

2_2 Fagi modelowe i ich właściwości_Blasdel

Bob Blasdel, Ph.D

Slajd 1: Rzut oka na fagi modelowe

W latach 30. XX wieku, Max Delbruck, zainspirowany książką Erwina Schrodingera „Czym jest życie?”, przedstawił obraz bakteriofaga jako żywego układu, wystarczająco prostego, żeby móc go w pełni zrozumieć na podstawowym poziomie – nawet przy wykorzystaniu jedynie prostych narzędzi, jakimi dysponowała wówczas jego Grupa Fagowa. Jej członkowie argumentowali, że jeśli mamy kiedykolwiek zrozumieć, jak funkcjonuje życie, należy zacząć od możliwie najprostszego organizmu i sukcesywnie przechodzić do organizmów coraz wyżej uorganizowanych. Delbruck wybrał i nazwał od nowa siedem bezwzględnie litycznych bakteriofagów aktywnych wobec *Escherichia coli* B: uporządkował je w serii, nazywając kolejno od T1 do T7. Głównym celem jego i rosnącej grupy jego współpracowników było pełne zrozumienie mechanizmu działania tych fagów, a następnie wykorzystanie zdobytej wiedzy i przeniesienie ogólnych wniosków na wyższe poziomy: *E. coli*, później myszy i wreszcie – nas, ludzi.

Slajd 2: Co osiągnięto

To spojrzenie na bakteriofagi, w połączeniu z pracami pierwszych biologów fagów, szybko dostarczyło mechanistycznych podstaw, które radykalnie zmieniły nasze rozumienie życia na Ziemi. Wykorzystując prostotę bakteriofagów, opisali oni mutacje jako elementy podlegające selekcji naturalnej, ustalili rolę DNA jako cząsteczki warunkującej dziedziczenie, po raz pierwszy opisali trójkowy charakter kodonów mRNA, a także wyjaśnili centralny dogmat biologii molekularnej. Rzeczywiście, to właśnie elegancja i prostota cyklu litycznego fagów na poziomie mikrobiologicznym pozwoliła Lurii i Delbruckowi zademonstrować, że mutacje genetyczne powstają niezależnie od presji selekcyjnej, a nie jako odpowiedź na nią. Podobnie, to elegancka prostota chemicznej budowy wirionu fagów, złożonego jedynie z dwóch typów makromolekuł, które można było różnicująco znakować izotopami, pozwoliła Hershey'owi i Chase udowodnić raz na zawsze, że to DNA jest nośnikiem cech dziedzicznych.

Także wiele badań dotyczących molekularnych podstaw fizjologii bakterii, biochemii, genetyki, genomiki i wreszcie inżynierii genetycznej stało się możliwych w oparciu o eksperymenty prowadzone dzięki tak dobremu zrozumieniu systemów fagowych. Podobnie, wiele narzędzi biologii molekularnej, które uznajemy dziś za oczywiste, od ligazy DNA T4, po system ekspresyjny T7, wywodzi się od fagów. W obliczu nadzwyczajnych możliwości, jakie stwarzają obecnie techniki „-omiczne” następnej generacji, historyczne ujęcie faga jako podstawowego organizmu modelowego autorstwa Delbrucka ma szansę zyskać nowe znaczenie.

Slajd 3: Bakteriofag T4

Badania nad fagiem T4 i fagami blisko z nim spokrewnionymi w nieoceniony sposób przyczyniły się do zrozumienia podstaw genetyki molekularnej i biochemii. To właśnie fag T4 był organizmem modelowym w przypadku wielu odkryć, które przed chwilą wymieniałem. Swoją wartość fag T4 w dużym stopniu zawdzięcza całkowitemu zastąpieniu cytozyny hydroksymetylocytozyną, która następnie podlega glikozylacji. Dzięki temu jego własne DNA jest chemicznie różne od DNA gospodarza, co pozwala fagowi T4 całkowicie wyłączyć ekspresję genów gospodarza, zapewniając tym samym ekspresję jedynie własnych genów.

Slajd 4: Bakteriofag T7

Fag T7 i fagi blisko z nim spokrewnione są godne uwagi ze względu na prostotę ich systemu transkrypcji i wyjątkową użyteczność wykorzystywanej polimerazy RNA. Po wnikięciu do komórki gospodarza, T7 przejmując aparat transkrypcyjny gospodarza dzięki silnym promotorom sigma70 w celu transkrypcji wczesnych genów, w tym jego własnej, złożonej z jednej podjednostki polimerazy RNA, zanim polimeraza gospodarza zostanie inaktywowana. Fagowa polimeraza RNA odpowiada następnie za transkrypcję pośrednich i późnych genów wykorzystując fagowo-specyficzne promotory. Geny te odpowiadają za replikację genomu faga i składanie wirionów potomnych zdolnych do infekcji. Równoległy system transkrypcyjny, który fag T7 wykorzystuje do transkrypcji własnych pośrednich/późnych genów w czasie gdy ekspresja gospodarza ulega wygaszeniu, jest cechą charakterystyczną podrodziny *Autographvirinae* – a teraz także jednym z najważniejszych narzędzi biologii molekularnej. Kiedy naukowcy chcą poddać ekspresji sekwencję DNA z pominięciem mechanizmów własnych gospodarza, które mogłyby dać nieprzewidziane efekty uboczne, sięgają po sekwencje kontrolowane przez promotor T7, rozpoznawany wyłącznie przez polimerazę T7.

Slajd 5: Bakteriofag N4

Infekcja faga N4 postępuje poprzez sekwencyjną ekspresję genów fagowych z wykorzystaniem trzech różnych polimeraz RNA, w tym jednej polimerazy RNA związanej z wirionem (vRNAP), pakowanej do wnętrza kapsydu razem z DNA. Infekcja faga N4 rozpoczyna się gdy fag wstrzykuje do wnętrza komórki swoją vRNAP oraz krótką sekwencję DNA, która następnie podlega transkrypcji na nici 3'→ 5' z wykorzystaniem czynników gospodarza i vRNAP. Pozwala to zarówno na stworzenie wczesnych transkryptów, jak również na wciągnięcie pozostałej części genomu do wnętrza komórki. Druga polimeraza RNA kodowana przez faga (N4 RNAPII, gp15-16) oraz dwa fagowe czynniki transkrypcyjne (fp01-02) podlegają następnie ekspresji z wczesnych transkryptów i razem odpowiadają za pośrednią fazę transkrypcji, obejmującą geny związane z replikacją DNA. Między nimi znajduje się jedno białko wiążące jednoniciowe DNA, które oddziałuje z czynnikiem sigma70 gospodarza, uruchamiając transkrypcję późnych genów – genów białek strukturalnych i tych zaangażowanych w lizę gospodarza.

Slajd 6: Kontekst taksonomiczny

Należy pamiętać, że nauka o fagach modelowych nie tylko dostarcza nam ważnych informacji na temat ogólnej struktury i funkcji żywych układów, ponieważ ich prostota pozwala nam oddzielić i w pełni zrozumieć te systemy. Daje nam również ważne informacje o tym, jak funkcjonują one i systemy z nimi spokrewnione. Każdy z omówionych trzech kładów fagów jest obecnie brany pod uwagę w kontekście zastosowania terapeutycznego przeciw wielu różnym Gram-ujemnym bakteryjnym patogenom. Każdy ma też znaczący i warty docenienia wpływ na środowisko.