Kwartalnik
Tom 54
Zeszyt 1•2015
STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:
PMKMAV 54 (1)
2015

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,65 (2013)
Impact Factor ISI = 0,271 (2013)
Punktacja MNiSW = 15,00 (2013)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski), JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki),
NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski), EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna), STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), BOHDAN STAROŚCIAK (zastępca),
RADOSŁAW STACHOWIAK (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

ADRESY REDAKCJI

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 04, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

Sekretarz

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 12, fax (22) 554 14 04
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324, fax: (91) 3113186, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl

STALI RECENZENCI:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
JÓZEF KUR (Politechnika Gdańska), EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki zrekombinowanego szczepu Bacillus subtilis w trakcie inwazji komórek eukariotycznych linii HeLa (SEM LEO, powiększenie 2 300 X).
Ze zbiorów Zakładu Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 1150, Objętość 12 ark. wyd., Papier offset 90 g

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 3–4
http://www.pm.microbiology.pl

Wspomnienie

Doc. dr hab. Gustaw Kerszman
1932–2014

W latach 1956–1959 byłem studentem Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, tutaj w Katedrze Mikrobiologii kierowanej przez prof. dr hab. Bernarda Zabłockiego po raz pierwszy spotkałem dr Gustawa Kerszmana. Był on wtedy jednym z wielu pracowników naukowych katedry. W roku 1959 uzyskałem dyplom magistra biologii w zakresie mikrobiologii. Dr Kerszman faktycznie kierował moją pracą magisterską, pełnił formalnie wraz z dr Leonem Sedlaczkiem funkcję opiekuna tej pracy. Niewiele wiedziałem wtedy o Nim, tyle tylko, że był uczniem prof. Zabłockiego i od utworzenia Katedry Mikrobiologii w Łodzi stale z nim współpracował. W czasie prowadzonych przez niego „mini wykładów", poprzedzających ćwiczenia zadziwiał umiejętności przekazywania nie tylko ważnych merytorycznie faktów, ale logiką wykładów oraz atrakcyjną ich formą. Zajmował się już wtedy biologią oraz genetyką bakteriofagów. We wspomnieniu napisanym przez Niego po śmierci prof. Bernarda Zabłockiego napisał, iż osobą która natchnęła go do podjęcia tego tematu oraz zachęcała do jej kontynuowania był zmarły Profesor. Owocem badań nad bakteriofagami była jedna z pierwszych jego publikacji pt. *Restrykcja bakteriofaga lambda w szczepie Escherichia coli* (Książka, Wydawnictwo Uniwersytet Łódzki, 1967).

Gdy dziś porównuję moich ówczesnych mentorów tj. dr Kerszmana i dr Sedlaczka widzę, że różnili się dość znacznie zainteresowaniami naukowymi a przede wszystkim usposobieniem – dr Kerszman mniej uwagi poświęcał pracy eksperymentalnej, natomiast więcej intelektualnej ich interpretacji. Interesowała go w znacznej mierze filozofia. Owocem tych rozważań być może, była wspólnie z innymi autorami napisana książka pt. *Wstęp do filozofii* (autorzy Stefan Amsterdamski, Gustaw Kerszman, Zdzisław Augustynek, Zdzisław Kochański). Myślę, że osobowość dr Kerszmana kształtowana była przez doświadczenia II Wojny Światowej tj. doświadczenia młodego Polaka walczącego o przeżycie. Dowiedziałem się tego wszystkiego niedawno z Jego wspomnień umieszczanych na różnych forach witryn internetowych.

Nagłówki hasła internetowego pt. „*gustaw kerszman*" wyjaśniają: *polski mikrobiolog i genetyk żydowskiego pochodzenia*. Dr Gustaw Kerszman urodził się w 1930 roku w Warszawie, faktycznie w rodzinie obywateli polskich żydowskiego pochodzenia. Ojciec Jego był okulistą, specjalizującym się w chirurgii ocznej, matka ukończyła romanistykę. Kerszmanowie mieszkali w Białymstoku. Należeli do tego odłamu narodu żydowskiego, który swą przyszłość widział w ściślejszej w integracji z polskim społeczeństwem. Rodzice choć znali swoje korzenie, jako ludzie wykształceni i światli, w imię „nowoczesności" jak sądzę, nie chodzili już do synagogi oraz nie uczestniczyli życiu religijnym społeczności żydowskiej białostocku. Jednakże, jeszcze przed wybuchem wojny ich stosunek do tradycji współplemieńców nieco uległ zmianie, a to wskutek nieśmiałej jeszcze propagandy antysemickiej w Białymstoku. W 1941 roku cała rodzina została zamknięta przez Niemców w getcie. Koszmar tych dni i dni następujących po wyzwoleniu Polski opisał dr Kerszman w książce pt. „ *Jak ginąć to razem*" (Książka i Wiedza, 2006). Często w Jego wspomnieniach z przeszłości powracał obraz Jego żydowskich kolegów z Białegostoku, którzy zginęli – pozostał przy życiu tylko On. Podobnie traumatyczne doświadczenia z Warszawy stały się Jego własnością, gdy Kerszmanowie po opuszczeniu w 1943 r. getta białostockiego przedostali się do Warszawy. Ukrywali się na „fałszywych papierach" po aryjskiej stronie, byli świadkami masowej zagłady żydów w getcie warszawskim oraz w czasie powstania w getcie. W Warszawie zginął jego Ojciec zadenuncjowany na gestapo przez tamtejszego szmalcownika. Powstanie Warszawskie przeżył wraz z Matką wśród polskich przyjaciół. Po upadku powstania przebywał w Skierniewicach.

W 1945 przyjechał do Łodzi i zaczął pracować na Uniwersytecie Łódzkim, gdzie w 1967 roku uzyskał tytuł doktora habilitowanego. Rok później ukazała się kolejna Jego książka napisana z Bohdanem Rodkiewiczem pt. *Wykłady z genetyki* (Uniwersytet Łódzki, PWN). Przeżycia wojenne oraz propaganda nowych władz Polski, które obiecywały lepszy świat, zdecydowały – jak sądzę – o opowiedzeniu się dr Kerszmana za nowym porządkiem ustrojowym w Polsce. Zapisał się do Partii, jak zresztą wielu w tym czasie pragnących

działać dla dobra Kraju Polaków. Jednak „ piękne" teorie głoszone przez partię w sposób zasadniczy rozmijają się z praktyką. W kierownictwie łódzkiej organizacji przy UŁ zaczął uchodzić za rewizjonistę. Z partii go nie wyrzucono mimo, że podstawowa komórka partyjna Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, starała się bez powodzenia to uczynić.

Tymczasem od 1967 roku zaczęły w Polsce narastać nastroje antysemickie, początkiem ich stała się wojna sześciodniowa izraelsko-arabska, władze w Polsce uznały Izrael za agresora i rozpętały akcję antysemicką. Znaczenia nabrała w partii frakcja nacjonalistyczna tzw. partyzantów. Nastroje antysemickie wzrosły w następnym roku, gdy po wystawieniu w Warszawie przez Kazimierza Dejmka *Dziadów* Adama Mickiewicza, odpowiedni przedstawiciele PZPR uznali przedstawienie za antyrosyjskie. Władze wstrzymały wystawiania tego spektaklu, co z kolei wywołało antyrządowe demonstracje studenckie, oraz protesty intelektualistów. Władysław Gomułka, ówczesny I sekretarz partii, obarczył winą za niepokoje w kraju syjonistów, którzy stanowić mieli w Polsce „V kolumnę". Zaczęto więc zwalniać z pracy osoby pochodzenia żydowskiego nawet z nie bardzo eksponowanych stanowisk – do zwalnianych należeli głównie profesorowie akademiccy, naukowcy, literaci, artyści itp. W ciągu roku w atmosferze zastraszania wyjechała z „paszportami tylko w jedną stronę" większość ocalałych z Holokaustu polskich inteligentów żydowskiego pochodzenia. Dr Kerszman opuścił Polskę dość późno bo w roku 1969. O decyzji emigracji tak mówił w jednym z wywiadów:

> *Zdecydowaliśmy z matką, że wyjedziemy do Danii albo do Szwecji. Izrael nie wchodził w grę. Jestem Polakiem, zawsze się czułem Polakiem. Owszem, bardzo lubię żydowskie poczucie humoru, ale żydowska kultura nie jest moja. Polska kultura jest moja. Była też kulturą moich rodziców. A to, co mnie łączy z żydostwem, to tylko Holocaust i solidarność z ofiarami antysemityzmu.*

Zatrzymał się z Matką w Kopenhadze, początkowo pracował na Uniwersytecie Kopenhaskim, a w latach 1972–2002 wykładał biologię molekularną i genetykę na Uniwersytecie w Roskilde (Dania). Jak mówili mi znajomi bardzo tęsknił za Polską, wielokrotnie składał prośby o pozwolenie powrotu a przynajmniej odwiedzenia kraju, zawsze spotykał się z odmową. Iskierka nadziei pojawiła się w trakcie kolejnej odwilży w Polsce, po dojściu do władzy Edwarda Gierka. Tak o tym mówił dr Kerszman:

> *Chciałem wrócić dwa lata później, w 1971 roku. Po dojściu Gierka do władzy. Do powrotu namawiał mnie mój przyjaciel Karol Taylor, profesor biologii. Oferował mi zakład genetyki na uniwersytecie w Gdańsku. Byłem zdecydowany. Ale okazało się, że musiałbym w szacie pokutnej prosić władze o zgodę na przywrócenie mi obywatelstwa i prawo przyjazdu do Polski. Ta forma mi nie odpowiadała. Karol odpisał, że doskonale mnie rozumie.*

W spisie publikacji, przedstawionych na witrynie internetowej Uniwersytetu w Roskilde, który widnieje pod nazwiskiem dr Gustawa Kerszmana znalazłem następujące pozycje: *Lecture Notes for Genetic Spring 2008; Manual for Introductory Laboratory Course in Molecular Biology – Bachelormodul in Molecular Biology; Lecture Notes for Biochemistry and Genetics.* Są to głównie podręczniki akademickie, jednakże dr Kerszman prowadził również badania o charakterze podstawowym – pewnie z myślą o wykorzystaniu ich przy opracowywaniu przyszłych biotechnologii. Interesował się efektami działania toksycznego platyny(II) na drobnoustroje oraz układy tkankowe. W toku 1997 wygłosił na tamtejszym Uniwersytecie wykład pt. *Inactivation of T7 phage as an indicator of anticancer of platinum complexes.* Problemy którymi zajmował się są też zestawione na stronie internetowej Uniwersytetu w Roskilde w formie haseł, mogą to więc być tytuły nie opublikowanych artykułów lub tytuły monografii na temat platyny(II). Dla przykładu podaję tylko dwie pozycje z tej listy: *Bufor fosforanowy i stężenie soli w podłożu wpływają na inaktywację faga T4 przez kompleksy platyny(II)* i *Platyna(II) blokuje wejście DNA faga T4 do komórek gospodarza* itp. Należy w tym miejscu nadmienić, iż platyna (II) i platyna (IV) są wykorzystywane obecnie w różnych dziedzinach biotechnologii a szczególnie w medycynie, na przykład: ukierunkowane niszczenie komórek nowotworowych przy leczeniu niektórych rodzajów raka.

Spotkałem dr Kerszmana w trakcie jednego z pierwszych jego przyjazdów do kraju. Na prośbę wspólnych znajomych odebrałem Go na lotnisku Chopina w Warszawie i zawiozłem na spotkanie z prof. Amsterdamskim w pałacu Staszica. Potem kilka razy z okazji świąt, wymienialiśmy się pocztówkami, a potem i to zamarło. Czuję ogromny smutek, gdy myślę że dr Kerszmana już nie ma wśród nas, czuję wielki smutek, gdy myślę o tym jak w mojej ojczyźnie niszczeni byli najlepsi z najlepszych.

Jerzy Hrebenda

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 5–9
http://www.pm.microbiology.pl

REGULACJA BAKTERYJNYCH SYSTEMÓW RESTRYKCYJNO-MODYFIKACYJNYCH (R-M) TYPU II

Martyna Wesserling[1]*

[1]Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Medycyny Molekularnej

Wpłynęło w maju 2014 r.

1. Wstęp. 2. Sposoby regulacji ekspresji genów systemów R-M typu II. 2.1. Kontrola ekspresji genów systemu R-M poprzez metylotransferazę. 2.2. Gen endonukleazy restrykcyjnej położony za genem metylotransferazy. 2.3. Regulacja ekspresji genów poprzez antysensowne RNA. 3. Białka kontrolujące C. 4. Struktura miejsc DNA do których wiąże się białko C (operator). 5. Mechanizm regulacji transkrypcji przez białko C. 6. Podsumowanie

Regulation of bacterial type II restriction-modification (R-M) systems

Abstract: Type II restriction-modification (R-M) systems encode two separate enzymes: a restriction endonuclease (R) and a DNA methyltransferase (M). The action of the DNA sequence-specific methyltransferase protects the host DNA from cleavage by an associated restriction enzyme. The function of type II restriction-modification system regulation is generally assumed to be prevention of bacterial cell auto-restriction. The R and M genes must be regulated in such a way that the cell's own DNA is fully protected before restriction endonuclease activity appears. There a variety of control mechanisms that ensure the correct temporal expression of R-M genes. Unfortunately, the regulation mechanisms have not been well explored thus far. The understanding of the expression regulation of R-M genes is important and may influence the direction of research on new therapeutic methods.

1. Introduction. 2. Regulation of type II R-M gene expression systems. 2.1. Control of R-M gene expression by methyltransferase. 2.2. Restriction endonuclease gene located downstream of the methyltransferase gene. 2.3. Regulation of gene expression by antisense RNA. 3. Controller proteins. 4. The structure of C protein binding sites. 5. The mechanism of transcription regulation by C protein. 6. Summary

Słowa kluczowe: białko C, regulacja ekspresji, systemy restrykcyjno-modyfikacyjne
Key words: C protein, restriction-modification systems, regulation of expression

1. Wstęp

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M) typu II składają się z enzymów, które oddziałują ze specyficznymi sekwencjami DNA. Systemy te obejmują dwie aktywności enzymatyczne: endonukleolityczną i modyfikacyjną (metylującą).

