–508 (2000)
30. Hendrix R.W.: Bacteriophage genomics. *Curr. Opinion Microbiol.* **6**, 506–511 (2003)
31. Herold S., Karch H., Schmidt H.: Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 115–121 (2004)
32. Herold S., Siebert J., Huber A., Schmidt H.: Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 931–944 (2005)
33. Jasiński J., Węgrzyn G.: Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. *EMBO Rep.* **4**, 172–177 (2003)
34. Jeembaeva M., Castelnovo M., Larsson F., Evilevitch A.: Osmotic pressure: resisting or promoting DNA ejection from phage? *J. Mol. Biol.* **381**, 310–323 (2008).
35. Johansen B.K., Wasteson Y., Granum P.E., Brynstad S.: Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiol.* **147**, 1929–1936 (2001)
36. Kobiler O., Rokney A., Oppenheim A.B.: Phage lambda CIII: a protease inhibitor regulating the lysis-lysogeny decision. *PLoS ONE*, **2**, e363 (2007)
37. Koudelka A.P., Hufnagel L.A., Koudelka G.B.: Purification and characterization of the repressor of the Shiga toxin-encoding bacteriophage 933W: DNA binding, gene regulation and auto-cleavage. *J. Bacteriol.* **186**, 7659–7669 (2004)
38. Kuhn J., Campbell A.: The bacteriophage  $\lambda$  attachment site in wild strains of *Escherichia coli*. *J. Mol. Evol.* **53**, 607–614 (2001)
39. Kumar A., Wu H., Collier-Hyams L.S., Hansen J.M., Li T., Yamoah K., Pan Z.Q., Jones D.P., Neish A.S.: Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J.* **26**, 4457–4466 (2007)
40. Law D.: Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. App. Microbiol.* **88**, 729–745 (2000)
41. Lim J.Y., Yoon J.W., Hovde C.J.: A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1–10 (2010)
42. Liu J., Akahoshi T., Sasahana T., Kitasato H., Namai R., Sasaki T., Inoue M., Kondo H.: Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* **67**, 6203–6205 (1999)
43. Liu Y., Zhang Q., Fang C., Zhu S., Tang Y., Huang S.: Effect of glutathione on UV induction of prophage lambda. *Arch. Microbiol.* **183**, 444–449 (2005)

44. Livny J., Friedman D.I.: Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system. *Mol. Microbiol.* **51**, 1691–1704 (2004)
45. Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn G., Węgrzyn A.: Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga toxin in response to different induction agents. *Microb. Pathogen.* **47**, 289–298 (2009)
46. Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophages ST2–8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 322–329 (2010)
47. Łoś M., Golec P., Łoś J.M., Węglewska-Jurkiewicz A., Czyż A., Węgrzyn A., Węgrzyn G., Neubauer P.: Effective inhibition of lytic development of bacteriophages  $\lambda$ , P1 and T4 by starvation of their host, *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* **7**, 13 (2007)
48. Łoś M., Łoś J.M., Węgrzyn G.: Rapid identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using electric biochips. *Diagn. Mol. Pathol.* **17**, 179–184 (2008)
49. Matsumoto M., Suzuki M., Takahashi M., Hirose K., Minagawa H., Ohta M.: Identification and epidemiological description of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains producing low amounts of Shiga toxin 2 in Aichi prefecture. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**, 442–445 (2008)
50. Matsushiro A., Sato K., Miyamoto H., Yamamura T., Honda T.: Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. *J. Bacteriol.* **181**, 2257–2260 (1999)
51. Mühlendorfer I., Hacker J., Keusch G.T., Acheson D.W., Tschäpe H., Kane A. V., Ritter A., Olschläger T., Donohue-Rolfe A.: Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **64**, 495–502 (1996)
52. Muniesa M., Recktenwald J., Bielaszewska M., Karch H., Schmidt H.: Characterization of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* **68**, 4850–4855 (2000)
53. Muniesa M., Simon M., Prats G., Ferrer D., Panella H., Jofre J.: Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from single outbreak. *Infect. Immun.* **71**, 4554–4562 (2003)