Endonukleazy restrykcyjne klasy II hydrolizują dwuniciowy DNA w obrębie rozpoznawanej przez nie sekwencji lub w jej pobliżu. Sekwencja ta zazwyczaj ma postać palindromu i liczy od 4 do 8 par zasad. Metylotransferazy są kodowane przez odrębne geny systemu R-M, katalizują reakcję kowalencyjnego przyłączania grup metylowych do zasad azotowych nukleotydów. Oba enzymy rozpoznają i modyfikują te same sekwencje DNA. DNA metylowany w takiej sekwencji jest oporny na działanie pokrewnej endonukleazy, co w warunkach *in vivo* chroni genom bakterii przed endogennym enzymem restrykcyjnym. Systemy R-M często porównuje się do systemów toksyna – antytoksyna. W systemach tych toksyną jest endonukleaza restrykcyjna, której wysoki poziom ekspresji zapewnia komórce bakterii ochronę przed wirusami poprzez specyficzne cięcie obcego DNA. Jednakże zbyt duże stężenie tego enzymu prowadzi do uszkodzeń materiału genetycznego bakterii i może skutkować śmiercią gospodarza, jeśli poziom metylotransferazy – antytoksyny, zapewniającej ochronną metylację genomu nie jest wystarczający.

Geny niektórych systemów R-M niesione są na ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy, transpozony. Bardzo często podlegają wymianie pomiędzy gatunkami na drodze horyzontalnego transferu genów [13, 26, 36].

2. Sposoby regulacji ekspresji genów systemów R-M typu II

Analizy porównawcze wykazały różnice w organizacji genów systemów R-M typu II, a także odmienne mechanizmy molekularne, które kontrolują ekspresję genów metylotransferazy i endonukleazy w tych systemach.

2.1. Kontrola ekspresji genów systemu R-M poprzez metylotransferazę

Działanie systemów R-M opiera się na założeniu, że ekspresja genu endonukleazy restrykcyjnej powinna być w pewien sposób zależna od aktywności lub

* Autor korespondencyjny: Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Medycyny Molekularnej, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk; tel. 784 517 548; e-mail: m.wesserling@gumed.edu.pl

stężenia metylotransferazy w komórce gospodarza (*biofeed-back*). Kontrola ekspresji genów systemu R-M poprzez metylazę związana jest z aktywnością enzymu, jak i z jego powinowactwem do sekwencji operatorowych niezwiązanych z miejscami metylacji DNA. Kiedy metylotransferaza zwiąże się z operatorem, stanowi przeszkodę dla polimerazy RNA i uniemożliwia jej przyłączenie się do promotora. W obydwu przypadkach obniżony poziom transkrypcji enzymu modyfikującego prowadzi do wydajnej transkrypcji genu kodującego endonukleazę restrykcyjną [25].

W niektórych poznanych systemach R-M metylaza pełni rolę regulatora transkrypcji swojego genu oraz aktywacji promotora dla endonukleazy. Przykładem może być system R-M CfrBI z *Citrobacter freundi* [5]. Geny tego systemu są ułożone w odwrotnej orientacji wobec siebie (Rys. 1). Kodony startu transkrypcji dla *cfrBIR* i *cfrBIM* oddzielone są odcinkiem o długości 76 p.z. W systemie tym promotor *cfrBIM* jest znacznie silniejszy niż *cfrBIR*. Dzięki temu po przejściu systemu do nowego gospodarza najpierw syntetyzowana jest metylaza. Wzrost stężenia metylazy w komórce obniża poziom transkrypcji *cfrBIM* i jednocześnie wpływa na podwyższenie ekspresji *cfrBIR*. Efekt ten zależny jest od metylacji sekwencji w regionie promotorowym CfrBI [5]. Kontrola transkrypcji zależna jest od kowalencyjnych modyfikacji grup metylowych w specyficznej sekwencji DNA w obrębie silnego promotora *cfrBIM*, wprowadzanych poprzez metylotransferazę, która transkrybowana jest z tego promotora.

Podobne mechanizmy kontrolujące zostały poznane w systemie R-M LlaDII z *Lactococcus lactis*, który posiada geny zorganizowane w tandem, *llaDIIM* i *llaDIIR*, które posiadają swoje własne, odrębne promotory (Rys. 1). Pomiędzy tymi genami znajduje się terminator transkrypcji. Eksperymenty z użyciem plazmidu, w którym gen reporterowy pozostawał pod kontrolą promotora *llaDIIM* pokazały, że aktywność tego promotora była obniżona w przypadku stale produkowanej metylotransferazy [7]. Wydaje się, że metylacja w obrębie miejsca –35 promotora obniża efektywność transkrypcji z promotora *llaDIIM* podobnie jak w przypadku systemu CfrBI.

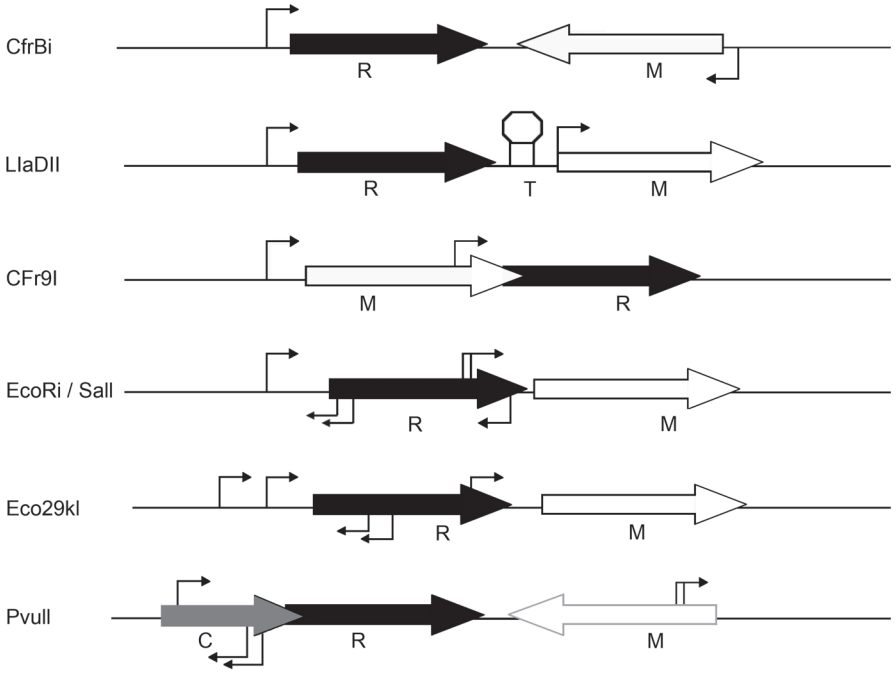
2.2. Gen endonukleazy restrykcyjnej położony za genem metylotransferazy

W systemie R-M Cfr9I geny zorganizowane są w ten sposób, że ostatni kodon dla metylotransferazy nakłada się z kodonem startu dla genu ednonukleazy (ATGA) (*translational coupling*), (Rys. 1). Ponadto sekwencja nukleotydowa komplementarna do przypuszczalnej sekwencji Shine-Delgarno poprzedza *cfr9IR* i leży wewnątrz *cfr9IM*.

Takie ułożenie genów systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego może wpływać na wydajność transkrypcji genu endonukleazy [13, 14].

2.3. Regulacja ekspresji genów poprzez antysensowne RNA

Sposób regulacji ekspresji genów poprzez antysensowne RNA został opisany na przykładzie systemów EcoRI, SalI i Eco29kI.



Rys. 1. Schemat organizacji i regulacji genów systemów R-M
Gen endonukleazy restrykcyjnej (R) oznaczono kolorem czarnym, metylotransferazy (M) oznaczono kolorem białym.

W systemie R-M EcoRI, gdzie gen endonukleazy położony jest powyżej genu metylotransferazy, a oba geny znajdują się w tej samej orientacji, zidentyfikowano promotory na dolnej nici, które wpływają na poziom ekspresji obu genów [21], (Rys. 1). Mechanizm regulacji przez antysensowne RNA jest biologicznie istotny dla bakterii w kontrolowaniu ekspresji genu *ecoRIR*.

Po wniknięciu systemu R-M do nowego gospodarza dominuje transkrypcja z promotora genu metylotransferazy. Akumulacja odpowiedniej ilości M.EcoRI w komórce powoduje rozpoczęcie transkrypcji z odwrotnego promotora i zahamowanie aktywności genu *ecoRIM* [21]. Analogiczny sposób regulacji zaobserwowano w systemie R-M Eco29kI (Rys. 1). Oba geny tworzą jeden operon, w którym *eco29kIR* poprzedza *eco29kIM*. Wykazano, że odrębny promotor znajdujący się w genie dla endonukleazy wystarcza aby syntetyzować tyle enzymu modyfikującego, by całkowicie ochronić DNA gospodarza. Ponadto w systemie tym poziom transkryptu *eco29kIR* ściśle zależy od dwóch antysensownych promotorów leżących w obrębie tego genu [22]. Te antysensowne transkrypty uniemożliwiają inicjację translacji bicistronowego *eco29kIR-eco29kIM* mRNA poprzez jego degradację. Zarówno *eco29kIM*, jak i antysensowne promotory są niezbędne do tego, aby system mógł się stabilnie utrzymać w komórce bakteryjnej [22]. W operonie SalI, gen kodujący enzym odpowiedzialny za restrykcję znajduje się powyżej genu kodującego enzym metylujący (Rys. 1). Oba geny są głównie transkrybowane z promotora zlokalizowanego bezpośrednio powyżej *salIR*.

W operonie tym znajduje się również inny promotor w obrębie 3' końca kodującego *salIR*, co pozwala na ekspresję genu *salIM* w przypadku braku aktywności promotora pierwszego. Drugi promotor może być zaangażowany we wcześniejszą ekspresję genu metylującego, chroniącego DNA przed działaniem endonukleazy restrykcyjnej, po tym jak system R-M zostanie przekazany do nowego gospodarza [2].

3. Białka kontrolujące C

Szczegółowe prace nad analizą sekwencji nukleotydowych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych BamHI oraz PvuII wykazały obecność dodatkowej ramki odczytu genu (ORF), znajdującej się najczęściej tuż przed genem endonukleazy restrykcyjnej, poza genem metylotransferazy [1, 31, 21]. Zaobserwowano, że mutacje w obrębie tej dodatkowej ramki odczytu skutkują brakiem właściwości restrykcyjnych systemu, nawet jeśli gen endonukleazy pozostaje niezmutowany.

Efekt ten zostaje zniesiony w układzie *in trans* przez dodanie do bakterii plazmidu niosącego kopię ORF typu dzikiego. Białka kodowane przez te dodatkowe ramki odczytu zostały nazwane białkami C (*controller*). Regulacja systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych poprzez białko C po raz pierwszy została opisana w systemie PvuII [32]. Zaobserwowano, że gen kodujący białko regulatorowe i gen endonukleazy *pvuIIR* nakładają się na siebie i mają tę samą orientację (Rys. 1). Okazało się, że ekspresja genu endonukleazy zachodzi efektywnie dopiero po nagromadzeniu się odpowiedniej ilości białka C w komórce, które działa jak pozytywny regulator ekspresji, opóźniając jednocześnie pojawienie się aktywności toksycznej endonukleazy. Natomiast drugi enzym metylotransferaza produkowana jest niezależnie od syntezy białka C. Jest to dodatkowy mechanizm, który chroni bakterię przed zbyt wczesnym pojawieniem się aktywności endonukleazy restrykcyjnej [20, 32]. Stwierdzono również, że białka C mają zdolność ograniczenia ekspresji genu metylotransferazy, w przypadku gdy cały DNA komórkowy został zmodyfikowany [17, 33, 34].

Ustalono struktury krystaliczne białek C, C.AdhI [16], C.BcII [26], a także C.Csp231 [30]. Białka te mają formę dimeru, a struktura każdego z monomerów jest analogiczna do domeny wiążącej DNA represora faga λ. Zazwyczaj gen kodujący białko C znajduje się powyżej genu endonukleazy i częściowo się z nim pokrywa [23].

4. Struktura miejsc DNA do których wiąże się białko C (operator)

Geny kodujące białka C znajdują się zazwyczaj przed genem endonukleazy, bądź częściowo pokrywają się z tym genem tworząc jeden operon. W obrębie sekwencji promotorowej można wyodrębnić dwa miejsca wiązania się dla białka C. Kiedy dimer białkowy zwiąże się ze specyficzną sekwencją w obrębie promotora rozpoczyna się transkrypcja, wzrasta wydajność ekspresji genu endonukleazy. Aktywacja zależna od białka kontrolującego C może obejmować oddziaływanie białko-białko między C a podjednostką σ polimerazy RNA, która rozpoznaje sekwencje –35 i –10 promotora.

Na podstawie analizy sekwencji tych białek wykazano obecność wysoce konserwowanego regionu przypominającego strukturę helisa-skręt-helisa (*helix-turn-helix*), charakterystycznego dla licznych białek regulatorowych wiążących DNA.

Duża różnorodność wśród systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych wskazuje na przypuszczalne różnice w budowie sekwencji miejsc DNA wiążących białka C.

Na podstawie badań bioinformatycznych miejsca wiązania się tych białek z DNA wyodrębniono 9 grup [28]. Wszystkie operatory mają podobną długość: 35 par zasad, podobną budowę, na którą składają się trzy pierwsze zasady na zewnątrz danego motywu. Te trzy zasady nukleotydowe są z reguły komplementarne.

Typowe miejsce C (*C-box*) składa się z dwóch kopii takiej samej, palindromowej sekwencji.

Są one oddzielone ściśle konserwowaną, niesymetryczną sekwencją GTG. Na podstawie podobieństwa sekwencji i specyficzności występowania nukleotydów, miejsca wiązania zostały sklasyfikowane w grupy, które nazwano: C.PvuII, C.EcoRV i C.EcoO109I [20, 18, 12]. Miejsca C.PvuII mają strukturę dwóch krótkich palindromów, przedzielonych ściśle konserwowaną cztero-nukleotydową sekwencją. Dwa ramiona palindromowe stanowią miejsce wiązania dla monomerów białka C. W przeciwieństwie do C.PvuII, miejsca wiązania C.EcoRV i C.EcoO109I są pojedynczymi palindromami.

Wyróżnia się również motywy wśród sekwencji nukleotydowych, do których przyłącza się białko C. Typową budowę takiego motywu można przedstawić jako Z-X-N-X*-GTG-x-n-x*-Z*, gdzie X oznacza wewnętrzne palindromy, N wewnętrzne nie palindromowe sekwencje w operatorach, Z wskazuje zewnętrzne trójnukleotydowe obszary, gwiazdki oznaczają miejsca komplementarne. Duże litery oznaczają wysoko konserwowane nukleotydy lub sekwencje wiążące białko C, a małe, te o niższej powtarzalności wśród badanych systemów [28].