54. Nataro J.P., Kaper J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–403 (1998)
55. Nejman B., Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn G., Węgrzyn A.: 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. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 211–220 (2009)
56. Nejman B., Nadratowska-Wesołowska B., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Replication of plasmids derived from Shiga toxin-converting bacteriophages in starved *Escherichia coli*. *Microbiol.* **157**, 220–233 (2011)
57. Nickels B.E., Roberts C.W., Roberts J.W., Hochschild A.: RNA-mediated destabilization of the  $\sigma^{70}$  region 4/ $\beta$  flap interaction facilitates engagement of RNA polymerase by the Q antiterminator. *Mol. Cell.* **24**, 457–468 (2006)
58. Ohnishi M., Kurokawa K., Hayashi T.: Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol.* **9**, 481–485 (2001)
59. Oppenheim A.B., Kobilier O., Stavans J., Court D.L., Adhya S.: Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 409–429 (2005)
60. Osterhout R.E., Figueroa I.A., Keasling J.D., Arkin A.P.: Global analysis of host response to induction of a latent bacteriophage. *BMC Microbiol.* **7**, 82 (2007)
61. Papke R.T., Doolittle W.F.: Phage evolution: new worlds of genomic diversity. *Curr. Biology*, **13**, 606–607 (2003)
62. Pennington H.: *Escherichia coli* O157. *Lancet*, **376**, 1428–1435 (2010)
63. Plunkett III G., Rose D.J., Durfee T.J., Blattner F.R.: Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.* **181**, 1767–1778 (1999)
64. Polissi A., Goffin L., Georgopoulos C.: The *Escherichia coli* heat shock response and bacteriophage  $\lambda$  development. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 159–169 (1995)
65. Razzaq S.: Hemolytic Uremic Syndrome: An emerging health risk. *Am. Fam. Physician*, **74**, 991–996 (2006)
66. Reissbrodt R., Hammes W.P., Bello F., Prager R., Fruth A., Hantke K., Rakin A., Starcic-Erjavec M., Williams P.H.: Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 62–69 (2009)
67. Robinson C.M., Sinclair J.F., Smith M.J., O'Brien A.D.: Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9667–9672 (2006)
68. Rozanov D.V., D'ari R., Sineoky S.P.: RecA-independent pathways of lambdoid prophage induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 6306–6315 (1998)
69. Sablet T., Bertin Y., Vareille M., Girardeau J., Garrivier A., Gobert A.P., Martin C.: Differential expression of stx2 variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiol.* **154**, 176–186 (2008)
70. Savva C.G., Dewey J.S., Deaton J., White R.L., Struck D.K., Holzenburg A., Young R.: The holin of bacteriophage lambda forms rings with large diameter. *Mol. Microbiol.* **69**, 784–793 (2008)
71. Scheutz F., Møller Nielsen E., Frimodt-Møller J., Boisen N., Morabito S., Tozzoli R., Nataro J.P., Caprioli A.: Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uremic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* **16**, pii=19889 (2011)
72. Schmidt H., Bielaszewska M., Karch H.: Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage  $\phi$ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3855–3861 (1999)
73. Schmidt H.: Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* **152**, 687–695 (2001)
74. Scott Samuels D., Garon C.F.: Coumermycin A1 inhibits growth and induces relaxation of supercoiled plasmids in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 46–50 (1993)
75. Sekse C., Solheim H., Urdahl A.M., Wasteson Y.: Is lack of susceptible recipients in the intestinal environment the limiting factor for transduction of Shiga toxin-encoding phages? *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1114–1120 (2008)
76. Serra-Moreno R., Jofre J., Muniesa M.: Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J. Bacteriol.* **189**, 6645–6654 (2007)
77. Serra-Moreno R., Jofre J., Muniesa M.: The CI repressor of Shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin. *J. Bacteriol.* **190**, 4722–4735 (2008)