5. Mechanizm regulacji transkrypcji przez białko C

Białka C przyłączają się do DNA w postaci dimerów [29], dlatego poznane miejsca wiązania mają strukturę palindromu. W systemie EcoRV wykazano obecność dwóch miejsc wiązania się tych białek w obrębie sekwencji regulatorowej genu kodującego białko C. Region znajdujący się przed miejscem startu transkrypcji ma wyższe powinowactwo do wiązania się dimerów C, co wpływa efektywnie na wzrost stężenia białka w komórce. Natomiast związanie się białka C z obszarem poniżej miejsca startu transkrypcji skutkuje obniżeniem poziomu transkrypcji genu [27, 33]. W systemach R-M, które posiadają gen C często nie obserwuje się własnego promotora dla genu enzymu restrykcyjnego. Otwarte ramki odczytu dla obydwu genów zachodzą na siebie i transkrypcja genu toksycznej dla komórki endonukleazy zależna jest od regulatorowego białka C [36]. Po przejściu systemu R-M do komórki bakteryjnej istotna rola białka C polega więc na opóźnieniu transkrypcji genu endonukleazy po to, aby umożliwić metylotransferazie ochronę DNA nowego gospodarza [19].

Również ekspresja genu metylazy podlega kontroli poprzez białko C. W systemie EcoRV, gdzie geny metylazy i białka C oraz endonukleazy restrykcyjnej położone są w przeciwnej orientacji, związanie się białka C z jedną z sekwencji palindormowych uruchamia transkrypcję genu enzymu endonukleolitycznego, ale hamuje produkcję metylotransferazy, ponieważ istnieje współzawodnictwo pomiędzy związaniem się białka C z typowym miejscem C i aktywacją promotora dla endonukleazy, a pokrywającym się z tym regionem promotorem dla metylazy [27].

W przypadku systemu Esp13961, gen metylotransferazy zlokalizowany jest w znacznej odległości od operonu białka C i endonukleazy [4, 6]. Jednak miejsce promotorowe genu enzymu metylującego zawiera sekwencje wiążące białko C. Wiążąc się do tego miejsca, białko C uniemożliwia polimerazie RNA rozpoczęcie transkrypcji. W ten sposób białko C wpływa na poziom ekspresji genów enzymów. W systemie Kpn2I gen metylazy i białka C są zorganizowane w przeciwnych kierunkach, białko C stymuluje transkrypcję własnego genu i jednocześnie redukuje stężenie enzymu metylującego w komórce [15]. W obu przypadkach kontrola transkrypcji genów umożliwia obniżenie początkowo wysokiego stężenia w komórce metylotransferazy i włączenie aktywności endonukleolitycznej systemu.

6. Podsumowanie

Lokalizacja systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych na ruchomych elementach genetycznych i ich powszechność w komórkach bakteryjnych wskazuje, że odgrywają one ważną rolę w przepływie informacji genetycznej między bakteriami a także w regulacji genów kodujących czynniki wirulencji patogenów [9–11]. Obecność systemów R-M w komórce związana jest również ze stopniem adaptacji bakterii do życia w środowisku. W przypadku gatunków jak *Helicobacter pylori* geny kodujące systemy R-M wpływają na możliwość bytowania bakterii w kwaśnym środowisku żołądka [3]. Wykazano także ważną rolę endonukleazy restrykcyjnej w procesie horyzontalnego przepływu genów wśród metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* [8]. Szczepy z ograniczoną aktywnością tego enzymu były szczególnie podatne na przepływ informacji genetycznej od innych gatunków takich jak *Escherichia coli* i z łatwością nabywały gen oporności na wankomycynę od enterokoków [8].

Regulacja ekspresji genów systemów R-M nie jest jeszcze dobrze poznana, choć pewne elementy kontroli zostały zidentyfikowane i podlegają intensywnym badaniom. Pojawianie się kolejnych szczepów opornych na większość dostępnych antybiotyków stanowi obecnie poważny problem epidemiologiczny na całym świecie. Szczegółowa analiza bakteryjnych systemów R-M zaangażowanych w horyzontalny przepływ genów i poznanie sposobu ich regulacji może wyznaczyć nowe trendy w poszukiwaniu terapii chorób wywoływanych przez szczepy wielooporne.

Praca napisana na podstawie pracy magisterskiej pod kierunkiem dr hab. Iwony Mruk z Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Piśmiennictwo

1. Adams G.M., Blumenthal R.M.: Gene *pvuIIW*: a possible modulator of PvuII endonuclease subunit association. *Gene*, **157**, 193–199 (1999)
2. Alvarez M., Chater K.: Complex transcription o fan operon encoding the SalI restriction-modification system of *Streptomyces albus*. *G. Mol. Microbiol.* **8**, 243–252 (1993)
3. Banerjee A., Rao D.: Functional analysis of an acid adaptive DNA adenine methyltransferase from *Helicobacter pylori* 26695. *PLoS One* **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0016810 (2011)
4. Ball N.J., McGeehan J.E., Streeter S.D., Thresh S.J., Kneale G.G.: The structural basis of differential DNA sequence recognition by restriction-modification controller proteins. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10532–10542 (2012)
5. Beletskaya I., Zakharova M.: Methylation at the CfrBI site is involved in expression control in the CfrBI restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3817–3822 (2000)
6. Cesnaviciene E., Mitkaite G., Stankevicius K.: *Esp*1396I Restriction-Modification System: Structural Organization and Mode of Regulation. *Nucleic Acids. Res.* **31**, 743–749 (2003)
7. Christensen L., Josephsen J.: The methyltransferaze from the LlaDII restriction-modification system influences the level of expression of its own gene. *J. Bacteriol.* **186**, 287–295 (2004)
8. Corvaglia A., Francois P., Hernandez D., Perron K., Linder P., Schrenzel J.: A type-III like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 11954–11958 (2010)
9. Donahue J., Israel D., Torres V., Necheva A., Miller G.: Inactivation of a *Helicobacter pylori* DNA methyltransferase alters dnaK operon expressionfollowing host-cell adherence. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**, 295–301 (2002)
10. Humbert O., Salama N.: The *Helicobacter pylori* HpyAXII restriction-modification system limits exogenous DNA uptake by targeting GTAC sites but shows asymmetric conservation of the DNA methyltransferase and restriction endonuclease components. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6893–6906 (2008)
11. Johnston C., Polard P., Claverys J.P.: The DpnI/DpnII pneumococcal system, defense against foreign attack without compromising genetic exchange. *Mob. Genet. Elements.* **3**, DOI: 10.4161/mge.25582 (2013)
12. Kita K., Tsuda J., Kato T.: Evidence of horizontal transfer of the EcoO109I restriction-modification gene to *Escherichia coli* chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* **18**, 6822–6827 (1999)
13. Lisser S., Margalit H.: Complication of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1507–1516 (1993)
14. Lubys A., Menkevicius S.: Cloning and analysis of translation control for genes encoding the Cfr9I restriction-modification system. *Gene,* **141**, 85–89 (1994)
15. Lubys A., Jurenaite S., Janulaitis A.: Structural organization and regulation of plasmid-borne type II restriction-modification system Kpn2I from *Klebsiella pneumoniae* RFL2. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4228–4234 (1999)
16. McGeehan J.E., Streeter S., Cooper J.B., Mohammed F.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of the controller protein C.AhdI from *Aeromonas hydrophilia*. *Acta Cryst. D.* **60**, 323–325 (2004)
17. McGeehan J.E., Streeter S.D., Thresh J.E.: Structural analysis of Novel Class of R-M controller proteins: C.Csp231I from *Citrobacter* sp. RFL231. *J. Mol. Biol.* **409**, 177–188 (2011)
18. Mruk I., Rajesh P., Blumenthal R.M.: Regulatory circuit based on autogenous activation-repression: roles of C-boxes and spacer sequences in control of the PvuII restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6935–6952 (2007)
19. Mruk I., Blumenthal R.: Real-time kinetics of restriction-modification gene expression after entry into a new host cell. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2581–2593 (2008)
20. Mruk I., Blumenthal R.: Tuning the relative affinities for activating and represing operators of a temporally regulated restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **37**, 983–998 (2009)
21. Mruk I., Liu Y., Kobayashi I.: Antisense RNA associated with biological regulation of restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **13**, 5622–5632 (2011)
22. Nagornykh M., Zakharova M.: Regulation of gene expression in restriction-modification system Eco29kI. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4653–4663 (2011)
23. Nagornykh M., Bogdanova E.: Regulation of gene expression in a type II restriction-modification system. *Russ. J. Genet.* **44**, 523–532 (2008)
24. Rimselienie R., Vaisvila R., Janulatis A.: The *eco72IC* gene specifies a trans-acting factor which influences expression of both DNA methyltransferase and endonuclease from the Eco72I restriction-modification system. *Gene,* **157**, 217–219 (1995)
25. Rocha E.P., Danchin A., Viari A.: Evolutionary role of restriction/modification systems as revealed by comparative genome analysis. *Genome Res.* **11**, 946–958 (2001)
26. Sawaya M.R., Zhu Z., Mersha F., Chan S.H., Dabur R.: Crystal structure of the restriction-modification system control element C.BclI and mapping of its binding site. *Structure*, **13**, 1837–1847 (2005)
27. Semenova E., Minakhin L., Bogdanova E., Nagornykh M.: Transcription regulation of the EcoRV restriction modification system. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6942–6951 (2005)
28. Sorokin V., Severinov K., Gelfland M.: Systematic prediction of control proteins and their DNA bindings sites. *Nucleic Acids Res.* **34**, 441–451 (2009)
29. Streeter S.D., Papapanagiotou I., McGeehan J.E., Kneale G.G.: DNA footprinting and biophysical characterization of the controller protein C.AhdI suggests the basis of a genetic switch. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6445–6453 (2004)
30. Streeter S., McGeehan J., Kneale G.: Overexpression, purification and premiliniary X-ray diffraction analysis of the controller protein C.Csp231I from *Citrobacter* sp. RFL231. *Acta Cryst.* **65**, 898–901 (2009)
31. Tao T., Bourne J., Blumenthal R.: A family of regulatory genes associated with type II restriction-modification systems. *J. Bacteriol.* **173**, 1367–1375 (1991)
32. Tao T., Blumenthal R.: Sequence and characterization of *pvuIIR*, the PvuII endonuclease gene, and of *pvuIIC*, its regulatory gene. *J. Bacteriol.* **10**, 3395–3398 (1992)
33. Williams K., Savageau M., Blumenthal R.: A bistable hysteretic switch in an activator-repressor regulated restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6045–6057 (2013)
34. Wilson G.G., Murray N.E.: Restriction-modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 585–627 (1991)
35. Vasu K., Nagamalleswari E., Nagaraja V.: Promiscuous restriction is a cellular defense strategy that confers fitness advantage to bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1287–1293 (2012)
36. Vijesurier R.M., Carlock L., Blumenthal R.: Role and mechanism of action of C. PvuII, a regulatory protein conserved among restriction-modification systems. *J. Bacteriol.* **182**, 477–487 (2000)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 10–19
http://www.pm.microbiology.pl

SUKCESOR WIRUSA POLIO – ENTEROWIRUS 71

Arleta Krzysztoszek[1], Magdalena Wieczorek[1]*

[1]Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Budowa i klasyfikacja. 3. Receptory komórkowe i replikacja. 4. Przebieg zakażenia. 5. EV71 na świecie. 6. Genotypy EV71 i zmienność wirusa. 7. Patogeneza. 8. Prace nad szczepionką. 9. Zakończenie

Successor of polio virus – enterovirus 71

Abstract: Enterovirus 71 (EV71) is one of the most important causes of hand, foot, and mouth disease. It can also cause severe complications of the central nervous system. Brain stem encephalitis with pulmonary edema is a severe complication that can lead to death. EV71 was first isolated in California in 1969. Since the late 1990s, EV71 has seriously affected the Asia-Pacific region. In recent years, there have been an increasing number of reports of HFMD outbreaks with fatal cases due to EV71 in Asian countries. Generally, EV-71 is divided into three broad genotypes: A, B and C, based on analysis of complete genome sequences of many strains. Recent studies suggest that recombination has played a crucial role in EV71 evolution. Poliovirus, another enterovirus, is nearly completely eradicated as a result of global immunization efforts. EV71 may become an important pathogen, replacing poliovirus, with increasing health threat to humans. Prevention of EV71 epidemics is likely to require the development of an effective vaccine. This is an important public health problem causing serious clinical illness and, potentially, death in young children.

1. Introduction. 2. Structure and classification. 3. Cellular receptors and replication. 4. Course of infection. 5. EV71 in the world. 6. EV71 genotypes and variability of the virus. 7. Pathogenesis. 8. Vaccine development. 9. Summary

Słowa kluczowe: enterowirus 71, choroba dłoni, stóp i ust, genotypy
Key words: enterovirus 71; hand, foot and mouth disease; genotypes

1. Wstęp

Wirus polio towarzyszy człowiekowi już od czasów starożytnych, o czym może świadczyć staroegipska stela, czyli pomnik nagrobny, przedstawiający mężczyznę ze stopą zniekształconą charakterystycznie dla postaci porażennej *poliomyelitis*. Przez tysiące lat była to choroba rzadka, większość przypadków zachorowań dotyczyła dzieci do 4 roku życia. Pierwsze małe lokalne epidemie miały miejsce około 1900 roku w Stanach Zjednoczonych Ameryki (USA) i w Europie. W pierwszej połowie XX wieku wybuchła już wielka pandemia *poliomyelitis*, chorowały głównie dzieci w wieku od 5 do 9 lat, jedna trzecia przypadków dotyczyła osób powyżej 15 roku życia, co spowodowało, że trwałych porażeń po zachorowaniu było dużo więcej niż gdy chorowały małe dzieci i niemowlęta. W 1952 w USA zachorowało 58 000 osób, z czego ponad 3 000 zmarło, a 20 000 doznało trwałych porażeń [79]. Obecnie program eradykacji *poliomyelitis* zmierza ku końcowi, w 2013 roku na całym świecie wystąpiło 416 przypadków zachorowań wywołanych dzikim poliowirusem. Ostatni odnotowany przypadek zachorowania wywołanego dzikim polio typu 2 miał miejsce w Indiach w 1999, wydaje się że dziki wirus polio typu 3 także został wyeradykowany, ostatni opisany przypadek miał miejsce w Nigerii w 2012 roku [67].

W latach 70 w Europie pojawiły się dwie duże epidemie, które początkowo przypisywano wirusowi polio, ze względu na duże podobieństwo obrazu klinicznego choroby. Jednak okazało się, że czynnikiem etiologicznym licznych zachorowań był po raz pierwszy wyizolowany w 1969 roku w USA enterowirus 71 (EV71). Od lat 90, w regionie Azji i Pacyfiku mają miejsce liczne epidemie z udziałem EV71. W 2009 roku w Chinach zachorowało 1,2 miliona osób, odnotowano 353 przypadki śmiertelne, była to, jak dotąd największa z odnotowanych epidemii [3]. Trzy lata później (2012) w Kambodży media informowały o „tajemniczej chorobie", na którą dzieci umierają tuż po przyjęciu do szpitala. Dokładne badania laboratoryjne wykazały obecność EV71 [71]. Historia EV71 jest bardzo podobna do historii wirusa polio. Czy enterowirus 71 ma szansę zostać „najgroźniejszym" enterowirusem w sukcesji po „odchodzącym" poliowirusie?

2. Budowa i klasyfikacja

Enterowirus 71 (EV71), podobnie jak inne wirusy z rodziny *Picornaviridae,* to mały, bezosłonkowy wirus, o ikosahedralnym kształcie kapsydu, którego materiałem genetycznym jest jednoniciowe RNA o dodatniej polarności (+ ssRNA). EV71 zaliczany jest do

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel.: 22 54 21 230; e-mail: mrechnio@pzh.gov.pl

gatunku A enterowirusów (EV-A), razem z wirusami Coxsackie A (CV-A2-8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16) oraz z innymi enterowirusami (EV68, EV89, EV90, EV91, EV92). Jest on najbliżej spokrewniony z wirusem Coxsackie A16 (CV-A16) [68], homologia pomiędzy tymi dwoma typami na poziomie genomu wynosi 77%, natomiast na poziomie sekwencji aminokwasowej 89%. Przypuszcza się że EV71 wyewoluował z CV-A16 około roku 1940 [76].

Monocistronowy genom EV71 zbudowany jest z 7,4 tysięcy nukleotydów. Na obu końcach nici znajdują się regiony niekodujące (UTR) stanowiące aż 10% genomu wirusa. Koniec 5' nici RNA związany jest kowalencyjnie z białkiem VPg, uczestniczącym w procesie inicjacji replikacji, natomiast niekodujący region 3', także odpowiadający za inicjację replikacji, zakończony jest sekwencją poli(A) [65]. Pojedyncza otwarta ramka odczytu koduje 11 białek: 4 białka strukturalne (region P1) i 7 białek niestrukturalnych (regiony P2 i P3). W wyniku translacji powstaje pojedyncza poliproteina o masie 250 kDa podlegająca obróbce proteolitycznej. W wyniku proteolitycznego cięcia poliproteiny powstają trzy prekursorowe peptydy: P1, P2 i P3. Peptyd P1 jest cięty na trzy białka: VP0, VP1 i VP3, które łączą się ze sobą tworząc protomer, pięć protomerów formuje pentamer, a 12 pentamerów buduje prokapsyd. Dopiero w trakcie dojrzewania kapsydu białko VP0 ulega cięciu na VP2 i VP4. VP1, VP2 i VP3 są białkami powierzchniowymi kapsydu, natomiast białko VP4 jest białkiem wewnętrznym. Białka kapsydu odpowiadają za wiązanie receptora na powierzchni wrażliwych komórek. Peptydy P2 i P3 cięte są na 7 białek pełniących funkcje niestrukturalne; jest wśród nich RNA zależna polimeraza RNA 3Dpol [6, 37].

Ikosahedralny kapsyd jest pozbawiony osłonki, co wpływa na stabilność wirusa w środowisku gospodarza, cząstki wirusa są oporne na kwasy żołądkowe i bez trudu przedostają się do jelita. EV71 jest oporny także na rozpuszczalniki organiczne (70% etanol, eter, chloroform), wirusa można inaktywować promieniowaniem ultrafioletowym oraz stosując środki dezynfekujące zawierające formaldehyd i chlor. Temperatura powyżej 56°C inaktywuje cząstki EV71, natomiast w temperaturze pokojowej wirus może przetrwać i zachować zakaźność nawet kilka dni [16, 74]. Wirus ten znajdowany był w wodach powierzchniowych i podziemnych, w ściekach, a także w gorących źródłach [21, 34].

3. Receptory komórkowe i replikacja

Gospodarzem dla enterowirusa 71 jest człowiek. Wirus wnika do komórki gospodarza poprzez połączenie się z receptorem znajdującym się na powierzchni komórki wrażliwej. Jak dotąd odkryto siedem receptorów komórkowych wykorzystywanych przez enterowirusy: 3 integryny, receptor dla wirusa polio (CD155), czynnik DAF (CD55), ICAM-1 (CD54) i receptor dla coxsackie i adenowirusów (CAR) [63, 65]. Natomiast enterowirus 71 wykorzystuje jeszcze cztery inne receptory. W 2009 roku opisano dwa receptory dla EV71: błonowe białko występujące na leukocytach ludzkich – glikoproteinowy ligand 1 P-selektyny (PSGL-1; CD162) [57] oraz biało transmembranowe zlokalizowane na lizosomach i endosomach – SCARB2 [94]. SCARB2 jest wszechobecny w organizmie człowieka, wykorzystywanie tego białka jako receptora przez EV71 może być powodem rozwoju ogólnoustrojowych zakażenia. Z receptorem SCARB wiążą się wszystkie genotypy EV71 oraz CV-A16. EV71 może łączyć się także z występującym w przewodzie pokarmowym i oddechowym glikanem powiązanym z kwasem sialowym [93] oraz z receptorem DC-SIGN (CD209) [49] obecnym na komórkach dendrytycznych i makrofagach, odgrywającym także istotną rolę w rozwoju zakażenia wywołanego wirusem HIV.

Przyłączenie cząstki wirusowej do receptora prowadzi zarówno do zmian strukturalnych kapsydu jak i błony komórkowej, co skutkuje uwolnieniem materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy [90]. W komórce gospodarza wirusowe RNA podlega translacji, powstają białka wirusowe, materiał genetyczny podlega powieleniu, powstają cząstki potomne, ostatecznie dochodzi do lizy komórki i uwolnienia cząstek potomnych [72, 75, 78, 91].

4. Przebieg zakażenia

Wirus szerzy się głównie na drodze fekalno-oralnej, w mniejszym stopniu również drogą kropelkową [14, 77]. Wrotami zakażenia jest jama ustna, po wniknięciu do organizmu wirus replikuje w migdałkach i jelicie cienkim, następnie przenika do okolicznych węzłów chłonnych. Na tym etapie zakażenia choroba ma charakter bezobjawowy co ma miejsce u 70% przypadków osób zakażonych. U części osób zakażonych dochodzi jednak do zajęcia przez wirusa wątroby, śledziony, szpiku kostnego i kolejnych węzłów chłonnych. Wirus może przedostać się także do serca, płuc, trzustki, błon śluzowych, skóry i do układu nerwowego.

Główne objawy zakażenia enterowirusem 71 to: gorączka, pęcherze w jamie ustnej, obniżona świadomość, nerwowość, wymioty, kaszel i przeziębienie [82]. Najłagodniejsze w przebiegu są postacie dermatologiczne zakażenia: herpangina i choroba dłoni, stóp i ust (HFMD), o wiele ostrzejsze w przebiegu są choroby układu nerwowego: zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, czy ostre porażenie wiotkie (AFP) [51, 85]. W przebiegu zakażenia EV71 zdarzają

się także: zapalenie móżdżku, zapalenie pnia mózgu, encefalopatia miokloniczna Kinsobourne'a, Zespół Guillaina-Barrégo i poprzeczne zapalenie rdzenia kręgowego [82]. Wirus do ośrodkowego układu nerwowego przedostaje się za pomocą wstecznego transportu aksonalnego, nerwem czaszkowym lub peryferyjnym. Niewykluczone jest także, że wirus przekracza barierę krew–mózg [22]. Zmiany powstałe w ośrodkowym układzie nerwowym pod wpływem zakażenia EV71 dotyczą głównie istoty szarej rdzenia kręgowego i rdzenia przedłużonego, spotyka się je także w podwzgórzu, móżdżku i korze ruchowej, przypominają one obrzęk, neuronofagię i guzki mikrogleju występujące także w zapaleniu mózgu powodowanym zakażeniami innymi wirusami [74].

Jednak najczęściej występujące zakażenia ośrodkowego układu nerwowego wywołane EV71 to zapalenie mózgu i ostre porażenie wiotkie. Najczęściej obserwowanymi objawami towarzyszącymi zapaleniu mózgu są mioklonie czyli gwałtowne i nagłe skurcze poszczególnych grup mięśniowych, wymioty i ataksja [61]. U niektórych pacjentów z zapaleniem mózgu dochodzi do obrzęku płuc, zapaści sercowo-płucnej i krwotoku. Po epidemii na Tajwanie 1998 roku opisano trzy stadia kliniczne choroby: 1) nieskomplikowane zapalenie mózgu kończące się w 100% wyzdrowieniem; 2) rozregulowanie autonomicznego układu nerwowego kończące się w 100% wyzdrowieniem; 3) neurogenny obrzęk płuc o śmiertelności 80% [16, 46].

Po ustąpieniu ostrych objawów zakażenia wirus cały czas namnaża się w organizmie gospodarza. Wirus izolowany jest z gardła jeszcze 4 tygodnie po wystąpieniu pierwszych objawów, a z kału do 11 tygodni [14, 30, 61]. Tak długi okres wydzielania warunkuje szeroką transmisję wirusa, największy współczynnik transmisji (52%) wystąpił pomiędzy dziećmi do lat 6, rodzeństwem lub kuzynostwem. Dzieci są w większym stopniu zdolne do przekazywania wirusa niż dorośli [91].

5. EV71 na świecie

Po raz pierwszy obraz choroby po zakażeniu wirusem EV71 opisał Schmidt i współracownicy w 1974 roku. Opisali 20 przypadków zakażeń centralnego układu nerwowego, w tym jeden przypadek śmiertelny, które miały miejsce w Stanach Zjednoczonych w latach 1969–1972 [70]. EV71 po raz pierwszy został wyizolowany w 1969 roku w USA, w Kalifornii, z kału 9 miesięcznego dziecka chorego na zapalenie mózgu. W latach 1969–1977 opisano dwie małe epidemie wywołane przez EV71 w Kalifornii (23 przypadki) [54] i Nowym Jorku (28 przypadków) [27], chorzy rozwinęli głównie objawy neurologiczne [31, 41, 51]. W tym samym czasie na świecie miały miejsce epidemie o szerokim spektrum chorób od HFMD poprzez zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, porażenia, silne zakażenia układu oddechowego i zapalenia mięśnia sercowego. Epidemie te miały miejsce w: Australii (1972–1973 i 1986) [28, 40]; Szwecji (1973); Japonii (1973 i 1978) [29, 38]; Bułgarii (1975) [26]; na Węgrzech (1978) [56]; we Francji (1979), w Hong Kongu (1985) i w Filadelfii, w USA (1987) [9, 31, 51]. Epidemie opisane od 1974 do połowy lat 90 miały charakter od łagodnych po ciężkie. W Japonii w 1973 i 1978 roku zachorowało odpowiednio 3 296 i 36 301 osób [3]. Większość pacjentów rozwinęła typową chorobę dłoni, stóp i ust, podobnie jak w Australii w 1986 roku. W czasie epidemii w Bułgarii w 1975 roku, zachorowało 705 osób, większość z nich (77%) rozwinęło zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, około 21% miało ostre porażenia wiotkie, odnotowano 44 przypadki śmiertelne [51, 74]. Na Węgrzech w 1978 roku, zachorowało 323 osoby, większości zachorowań towarzyszyły objawy neurologiczne w postaci zapalenia mózgu, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i ostrych porażeń wiotkich, obserwowano także pojedyncze przypadki HFMD, zmarło 47 osób [56].

W drugiej połowie lat 90 wystąpiły dwie duże epidemie związane z zakażeniami EV71. Pierwsza miała miejsce w Malezji, w Sarawak, w 1997 roku, a druga na Tajwanie w 1998 roku. W Malezji zachorowało 2 628 osób, w większości były to przypadki HFMD i herpanginy. W 30% przypadków dochodziło do zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (zomr; AFP; zapalenie mózgu i pnia mózgu; zapalenie rdzenia oraz ataksje). U około połowy osób z objawami neurologicznymi (52%) miały miejsce także objawy skórne w postaci HFMD. Po raz pierwszy obserwowano także przypadki ostrego zapalenia mózgu z obrzękiem płuc i krwotokiem, szybko kończące się śmiercią. W czasie tej epidemii zmarło 40 osób [1, 10, 12]. Epidemia na Tajwanie była spowodowana koinfekcją EV71 i CV-A16. Zachorowało 129 106 osób, większość osób rozwinęła objawy skórne: HFMD i herpanginę (79%); zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (zomr, zapalenie mózgu i pnia, AFP) dotyczyło tylko 35% przypadków. Wśród zakażeń ośrodkowego układu nerwowego 41% przypadków stanowiły nieskomplikowane zapalenia mózgu, w 44% zapaleniu mózgu towarzyszyło rozregulowanie układu autonomicznego, a u 15% przypadków dochodziło do obrzęku płuc. Ciężkim zakażeniom towarzyszyły krwotoki i zapalenie mięśnia sercowego. Śmiertelność w przypadkach z obrzękiem płuc wynosiła 90%, podczas gdy w przypadkach z objawami tylko ze strony układu nerwowego wynosiła 20%. Zarejestrowano 78 przypadków śmiertelnych [23, 32, 48].

XXI wiek przyniósł liczne i duże epidemie HFMD w regionie Azji i Pacyfiku. W Australii, w 2000–2001, do szpitali trafiło około 200 dzieci, w tym 9 miało

objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego, a 5 osób rozwinęło obrzęk płuc [3, 53]. W 2013 roku zanotowano 30 przypadków zakażeń EV71 z objawami neurologicznymi.

W Brunei, w 2006 roku, zachorowało 1 681 dzieci, u większości z nich zdiagnozowano HFMD lub herpanginę, trójka z nich zmarła w wyniku ciężkich chorób neurologicznych [2].