78. Shaikh N., Tarr P.I.: *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* **185**, 3596–3605 (2003)
79. Shi T., Friedman D.I.: The operator-early promoter regions of Shiga-toxin bearing phage H-19B. *Mol. Microbiol.* **41**, 585–599 (2001)

80. Shkilnyj P., Koudelka G.B.: Effect of salt shock on stability of  $\lambda$ imm434 lysogens. *J. Bacteriol.* **189**, 3115–3123 (2007)
81. Smith D.L., James C.E., Sergeant M.J., Yaxian Y., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E.: Short-tailed Stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among *Enterobacteria*. *J. Bacteriol.* **189**, 7223–7233 (2007)
82. St-Pierre F., Endy D.: Determination of cell fate selection during phage lambda infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20705–20710 (2008)
83. Strauch E., Schaudinn C., Beutin L.: First-time isolation and characterization of a bacteriophage encoding the Shiga toxin 2c variant, which is globally spread in strains of *Escherichia coli* O157. *Infect. Immun.* **72**, 7030–7039 (2004)
84. Strauch E., Hammerl J.A., Konietzny A., Schneiker-Bekel S., Arnold W., Goesmann A., Puhler A., Beutin L.: Bacteriophage 2851 is a prototype phage for dissemination of the Shiga toxin variant gene 2c in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **76**, 5466–5477 (2008)
85. Sung L.M., Jackson M.P., O'Brien A.D., Holmes R.K.: Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6386–6395 (1990)
86. Tyler J.S., Mills M.J., Friedman D.I.: The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J. Bacteriol.* **186**, 7670–7679 (2004)
87. Wagner P.L., Acheson D.W.K., Waldor M.K.: Isogenic lysogens of diverse Shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of Shiga toxin. *Infect. Immun.* **67**, 6710–6714 (1999)
88. Wagner P.L., Acheson D.W.K., Waldor M.K.: Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**, 1934–1937 (2001)
89. Wagner P.L., Neely M.N., Zhang X., Acheson D.W.K., Waldor M.K., Friedman D.I.: Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from pathogenic *Escherichia coli* strain. *J. Bacteriol.* **183**, 2081–2085 (2001)
90. Wagner P.L., Livny J., Neely M.N., Acheson D.W.K., Friedman D.I., Waldor M.K.: Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**, 957–970 (2002)
91. Waldor M.K.: Bacteriophage biology and bacterial virulence. *Trends Microbiol.* **6**, 295–297 (1998)
92. Weinstein D.L., Holmes R.K., O'Brien A.: Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **56**, 106–111 (1988)
93. Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$ : nowe odkrycia dokonane przy użyciu starego modelu badawczego. *Post. Biochem.* **52**, 42–48 (2006)
94. Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Formation and stability of the bacteriophage  $\lambda$  replication complexes in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **41**, 157–160 (2000)
95. Węgrzyn G., Węgrzyn A.: Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **79**, 1–48 (2005)
96. Yamamoto T., Kojio S., Taneike I., Nakagawa S., Iwakura N., Wakisaka-Saito N.:  $^{60}\text{Co}$  irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**, 115–121 (2003)
97. Zhang X., McDaniel A.D., Wolf L/E., Keusch G.T., Waldor M.K., Acheson D.W.K.: Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production and death in mice. *J. Infect. Dis.* **181**, 664–70 (2000)
98. Zoja C., Buelli S., Morigi M.: Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 2231–2240 (2010)

Autorzy pragną wyrazić podziękowania wszystkim członkom zespołu naukowego z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego oraz Pracowni Biologii Molekularnej (afiliowanej przy Uniwersytecie Gdańskim) Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, pracującego nad regulacją rozwoju bakteriofagów niosących geny kodujące toksyny Shiga, za zaangażowanie w badania oraz stymulujące dyskusje. Wyżej wspomniane badania są finansowane w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (projekt nr N N301 192439, kierownik: dr hab., prof. PAN Alicja Węgrzyn).