W Chinach, w 2007 roku, epidemia HFMD wybuchła w prowincji Shandong [3], odnotowano 1 149 zachorowań, głównie wśród dzieci poniżej 5 roku życia (84,4%). 11 przypadków HFMD (0,9%) została zakwalifikowana jako ciężkie, z towarzyszącymi komplikacjami ze strony układu nerwowego. W czasie epidemii zmarło troje dzieci (0,3%; wiek ≤ 3). W następnym roku (2008) zarejestrowano 61 459 przypadków HFMD, prawie we wszystkich prowincjach chińskich. Głównie chorowały dzieci poniżej 5 roku życia (92%), zmarło 36 dzieci [100]. W 2009 roku liczba zanotowanych przypadków HFMD na terenie Chin sięgnęła 1 155 525, ciężkie przypadki stanowiły 1,2% (13 810), odnotowano 353 zgonów (0,03%). Większość zachorowań dotyczyła dzieci w wieku poniżej 6 lat (93%); dzieci poniżej 4 lat stanowiły 75% wszystkich przypadków. Chorowało 2 razy więcej chłopców niż dziewczynek (1,8: 1) [3].

Po dużej epidemii na Tajwanie w 1998, w następnych latach miały miejsce mniejsze epidemie w 2000 i 2001 roku, odnotowano 291 i 389 ciężkich przypadków oraz odpowiednio 41 i 55 przypadków śmiertelnych [48]. Pomiędzy rokiem 1998 i 2005, liczba ciężkich przypadków HFMD występujących w ciągu roku wzrosła z 35 do 405 [23]. W tym 8-letnim okresie zanotowano 1 548 zachorowań o ciężkim przebiegu, w tym 93% dotyczyło dzieci poniżej 5 lat, a 75% dotyczyło dzieci poniżej 3 roku życia, w sumie zmarło 245 osób. Po 2005 roku liczba ciężkich przypadków i zgonów wyglądała następująco: w 2006 roku 11 i 0; 2007: 12 i 2; 2008 – 373 i 14; 2009 29 i 2 [3].

Od 1999 do 2005 w Japonii średnio raportowano 42,7 przypadku HFMD na rok. Dwie epidemie miały miejsce w 2000 i 2003 roku, zachorowało 205 365 i 172 659 osób. Około 90% pacjentów z HFMD była w wieku poniżej 6 lat [3].

W Malezji, od 2000 roku, miały miejsce 4 epidemie: w 2000 (konfekcja EV71 z E7), 2003, 2006, 2008 i 2009 [14, 25, 59, 66].

W Mongolii zgłaszanie przypadków HFMD rozpoczęto w 2008 roku, w danym roku zarejestrowano 3 210 przypadków [3].

Zakażenia EV71 z rozwinięciem HFMD miały miejsce także w Korei (2008–2009; 719 przypadków) [42], w Indiach w 2007 [69] i na Tajlandii (2006, 2008–2009) [3, 20].

W Singapurze, w 2000 roku, miała miejsce duża epidemia HFMD, zachorowało 3 790 osób, odnotowano 3 przypadki śmiertelne. Kolejne epidemie miały miejsce w latach: 2001 (5 187 przypadków); 2006 (15 282) i 2008 (15 030) [3, 4].

W Wietnamie, w 2003 roku odnotowano liczne ostre zapalenia mózgu połączone z HFMD. W 2005 roku u 764 dzieci zdiagnozowano HFMD [80]. Kolejne epidemie zanotowano w latach 2007–2009 (2007 – 5 717 (†23); 2008 – 10 958 (†25); 2009 – 10 632 (†23)) [3]. W 2011, odnotowano 77 895 przypadków HFMD, zmarło ponad 137 osób.

Poza dużymi epidemiami w rejonie Azji i Pacyfiku zachorowania w wyniku zakażenia EV71 odnotowywano na całym świecie: w USA [64], Holandii [83], Norwegii [3], Austrii [62], Wielkiej Brytanii [7], Niemczech [3], Finlandii [33] i Francji [39].

6. Genotypy EV71 i zmienność wirusa

Na podstawie analizy dwóch genów kodujących białka strukturalne VP-1 i VP-4, opisano trzy genotypy EV71: A, B, C. Genotypy B i C podzielono na subgenotypy: C1-C5; B1-B5 [11, 84]. Na podstawie analizy sekwencji VP-1 i 3D polimerazy RNA zaproponowano utworzenie nowego genotypu D z genotypu C4 oraz włączenie subgenotypu B5 do B4 [14]. Inna grupa naukowców zaproponowała także utworzenie subgenotypu B0 dla szczepu, który krążył w Holandii w latach 1963–1967, oraz C0 dla szczepu, który krążył w Japonii w 1978 roku [15, 83]. Prototypowy szczep BrCr EV-71 zidentyfikowany w Kalifornii w 1969 należał do genotypu A, genotyp ten nie był opisywany do 2008 roku, kiedy to pojawił się w czasie epidemii w Chinach (Tabela I). Genotyp A wydaje się być stabilnym genetycznie, ponieważ izolaty z 1969 i 2008 roku niewiele się różnią sekwencją nukleotydową [96].

Subgenogrupy od B1 do B5 oraz C1, C2 i C4 są kosmopolityczne i występują na całym świecie [55], natomiast występowanie subgenogrup C3 i C5 ogranicza się do Korei, Wietnamu, Tajlandii i Tajwanu [15]. Współkrążenie kilku subgenogrup jest obserwowane w wielu krajach np.: w Malezji, w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, na Tajwanie, w Japonii [8]. Subgenogrupy B1 i B2, powodujące głównie epidemie HFMD w latach 70 i 80 [51], zostały zastąpione przez nowe subgenogrupy (B3, B4, i B5), które stały się grupami dominującymi i występują endemicznie w rejonie Azji i Pacyfiku, powodując duże epidemie HFMD [52], także te z licznymi przypadkami śmiertelnymi w Malezji i Tajwanie [24, 36, 43].

Subgenogrupa C1, która po raz pierwszy została opisana w Australii i USA w latach 80, od jej pierwszego opisania jest stale wykrywana w różnych krajach. W latach 90 genogrupa C uległa dużemu zróżnicowaniu, pojawiły się nowe subgenogrupy w rejonie Azji

Tabela I
Występowanie genotypów EV71 na świecie [8, 10, 37, 45, 74]

	1960–1969	1970–1979	1980–1989	1990–1999	2000–2009	2010–
Brunei					B5	
Chiny				C4	A, C4	C4
Japonia		B1, C0	B1, B2, C1	B2, B3, B4, C2	B4, B5, C2, C4	
Korea					C3, C4	
Malezja				B3, B4, C1, C2	B4, B5, C1	
Singapur				B3, B4, C1	B4, B5, C1	
Tajlandia					B5, C1, C2, C4, C5	
Tajwan			B1	B4, C2, C4	B4, B5, C4, C5	C4
Wietnam					C1, C4, C5	C4
Australia			B2, C1	B3, C1, C2	B3, B4, C1, C4	
Nowa Zelandia				C1, C2	C2	
Austria					C1, C4	
Bułgaria		B1				
Holandia	B0	B1, B2	B2, C1	C1, C2	C1, C2	
Norwegia					C1	
Węgry		B1			C4	
Wielka Brytania			C1	C1, C2	C1, C2	
USA	A	B1	B2, C1	C1, C2	C2	

i Pacyfiku, m.in. C2, C4, i C5 związane z śmiertelnymi przypadkami HFMD na Tajwanie (1998), w Chinach (2008) i w Wietnamie (2005) [84].

W czasie syntezy pojedynczej kopii genomu EV71 RNA zależna polimeraza RNA wstawia 1–2 błędne zasady. Brak mechanizmów naprawczych skutkuje dużym tempem mutacji podobnym to tego jaki występuje u poliowirusów. Tempo mutacji EV71 szacuje się na $1{,}35 \times 10^{-2}$ substytucji na nukleotyd/rok [9]. Tempo mutacji w regionie kodującym powierzchniowe białko VP1 jest jeszcze większe i wynosi $4{,}5 \times 10^{-3}$ [76], wynika to z wysokiej presji selekcyjnej układu immunologicznego gospodarza. Genom EV71 podlega ciągłym zmianom, o wysokiej zmienności genetycznej świadczą liczne genotypy wirusa. Źródłem zmienności są liczne mutacje, wpływ układu immunologicznego gospodarza, ale także częste rekombinacje [65, 73]. Rekombinacja przyczynia się do wytworzenia nowych wariantów wirusa i zwiększenia zmienności genetycznej, prowadzi do zwiększenia tempa ewolucji i możliwości napraw uszkodzeń RNA. Jest to najszybsza droga do nabywania zmian genetycznych warunkujących zmiany w wirulencji wirusa. Do rekombinacji dochodzi gdy komórkę gospodarza zakażą jednocześnie 2 typy wirusów [37]. W czasie replikacji może dojść do częściowej wymiany materiału genetycznego, w wyniku zmiany matrycy. Może dojść do rekombinacji pomiędzy różnymi genotypami EV71 (rekombinacja intratypowa) oraz pomiędzy EV71 i innymi wirusami z grupy A enterowirusów (rekombinacja intertypowa) [36, 95, 98]. Większość genotypów krążących w rejonie Azji po 1997 roku to rekombinanty [13]. Zaobserwowano, że genotypy starsze, od dawna krążące w populacji, wywołują lżejsze w przebiegu choroby niż nowopowstałe genotypy często wywołujące duże epidemie [84]. Wybuch epidemii jest poprzedzony zmianą genotypu dominującego [11, 74, 80], który pojawia się w puli krążących genotypów od 2 do 5 lat przed staniem się genotypem dominującym. Obserwacja ta potwierdza wyniki uzyskane metodą zegara molekularnego, które szacują czas od pojawienia się nowego genotypu do spowodowania przez niego epidemii na 2–5 lat dla genotypu B i 1–5 lat dla genotypu C [11, 37, 51, 76]. Znany jest przypadek zmiany dominującego genotypu w ciągu kilku miesięcy (Japonia B5) [8].

7. Patogeneza

Największym czynnikiem ryzyka rozwoju ciężkiej postaci choroby po zakażeniu EV71 jest wiek. Wraz z wiekiem liczba osób posiadające odporność przeciw EV71 jest coraz większa. Szacuje się, że 50% populacji po 5 roku życia posiada przeciwciała anty-EV71. U małych dzieci do 6 miesiąca życia dużą rolę w odporności na zakażenie odgrywają przeciwciała matczyne [18, 31]. Najbardziej narażone na zakażenia o ostrym przebiegu, często kończącym się zgonem, są dzieci w wieku od 6 miesiąca do 4 roku życia. W czasie epidemii w 1998 roku na Tajwanie dzieci do lat 5 stanowiły 89% osób chorujących [85].

Brak podatność gospodarza na rozwój ciężkiej postaci zakażenia związana jest ze wcześniej nabytą odpornością krzyżową, co tłumaczy młody wiek jako

czynnik ryzyka rozwinięcia ciężkiego stadium choroby. Odporność krzyżowa nabywana jest po wcześniejszym zetknięciu się z innym genotypem tego samego gatunku wirusa lub wirusem blisko spokrewnionym. Badania potwierdziły odporność krzyżową pomiędzy genotypami B i C [74, 91].

Badania genetyczne przeprowadzone na Tajwanie wykazały, że obecność antygenu zgodności tkankowej HLA-A33 jest związana ze zwiększoną wrażliwością na zakażenia E71. W populacji azjatyckiej występowanie HLA-A33 jest częstsze niż wśród rasy białej, czym tłumaczy się liczne epidemie EV71 w rejonie Azji. Sugeruje się także rolę HLA-A2 w rozwoju niewydolności krążeniowej w pacjentów zakażonych EV71 [17].

Kolejny czynnikiem mogącym mieć wpływ na przebieg zakażenia EV71 jest występowanie współzakażeń. W Malezji podczas epidemii w latach 1997, 2000 i 2003, z materiałów pobranych od pacjentów, oprócz EV71, izolowano także adenowirusy [10, 58]. Epidemie na Tajwanie z 1998 roku i w Australii z 1999 roku były wywołane współzakażeniem EV-71 z CV-A16 (wirus Coxsackie A 16). W czasie epidemii w Kambodży w 2012 roku, jako główną przyczynę śmierci dzieci podano zakażenie mieszane EV71, wirusem dengi i *Streptococcus suis* oraz błędne leczenie (użycie steroidów) [71]. Prawdopodobnie obecność dodatkowego wirusa sprzyja replikacji EV71, lecz nie zawsze obecność dodatkowego czynnika wpływała na nasilenie objawów klinicznych [10, 31, 58].

Obecnie w Azji główną przyczyną śmierci po zakażeniu EV71 jest zapalenie mózgu powiązane z dysfunkcją sercowo-płucną [92], jeszcze w latach 80 główną przyczyną było zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Przyczyny obrzęku płuc, występującego w najcięższych przypadkach, nie są znane. Do jego wystąpienia może się przyczynić: zwiększona przepuszczalność naczyń, zaburzenie czynności serca, także obecność cytokin prozapalnych. Obrzękowi płuc przypisuje się pochodzenie neurogenne, gdyż jest poprzedzony zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego. Badania pośmiertne pacjentów, u których wystąpił obrzęk płuc, wykazały zmiany w ośrodkach oddechowych i wazomotorycznych pnia mózgu. Wcześniejsze badania wykazały, że zmiany patologiczne w OUN mogą powodować wzrost ciśnienia (w tym płucnego) i wystąpienie obrzęku płuc [63, 74, 88]. Bardzo podobny obraz choroby z obrzękiem płuc po zajęciu przez wirusa ośrodków rdzenie przedłużonego miał miejsce w przypadkach postaci opuszkowej *poliomyelitis*. Obrzękowi płuc towarzyszą zaburzenia pracy serca, nie obserwuje się zmian zapalnych, jedynie zmiany patologiczne podobne do tych, które powstają pod wpływem katecholamin. Przypuszcza się, że zapalenie mózgu powoduje wzrost poziomu katecholamin, które mają bezpośredni wpływ na wywoływanie zmian patologicznych serca oraz indukują obrzęk płuc poprzez wzrost ciśnienia [88]. Dodatkowo cytokiny i chemokiny, których stężenie wzrasta po zakażeniu EV71, przyczyniają się do wzrostu przepuszczalności naczyń [47, 89]. Obserwacje kliniczne wykazały, że przy dającym podobne zmiany w pniu mózgu japońskim zapaleniu mózgu nie dochodzi do obrzęku płuc, chociaż może wystąpić zespół poliopodobny.

Zakażenia objawowe EV71 po epidemii na Tajwanie w 1998 roku zostały podzielone na cztery stadia [16, 46], dla każdego stadium choroby opracowano odpowiednie leczenie. Do stadium 1 zalicza się objawy dermatologiczne czyli HFMD (80%) i herpanginę (10%) oraz zapalenie gardła, niespecyficzne choroby gorączkowe (>39°C), wysypkę i nieżyt żołądkowo-jelitowy. Poza EV71, HFMD mogą powodować inne enterowirusy; CV-A4-6, CV-A9-10, CV-A16, CV-B2 i CV-B5, ale tylko EV71 wywołuje ostrą postać tej choroby z licznymi powikłaniami [45]. HFMD może przebiegać z owrzodzeniem języka i policzków, z wysypką rumieniowatą na dłoniach, kolanach, stopach i pośladkach, ale także zmiany mogą być niepozorne i zostać przeoczone przez lekarza. Herpangina ma postać owrzodzenia łuku podniebienia, śluzówki policzkowej i języczka [61]. Pacjenci z objawami stadium 1 nie wymagają hospitalizacji oraz leczenia.

Stadium 2 zakażenia EV71 dotyczy objawów ze strony układu nerwowego. Od 1 do 5 dni po wystąpieniu objawów dermatologicznych może pojawić się: zapalenie mózgu, jałowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu i rdzenia oraz ostre porażenie wiotkie (AFP) [60]. Zapaleniu mózgu towarzyszą mioklonie w czasie snu, letarg, śpiączka, senność, drgawki, ataksja, porażenie nerwu czaszkowego, niedrożność jelit, trudności w połykaniu, oczopląs, potliwość. Dla zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych charakterystyczne są: wymioty, mioklonie, sztywność karku, ból głowy i drażliwość oraz płacz. Objawy zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych najczęściej ustępują po 7 dniach. Ostre porażenie wiotkie po zakażeniu EV71 jest zazwyczaj łagodniejsze w przebiegu i częstej dochodzi do wyzdrowień niż po zakażeniu wirusem polio, objawia się słabością kończyn i obniżonym refleksem. Sugeruje się, że mechanizm powstawania AFP w przypadku zakażenia EV71 jest odmienny od mechanizmu powstawania porażeń po zakażeniu wirusem polio. Porażennie ustępuje najczęściej po 10 dniach od pierwszych objawów, ale połowa przypadków skutkuje długotrwałymi następstwami, takimi jak atrofia i trudności w poruszaniu się. Zapalenie mózgu i rdzenia charakteryzuje się objawami wspólnymi z AFP. W stadium 2 choroby zawsze wymagana jest hospitalizacja [16].

W 3 stadium choroby także występują objawy neurologiczne, mają one postać dysfunkcji autonomicznego układu nerwowego, niewydolności sercowo-płucnej i obrzęku płuc. Objawy stadium 3 pojawiają

się drugiego dnia po wystąpieniu pierwszych objawów neurologicznych i są to: tachykardia, przyśpieszony oddech, cyjanoza i nadciśnienie, którym towarzyszy gorączka i potliwość. Może dojść do utraty świadomości, niedociśnienia, skąpomoczu lub bezmoczu. Jednocześnie stadium 3 wiąże się ze wzmożoną odpowiedzią komórkową i postępującą immunopatogenezą. Obserwuje się leukocytozę, hiperglikemię, niski poziom komórek NK i limfocytów CD4+ i CD8+, wysoki poziom cytokin porozapalnych: IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-1β oraz γ-interferonu, a także czynnika TNF-α [86]. W Tajwanie w 1998 roku 80% chorych dzieci umierało w ciągu 12 godzin od pojawienia się pierwszych objawów stadium 3 choroby, w przypadku wystąpienia niewydolności sercowo-płucnej śmiertelność wynosiła 90%. Wprowadzenie odpowiedniego leczenia dla 3 stadium (intensywna opieka medyczna, intubacje, podanie inotropów) obniża śmiertelność do 30%.

Stadium 4 choroby dotyczy zdrowienia oraz długotrwałych następstw zakażenia w postaci atrofii i słabości kończyn, a także obniżenia sprawności umysłowej [35]. Może zaistnieć potrzeba podtrzymywania funkcji życiowych np. oddychania oraz karmienia.

Pacjenci w stadium 1 leczeni są objawowo, stadium 2 wymaga już hospitalizacji i monitorowania podstawowych czynności życiowych. Podawane są diuretyki, furosemid, dożylna immunoglobulina (IVIG) oraz milrinon. Występująca przy ostrym zakażeniu EV71 uogólniona odpowiedź zapalna może być regulowana przez ludzką immunoglobulinę, która poprzez wpływ na sieć cytokin reguluje proces zapalny. Immunoglobulinę podaje się z pozytywnym skutkiem w przypadku zakażeń enterowirusowych u noworodków oraz w przypadkach miokarditów, gdzie po podaniu dochodzi do poprawy czynności serca i wyleczenia. Dożylna immunoglobulina stosowana była z sukcesem także w czasie epidemii w Malezji i na Tajwanie [61]. Powszechnie stosowany w chorobach serca milrinon – syntetyczny inhibitor fosfodiestrazy o działaniu wazodylacyjnym (rozszerza naczynia) i inotropowym (reguluje siłę skurczu serca), w przypadku ciężkich stadiów zakażenia EV71 zmniejsza stężenie cytokin, a tym samym redukuje stan zapalny, a także zmniejsza opór naczyniowy, zwiększa wydajność serca i znacznie redukuje śmiertelność [87]. Użycie w terapii preparatów interferonów, które hamują replikację wirusa, skutkowało wzrostem przeżywalności po zakażeniu EV71 [88]. Pacjenci w stadium 3 są poddawani intensywnej opiece medycznej, wymagają wspomagania oddychania oraz podawania środków inotropowych. W przypadkach nieżytów żołądkowo-jelitowych dochodzi do odwodnienia i zmniejszenia objętości krwi, stąd niezbędne jest kontrolowane podawanie płynów [61]. Stadium 4 to okres rekonwalescencji, wymagana jest rehabilitacja, niekiedy także monitorowanie czynności serca i płuc.

8. Prace nad szczepionką

Wydaje się, że szczepienie, podobnie jak w przypadku wirusa polio, będzie najefektywniejszym sposobem kontroli epidemii spowodowanych EV71. Na dzień dzisiejszy nie ma gotowej szczepionki przeciw EV71, choć w maju 2013 roku doniesiono o pomyślnym zakończeniu 3 fazy badań klinicznych potencjalnej szczepionki zawierającej wirusa inaktywowanego [99]. Szczepionka powinna spełniać wiele kryteriów, przede wszystkim powinna być bezpieczna, szeroko dostępna, a więc łatwa w produkcji i tania. Populację docelową stanowią dzieci do 3 roku życia, gdyż są one najwrażliwsze na zakażenie EV71.

Po epidemii w Bułgarii w 1975 roku, w Moskwie stworzono szczepionkę inaktywowaną, która miała działać na tej samej zasadzie co inaktywowana szczepionka Salka przeciw polio. Szczepionka została podana dzieciom do 4 roku życia w Bułgarii w 1976 roku była skuteczna i dobrze tolerowana, jednak nie zastosowano jej na szeroką skalę [45]. Produkcja tego typu szczepionki wymaga inaktywacji szczepów wirusowych formaliną lub wysoką temperaturą. Użycie formaliny zachowuje strukturę cząstek wirusowych i ich antygenowość, tego typu preparat charakteryzuje się wysoką immunogennością. Inaktywacja wysoką temperaturą skutkuje niższą immunogennością i potrzebą zastosowania większej dawki wirusa [90]. Poddawane próbom szczepionki wykorzystują różne genotypy wirusa jak B4 czy C2 [50]. Szczepionka inaktywowana wydaje się być obecnie najlepszym kandydatem ze względu na ustalone i sprawdzone warunki przygotowania [16]. Jedna z potencjalnych szczepionek przeszła pomyślnie trzecią fazę badań klinicznych [99].

Prace nad szczepionką atenuowaną skupiły się nad konstrukcją wirusa szczepu prototypowego genotypu A, genetycznie zmodyfikowanego, działającego na tej samej zasadzie co atenuowana szczepionka Sabina przeciw polio [5]. Wprowadzono zmiany w rejonie 5'UTR, 3'UTR oraz w genie kodującym polimerazę 3D, co spowodowało obniżenie wirulencji i ograniczyło możliwość transmisji wirusa. Skonstruowana szczepionka była immunogenna, dawała odporność krzyżową przeciw wielu genotypom EV71, ale podanie tej szczepionki powodowało także wystąpienie łagodnych objawów neurologicznych, co wymaga dalszych badań. Ten typ szczepionki wymaga badań stabilności wirusa, by wykluczyć ryzyko powrotu do formy wysoce zjadliwej [97].

Kolejna alternatywą jest zastosowanie pustych cząstek wirusowych składających się wyłącznie z białek VP1 – VP4 [97]. Tego typu szczepionka wywołuje silną odpowiedź immunologiczną humoralną i komórkową i jej zastosowanie nie niesie ryzyka powrotu do formy wirulentnej. Możliwa jest doustna droga podania szczepionki np. w formie transgenicznych roślin.

Rozważa się także możliwość użycia szczepionki DNA [81], szczepionki zawierającej peptydy syntetyczne czy szczepionki podjednostkowej [44, 97]. Wszystkie te typy szczepionek nie niosą ryzyka powrotu do neurowirulencji.

9. Zakończenie

Enterowirus 71 to bardzo zmienny wirus, zdolny do szybkiej ewolucji i powstawania nowych genotypów. Jest wymieniamy wśród patogenów wywołujących nowopojawiające się zakażenia, których znaczenie może znacznie wzrosnąć w najbliższych latach. W bardzo krótkim czasie enterowirus 71 z bycia rzadką przyczyną HFMD stał się powodem regularnych i dużych epidemii w rejonie Azji i Pacyfiku, z wieloma ciężkimi komplikacjami neurologicznymi często kończącymi się śmiercią. W wielu krajach regionu azjatyckiego choroba ta jest pod stałym nadzorem epidemiologicznym. Prowadzenie tego typu programów zbierających dane kliniczne i epidemicznych, śledzenie ewolucji i transmisji genotypów jest bardzo istotne do czasu kiedy nie zostanie stworzona skuteczna szczepionka przeciw EV71 dostępna do powszechnego użycia. Fenomen dużych epidemii w regionie Azji i Pacyfiku oraz jednoczesne krążenie wirusa w pozostałych regionach świata bez wywoływania licznych zachorowań, budzi niepokój. Czy jest to zapowiedź zbliżającej się pandemii, która ogarnie świat podobnie jak pandemia *poliomyelitis* nagle wybuchła w pierwszej połowie XX wieku? Czy w przededniu eradykacji dzikiego wirusa polio pojawił się godny następca w postaci enterowirusa 71? Odpowiedzi na te pytania przyniesie czas, ale miejmy nadzieję, że doświadczenia, które ludzkość nabyła w walce z wirusem polio, pozwolą na skuteczną walkę z enterowirusem 71.

Piśmiennictwo

1. AbuBakar S., Chee H.Y., Al-Kobaisi M.F., Xiaoshan J., Chua K.B., Lam S.K.: Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia. *Virus Res.* **61**, 1–9 (1999)
2. AbuBakar S., Sam I.C., Yusof J., Lim M.K., Misbah S., MatRahim N., Hooi P.S.: Enterovirus 71 outbreak, Brunei. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 79–82 (2009)
3. A guide to clinical management and public health response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) (online), World Health Organization Press, http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/HFMDGuidance/en/. (27 lutego 2014 roku)
4. Ang L.W., Koh B.K.W., Chan K.P., Chua L.T., James L., Goh K.T.: Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001–2007. *Ann. Acad. Med. Singapore*, **38**, 106–112 (2009)
5. Arita M., Nagata N., Iwata N., Ami Y., Sazaki Y., Mizuta K., Iwaszki T., Sata T., Wakita T., Shimizu H.: An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in Cynomolgus monkeys. *J. Virol.* **81**, 9386–9395 (2007)
6. Bedard K.M., Semler B.L.: Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* **6**, 702–713 (2004)
7. Bible J.M., Iturriza-Gomara M., Megson B., Brown D., Pantelidis P., Earl P., Bendig J., Tong C.Y.W.: Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3192–3200 (2008)
8. Bible J.M., Pantelidis P., Chan P.K.S., Tong C.Y.W.: Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev. Med. Virol.* **17**, 371–379 (2007)
9. Brown B.A., Oberste M.S., Alexander J.P., Kennett M.L., Pallansch M.A.: Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J. Virol.* **73**, 9969–9975 (1999)
10. Cardosa M.J., Krishnan S., Tio P.H., Perera D., Wong S.C.: Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot and mouth disease in Sibu, Sarawak. *Lancet,* **354**, 987–991 (1999)
11. Cardosa M.J., Perera D., Brown B.A., Cheon D., Chan H.M., Chan K.P., Cho H., McMinn P.: Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 462–468 (2003)
12. Chan L.G., Anderson L.J. i wsp.: Deaths of children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 678–683 (2000)
13. Chan Y.F, AbuBakar S.: Recombinant human enterovirus 71 in hand, foot and mouth disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1468–1470 (2004)
14. Chan Y.F., Sam I.C., Wee K.L., AbuBakar S.: Enterovirus 71 in Malaysia: a decade later. *Neurol. Asia.* **16**, 1–15 (2011)
15. Chan Y.F., Sam J.C., AbuBakar S.: Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 404–412 (2010)
16. Chang L.Y.: Enterovirus 71 in Taiwan. *Pediatr. Neonatol.* **49**, 103–112 (2008)
17. Chang L.Y., Huang L.M. i wsp.: HLA-A33 is associated with susceptibility to enterovirus 71 infection. *Pediatrics,* **122**, 1271–1276 (2008)
18. Chang L.Y., Lin T.Y. i wsp.: Risk factors of enterovirus 71 infection and associated hand, foot and mouth/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics,* **109**, doi: 10.1542/peds.109.6.e88 (2002)
19. Chang L.Y., Tsao K.C., Hsia S.H., Shih S.R., Huang C.G., Chan W.K., Hsu K.H., Fang T.Y., Huang Y.C., Lin T.Y.: Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *JAMA,* **291**, 222–227 (2004)
20. Chatproedprai S., Theanboonlers A., Korkong S., Thongmee C., Wananukul S., Poovorawan Y.: Clinical and molecular characterization of hand, foot and mouth disease in Thailand, 2008–2009. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**, 229–233 (2010)
21. Chen C.H., Hsu B.M., Wan M.T.: Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 817–823 (2008)
22. Chen C.S., Yao Y.C., Lin S.C., Lee Y.P., Wang Y.F., Wang J.R., Liu C.C., Lei H.Y., Yu C.K.: Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *J. Virol.* **81**, 8996–9003 (2007)
23. Chen K.T, Chang H.L, Wang S.T, Cheng Y.T, Yang J.Y.: Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998–2005. *Pediatrics*, **120**, 244–252 (2007)

24. Chua K.B., Chua B.H., Lee C.S.M., Chem Y.K., Ismail N., Kiyu A., Kumarasamy V.: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in the 1997, 2000 and 2005 outbreaks, Peninsular Malaysia. *Malays. J. Pathol.* **29**, 69–78 (2007)
25. Chua K.B., Kasri A.R.: Hand, foot and mouth disease due to enterovirus 71 in Malaysia. *Virol. Sin.* **26**, 221–228 (2011)
26. Chumakov M., Rodin V. i wsp.: Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch. Virol.* **60**, 329–340 (1979)
27. Deibel R, Gross LL, Collins DN.: Isolation of a new enterovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**, 203–207 (1975)
28. Gilbert G.L., Dickson K.E., Waters M.J., Kennett M.L., Land S.A., Sneddon M.: Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 484–488 (1988)
29. Hagiwara A., Tagaya I., Yoneyama T.: Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. *Intervirology,* **9**, 60–633 (1978)
30. Han J., Ma X.J., Wan J.F., Liu Y.H., Han Y.L., Chen C., Tian C., Gao C., Wang M., Dong X.P.: Long persistence of EV71 specific nucleotides in respiratory and feces samples of the patients with hand-foot-mouth disease after recovery. *BMC Infect. Dis.* **10**, doi:10.1186/1471-2334-10-178 (2010)
31. Ho M.: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **33**, 205–216 (2000)
32. Ho M., Chen E.R., Hsu K.H., Twu S.J., Chen K.T., Tsai S.F., Wang J.R., Shih S.R.: An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N. Engl. J. Med.* **341**, 929–935 (1999)
33. Honkanen H., Hyöty H. i wsp.: Human enterovirus 71 strains in the background population and in hospital patients in Finland. *J. Clin. Virol.* **56**, 348–353 (2013)
34. Hsu B.M., Chen C.H., Wan M.T.: Prevalence of enteroviruses in hot spring recreation areas of Taiwan. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 253–259 (2008)
35. Huang M.C., Wang S.M., Hsu Y.W., Lin H.C., Chi C.Y., Liu C.C.: Long-term cognitive and motor deficits after enterovirus 71 brainstem encephalitis in children. *Pediatrics,* **18**, 1785–1788 (2006)
36. Huang S.W., Hsu Y.W., Smith D.J., Kiang D., Tsai H.P., Lin K.H., Wang S.M., Liu C.C., Su I.J., Wang J.R.: Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in Taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3653–3662 (2009)
37. Huang S.W., Kiang D., Smith D.J., Wang J.R.: Evolution of re-emergent virus and its impact on enterovirus 71 epidemics. *Exp. Biol. Med.* **236**, 899–908 (2011)
38. Ishimaru Y., Nakano S., Yamaoka K., Takami S.: Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorders of central nervous system. *Arch. Dis. Child.* **55**, 583–588 (1980)
39. Kassab S., Saghi T., Boyer A., Lafon ME., Gruson D., Lina B., Fleury H., Schuffenecker I.: Fatal case of enterovirus 71 infection and rituximab therapy, France, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1345–1347 (2013)
40. Kennett M.L., Birch C.J., Lewis F.A., Yung A.P., Locarnini S.A., Gust I.D.: Enterovirus type 71 infection in Melbourne. *Bull. World Health Organ.* **51**, 609–615 (1974)
41. Khetsuriani N., LaMonte-Fowlkes A., Oberste M.S., Pallansch M.A.: Enterovirus surveillance-United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* **55**, 1–20 (2006)
42. Kim K.H.: Enterovirus 71 infection: An experience in Korea, 2009. *Korean J. Pediatr.* **53**, 616–622 (2010)
43. Kung S.H., Wang S.F., Huang C.W., Hsu C.C., Liu H.F., Yang J.Y.: Genetic and antigenic analyses of enterovirus 71 isolates in Taiwan during 1998–2005. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 782–787 (2007)
44. Kuo R.L., Shih S.R.: Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virol. J.* **10**, doi:10.1186/1743-422X-10-28 (2013)
45. Lee M.S., Tseng F.C., Wang J.R., Chi C.Y., Chong P., Su I.J.: Challenges to licensure of enterovirus 71 vaccines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, doi: 10.1371/journal.pntd.0001737 (2012)
46. Lin T.Y., Chang L.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., Chiu C.H., Hsueh C., Shih S.R., Liu C.C., Wu M.H.: The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 52–57 (2002)
47. Lin T.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., Wu C.T., Chang L.Y.: Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 269–274 (2003)
48. Lin T.Y., Twu S.J., Ho M.S., Chang L.Y., Lee C.Y.: Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg. Infect. Dis*. **9**, 291–293 (2003)
49. Lin Y.W., Wang S.W., Tung Y.Y., Chen S.H.: Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp. Biol. Med.* **234**, 1166–1173 (2009)
50. Liu C.C., Lian W.C., Butler M., Wu S.C.: High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. *Vaccine,* **25**, 19–24 (2007)
51. McMinn P.C.: An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 91–107 (2002)
52. McMinn P., Lindsay K., Perera D., Chan H.M., Chan K.P., Cardosa M.J.: Phylogenetic analysis of enterovirus 71 isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore and Western Australia. *J. Virol.* **75**, 7732–7738 (2001)
53. McMinn P., Stratov I., Nagarajan L., Davis S.: Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Western Australia. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 236–242 (2001)
54. Melnick J.L.: Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. *Rev. Infect. Dis.* **6**, 387–390 (1984)
55. Mirand A., Bailly J.L. i wsp.: Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J. Gen. Virol.* **91**, 2263–2277 (2010)
56. Nagy G., Takatsy S., Kukan E., Mihaly I., Dömök I.: Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS Disease in Hungary in 1978. *Arch. Virol.* **71**, 217–227 (1982)
57. Nishimura Y., Shimojima M., Tano Y., Miyamura T., Wakita T., Shimizu H.: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for Enterovirus 71. *Nat. Med.* **15**, 794–797 (2009)
58. Ooi M.H., Solomon T. i wsp.: Adenowirus type 21-associated Acute Flaccid Paralysis during an outbreak of Hand-foot-and-mouth Disease in Sarawak, Malaysia. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 550–559 (2003)
59. Ooi M.H., Solomon T. i wsp.: Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological and molecular epidemiological study. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 646–656 (2007)
60. Ooi M.H., Solomon T. i wsp.: Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot and mouth disease in Sarawak. *BMC Infect. Dis.* **9**, doi:10.1186/1471-2334-9-3 (2009)
61. Ooi M.H., Wong S.C., Lewthwaite P., Cardosa M.J., Solomon T.: Clinical features, diagnosis, and management of Enterovirus 71. *Lancet Neurol.* **9**, 1097–1105 (2010)
62. Ortner B., Huang C.W., Schmid D., Mutz I., Wewalka G., Allerberger F., Yang J.Y., Huemer H.P.: Epidemiology of enterovirus types causing neurological disease in Austria 1999–2007: detection of clusters of echovirus 30 and enterovirus 71 and analysis of prevalent genotypes. *J. Med. Virol.* **81** , 317–324 (2009)

63. Palacios G., Oberste M.S.: Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* **11**, 424–433 (2005)
64. Pérez-Vélez C.M., Anderson M.S., Robinson C.C., McFarland E., Nix W.A., Pallansch M.A., Oberste M.S., Glodé M.P.: Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic challenge. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 950–957 (2007)
65. Piekarowicz A.: Podstawy wirusologii molekularnej, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2012, 76–94, 151–57, 194–196
66. Podin Y., Cardosa M.J. i wsp.: Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years. *BMC Public Health.* **6**, doi:10.1186/1471-2458-6-180 (2006)
67. Poliomyelitis (online). World Health Organization, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en/. (06 marca 2014 roku)
68. Santti J., Hyypiä T., Kinnunen L., Salminen M.: Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.* **73**, 8741–8749 (1999)
69. Sarma N., Sarkar A., Mukherjee A., Ghosh A., Dhar S., Malakar R.: Epidemic of hand, foot and mouth disease in West Bengal, India in August, 2007: A multicentric study. *Indian J. Dermatol.* **54**, 26–30 (2009)
70. Schmidt N.J., Lennette E.H., Ho H.H.: An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* **129**, 304–309 (1974)
71. Severe complications of hand, foot and mouth disease (HFMD) caused by EV-71 in Cambodia – conclusion of the joint investigation (online), World Health Organization, http://www.who.int/csr/don/2012_07_13/en/.(03 marca 2014 roku)
72. Shih S.R., Stollar V., Li M.L.: Host factors in enterovirus 71 replication. *J. Virol.* **85**, 9658–9666 (2011)
73. Simmonds P., Welch J.: Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J. Virol.* **80**, 483–493 (2006)
74. Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., Cardosa M.J., McMinn P., Ooi M.H.: Virology, epidemiology, pathogenesis and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 778–790 (2010)
75. Tang W.F., Yang S.Y., Wu B.W., Jheng J.R., Chen Y.L., Shih C.H., Lin K.H., Lai H.C., Tang P., Horng J.T.: Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J. Biol. Chem.* **282**, 5888–5898 (2007)
76. Tee K.K., Lam T.T.Y., Chan Y.F., Bible J.M., Kamarulzaman A., Tong C.Y.W., Takebe Y., Pybus O.G.: Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J. Virol.* **84**, 3339–3350 (2010)
77. Tee K.K., Takebe Y., Kamarulzaman A.: Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997–2007. *Inter. J. Infect. Dis.* **13**, 307–318 (2009)
78. Thompson S.R., Sarnow P.: Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved. *Virology*, **315**, 259–266 (2003)
79. Trevelyan B., Smallman-Raynor M., Cliff A.D.: The Spatial Dynamics of Poliomyelitis in the United States: From Epidemic Emergence to Vaccine-Induced Retreat, 1910–1971. *Ann. Assoc. Am. Geogr.* **95**, 269–293 (2005)
80. Tu P.V., Thao N.T.T., Perera D., Huu T.K., Tien N.T.K., Thuong T.C., How O.M., Cardosa M.J., McMinn P.C.: Epidemiologic and virologic investigation of hand foot and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg. Infect Dis.* **13**, 1733–1741 (2007)
81. Tung W.S., Bakar S.A., Sekawi Z., Rosli R.: DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet. Vaccines Ther.* **5**, doi:10.1186/1479-0556-5-6 (2007)
82. Tyler K.L.: Emerging viral infections of the central nervous system. Part 1. *Arch. Neurol.* **66**, 939–948 (2009)
83. Van der Sanden S., Koopmans M., Uslu G., Van der Avoort H., Dutch Working Group for Clinical Virology.: Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963–2008. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2826–2833 (2009)
84. Van der Sanden S., Van der Avoort H., Lemey P., Uslu G., Koopmans M.: Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J. Gen. Virol.* **91**, 1949–1958 (2010)
85. Wang S.M., Ho T.S., Shen C.F., Liu C.C.: Enterovirus 71, one virus and many stories. *Pediatr. Neonatol.* **49**, 113–115 (2008)
86. Wang S.M., Lei H.Y., Huang K.J., Wu J.M., Wang J.R., Yu C.K., Su I.J., Liu C.C.: Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *J. Infect. Dis.* **188**, 564–570 (2003)
87. Wang S.M., Lei H.Y., Huang M.C., Wu J.M., Chen C.T., Wang J.N., Wang J.R., Liu C.C.: Therapeutic efficacy of milrinone in the management of enterovirus 71-induced pulmonary edema. *Pediatr. Pulmonol.* **39**, 219–223 (2005)
88. Wang S.M, Lei H.Y., Liu C.C.: Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis. *Clin. Dev. Immun.* **2012**, doi: 10.1155/2012/876241 (2012)
89. Wang S.M, Lei H.Y., Yu C.K., Wang J.R., Su I.J., Liu C.C.: Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J. Infect. Dis.* **198**, 1002–1006 (2008)
90. Wang X., Rao Z. i wsp.: A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 424–429 (2012)
91. Weng K.F., Li M.L., Hung C.T., Shih S.R.: Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation. *PLoS Pathog.* **5**, doi: 10.1371/journal.ppat.1000593 (2009)
92. Wu J.M., Wang J.N., Tsai Y.C., Liu C.C., Huang C.C., Chen Y.J., Yeh T.F.: Cardiopulmonary manifestations of fulminant enterovirus 71 infection. *Pediatrics*, **109**, doi:10.1186/1479-0556-5-6 (2002)
93. Yang B., Chuang H., Yang K.D.: Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virol. J.* **6**, doi: 10.1186/1743-422X-6-141 (2009)
94. Yamayoshi S., Yamashita Y., Li J., Hanagata N., Minowa T., Takemura T., Koine S.: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* **15**, 798–801 (2009)
95. Yoke-Fun C., AbuBakar S.: Phylogenetic evidence for intertypic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol.* **6**, doi: 10.1186/1471-2180-6-74 (2006)
96. Yu H., Chen W., Chang H., Tang R., Zhao J., Gan L., Liu B., Chen J., Wang M.: Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes.* **41**, 1–4 (2010)
97. Zhang D., Lu J., Lu J.: Enterovirus 71 vaccine: close but still far. *Inter. J. Infect. Dis.* **14**, 739–743 (2010)
98. Zhang Y., Xu W. i wsp.: An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Virol. J.* **7**, doi: 10.1186/1743-422X-7-94 (2010)
99. Zhu F.C., Shen X.L. i wsp.: Efficacy, safety and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet,* **381**, 2024–2032 (2013)
100. Zhu Z., Xu W. i wsp.: Retrospective seroepidemiology indicated that human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulated wildly in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008. *Virol. J.* **7**, doi: 10.1186/1743-422X-7-300 (2010)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 20–32
http://www.pm.microbiology.pl

RÓŻNORODNOŚĆ SZLAKÓW UTLENIANIA BIAŁEK DSB (DISULFIDE BOND) W ŚWIECIE MIKROORGANIZMÓW

Aneta Dobosz[1], Katarzyna M. Bocian-Ostrzycka[1], Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka[1]*

[1] Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło we wrześniu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Modelowy system szlaku utleniania Dsb *Escherichia coli*. 2.1. Charakterystyka białek EcDsbA i EcDsbB. 2.2. Szlaki utleniania i izomeryzacji/redukcji *E. coli*. 2.3. Rola motywu CXXC i pętli *cis*-Pro151 białka EcDsbA. 3. Różnorodność bakteryjnych szlaków oksydacji białek. 3.1. Zwielokrotniona liczba białek DsbA. 3.2. Różnorodność strukturalna monomerycznych białek DsbA. 3.3. Dimeryczne oksydoreduktazy DsbA. 3.4. Obecność lub brak białka pełniącego funkcję EcDsbB. 4. Specyficzność substratowa oksydoreduktaz DsbA. 4.1. Metody poszukiwania i lokalizacja substratów. 4.2. Czynniki wirulencji. 5. Inne systemy Dsb. 6. Podsumowanie

Diversity of the Dsb (disulfide bond) oxidative protein folding pathways in microbial world

Abstract: The introduction of structural disulfide bonds is crucial to the stability and activity of many extra-cytoplasmic proteins. The disulfide bond formation is a rate-limiting step in the folding process of a protein. However, most microorganisms encode a machinery to catalyse this oxidative protein folding step. In prototypic *Escherichia coli* oxidative pathway, the introduction of disulfide bridges into folding proteins is mediated by the thioredoxin family members – Dsb system proteins. Correct oxidative protein folding in the *E. coli* envelope depends on both EcDsbA and EcDsbB. Periplasmic oxidoreductase EcDsbA is a key disulfide bond formation catalyst, which is maintained in its active form by membrane-bound protein EcDsbB. To date, over 300 EcDsbA homologues from different bacterial organisms have been identified. Nevertheless, the structure, function and interactions of EcDsbA still remain the best studied. The rapidly expanding number of sequenced bacterial genomes has revealed dramatic differences between the model *E. coli* oxidative pathway and the pathway in other microorganisms. In this article, we review current knowledge about EcDsbA and focus on the diversity of the disulfide bond generation pathways functioning in the microbial world.

1. Introduction. 2. The classical *Escherichia coli* thiol oxidizing pathway. 2.1. Characteristics of EcDsbA and EcDsbB proteins. 2.2. *E. coli* oxidative and isomerization/reduction pathways. 2.3. The role of EcDsbA CXXC motif and *cis*-Pro151 loop. 3. Variety of bacterial oxidative pathways. 3.1. Multiplied number of DsbAs. 3.2. Structural diversity of monomeric DsbA proteins. 3.3. Dimeric DsbA oxidoreductases. 3.4. The presence or absence of a protein acting as EcDsbB. 4. Substrate specificity of DsbA oxidoreductases. 4.1. Procedures for DsbA substrates identification and methods of location analysis. 4.2. Virulence associated with DsbA substrates. 5. Other Dsb systems. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: bakteryjny szlak utleniania, białka Dsb, EcDsbA, mostki disiarczkowe
Keywords: Dsb proteins, EcDsbA, disulfide bonds, bacterial oxidative pathway

1. Wprowadzenie

Potranslacyjna modyfikacja białek jest istotnym procesem biologicznym decydującym o strukturze, stabilności i funkcjonalności wielu białek. Jedną z najczęściej występujących modyfikacji jest generowanie mostków disiarczkowych, polegające na utlenianiu wolnych grup tiolowych cystein, z jednoczesnym uwolnieniem dwu elektronów. Wiązania disiarczkowe obniżają entropię konformacyjną, stabilizują strukturę trzeciorzędową i czwartorzędową białek, podnoszą ich temperaturę topnienia, chronią białka przed degradacją przez proteazy, a także, poprzez zmianę ładunku powierzchniowego i specyficzności substratowej, pełnią funkcje regulatorowe. Co więcej, odwracalny charakter wprowadzania mostków disiarczkowych stanowi mechanizm sygnalizacyjny potencjału redoks [4].

W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces tworzenia wiązań disiarczkowych zachodzi w utleniających warunkach panujących w przestrzeni peryplazmatycznej. Generowanie mostków disiarczkowych jest etapem ograniczającym szybkość fałdowania białek. Proces ten *in vivo* jest katalizowany przez zespół białek Dsb (*disulfide bond*), dzięki czemu odbywa się on nawet w kilka sekund po syntezie białka i transporcie poza redukujące środowisko cytoplazmy [52, 63]. Pierwszym opisanym i jak dotąd najlepiej poznanym katalizatorem reakcji w komórkach bakteryjnych jest zidentyfikowana we wczesnych latach 90-tych w komórkach *Escherichia coli* K-12 oksydoreduktaza EcDsbA. Analiza wielu aktualnie dostępnych sekwencji nukleotydowych genomów bakteryjnych, udokumentowała ogromną różnorodność systemów Dsb funkcjonujących w komórkach innych niż *E. coli* mikroorganizmów [34].

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

2. Modelowy system szlaku utleniania Dsb *Escherichia coli*

Z wyjątkiem kilku bezwzględnych beztlenowców preferujących środowisko redukujące, wiele bakterii wykształciło szlaki katalityczne umożliwiające im wprowadzanie wiązań -S-S- do struktury białek pozacytoplazmatycznych. System oksydacyjny, funkcjonujący na terenie peryplazmy, znany powszechnie jako system Dsb (*disulfide bond formation system*) został najlepiej poznany i scharakteryzowany u *E. coli* K-12. Oksydoreduktaza EcDsbA, wraz z kilkoma innymi białkami (DsbA-G) zaliczanymi do tego systemu, została zaklasyfikowana do podrodziny tioredoksyn I. Wszystkie zaliczane do niej białka charakteryzują się występowaniem umiejscowionego w domenie tioredoksynowej (TRX) ściśle konserwowanego, aktywnego motywu CXXC (X oznacza dowolny aminokwas) oraz charakterystyczną budową przestrzenną. Łańcuch tioredoksyny składa się z pięciu β-kartek otoczonych czterema α-helisami, podzielonymi ze względu na umiejscowienie – na N-końcu struktury: β1α1β2α2β3, a na C-końcu: β4β5α4. Końce połączone są α3-helisą [9, 61].

2.1. Charakterystyka białek EcDsbA i EcDsbB

Charakterystyka strukturalna monomerycznego białka DsbA *E. coli* K-12 o masie 21 kDa wykazała zasadnicze różnice pomiędzy strukturą EcDsbA, a klasycznej tioredoksyny. Analiza krystalograficzna ujawniła, że w skład EcDsbA wchodzi pięć skręconych β-kartek umiejscowionych pomiędzy siedmioma α-helisami. Wykazano również, że pętla pomiędzy α_6-helisą, a β_4-kartką w zwoju tioredoksynowym jest kluczowa do zachowania prawidłowej funkcji i stabilności białka, a umiejscowiona w jej obrębie Pro151 w konformacji *cis*, odległa w strukturze pierwszorzędowej, znajduje się blisko aktywnego motywu Cys30--Pro31-His32-Cys33 (CPHC) w sfałdowanym białku. Powyżej motywu katalitycznego zlokalizowano wstawioną α-helikalną domenę, która najprawdopodobniej zaangażowana jest w proces wiązania i rozpoznawania substratów. Ponad to na powierzchni EcDsbA, poniżej aktywnego motywu CPHC, biegnie hydrofobowy rowek złożony z szeregu aminokwasów aromatycznych i alifatycznych, pełniący istotną rolę w cyklu katalitycznym oksydoreduktazy – jej wiązaniu i reoksydacji przez partnera redoks – błonowe białko EcDsbB [63].

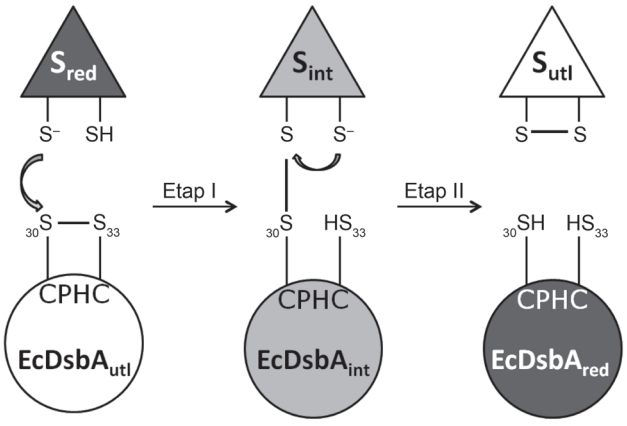
Białko EcDsbA jest jednym z najsilniejszych oksydantów tiolowych, o potencjale redoks $E^{\circ\prime} = -120$ mV, wprowadzającym mostki disiarczkowe w białkach substratowych szybko, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Aktywność EcDsbA zależy nie tylko od jego właściwości biofizycznych, ale także od aminokwasów oddzielających zlokalizowane w N-końcowej części pierwszej α_1-helisy zwoju tioredoksynowego cysteiny (Cys30 i Cys33) motywu katalitycznego. Wyeksponowana na powierzchni białka Cys30 posiada niską wartość pKa ~3,3 (standardowe pKa dla cysteiny wynosi ~9) i pozostaje w formie anionu tiolowego w pH fizjologicznym. Anion ten jest stabilizowany poprzez wiązanie wodorowe powstające pomiedzy His32 a Cys30 motywu aktywnego, wówczas gdy EcDsbA jest w stanie zredukowanym, co skutkuje mniejszą stabilnością tego białka w formie utlenionej. Różnica pomiędzy stabilnością form zredukowanej i utlenionej, która często preferowana jest przez substraty EcDsbA generuje siłę termodynamiczną, która pozwala na transfer mostków disiarczkowych z EcDsbA na białka substratowe [34].

Za utrzymanie oksydoreduktazy EcDsbA w aktywnej, utlenionej formie odpowiedzialne jest błonowe białko EcDsbB o masie ok. 20 kDa, czerpiące siłę oksydacyjną ze współpracy z łańcuchem oddechowym. EcDsbB wykorzystuje jako akceptor elektronów zarówno ubichinon w warunkach tlenowych jak i menachinon w warunkach anaerobowych, co pozwala na sprawne funkcjonowanie systemu EcDsbAB niezależnie od obecności tlenu [28].

Białko EcDsbB nie posiada charakterystycznego dla tioredoksyny układu przestrzennego. W strukturze trzeciorzędowej EcDsbB wyróżniono cztery helisy transmembranowe (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne krótszą P1 i dłuższą P2 w obrębie których występują dwie aktywne pary cystein: Cys41-Cys44 w pętli P1 oraz Cys104-Cys130 w pętli P2 [31]. Dodatkowo w C-końcowym fragmencie pętli P2 następuje wypętlenie aminokwasów w pozycjach od 116 do 120, co generuje powstanie dwóch krótszych pętli: P2 zawierającej Cys104 oraz P2' w której umiejscowiona jest Cys130. Zapewnia to skuteczniejsze zakotwiczenie białka EcDsbB w błonie wewnętrznej komórek bakteryjnych oraz dzięki odseparowaniu aktywnych cystein, szybszą reoksydację EcDsbA [29]. Pętla P1 jest nieznacznie wygięta, przez co dochodzi do powstania pomiędzy pętlami TM1 a TM4 rowka akceptorowego dla ubichinonu. Rowek, ten umiejscowiony w bliskim sąsiedztwie Cys41-Cys44 zapewnia ich utlenienie, a znajdująca się również w jego pobliżu Arg48 jest kluczowa przy transporcie elektronów z EcDsbB na chinon [16].

2.2. Szlaki utleniania i izomeryzacji/redukcji *E. coli*

W komórkach *E. coli* procesy wprowadzania i redukcji mostków disiarczkowych zachodzą w jednym przedziale komórkowym. Dzięki barierze kinetycznej, niekorzystne interakcje pomiędzy poszczególnymi elementami obydwu szlaków, prowadzące do zbyt dużego zużycia energii metabolicznej są zminimalizowane [2]. Dwuetapowa reakcja wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek transportowanych do peryplazmy (rys. 1) rozpoczyna się nukleofilowym atakiem cysteiny białka substratowego na N-terminalną cysteinę

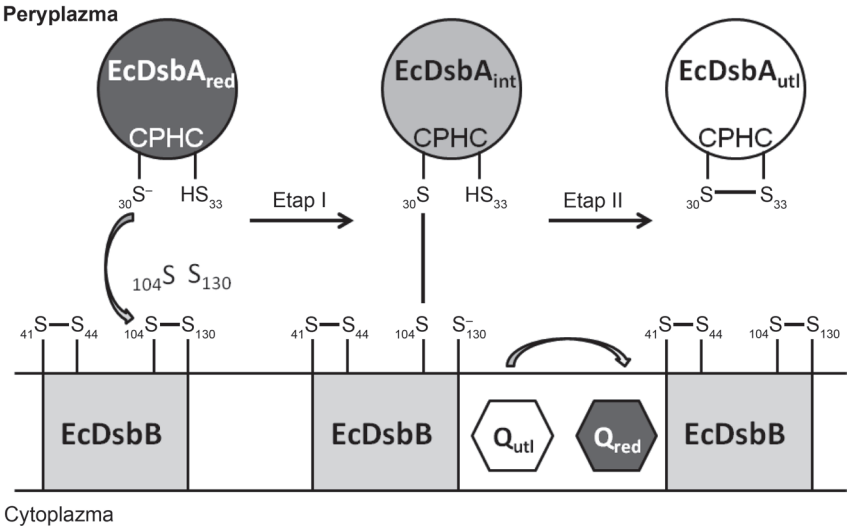


Rys. 1. Proces wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek substratowych w komórkach *E. coli* przez oksydoreduktazę EcDsbA (objaśnienia w tekście). Użyte oznaczenia: S – substrat; utl – białko w stanie utlenionym; red – białko w stanie zredukowanym; int – kompleks EcDsbA-substrat.

(Cys30) motywu CPHC EcDsbA, co skutkuje utworzeniem przejściowej struktury – połączonego EcDsbA, z białkiem docelowym (zredukowanym substratem). W następnym etapie kolejna deprotonowana cysteina substratu przeprowadza atak na cysteinę połączoną z DsbA, w wyniku czego następuje jego utlenienie i redukcja EcDsbA [13].

Za reutlenienie EcDsbA do jego aktywnej formy odpowiada błonowe białko EcDsbB, będące jego partnerem redoks. N-końcowa część pętli peryplazmatycznej P2 EcDsbB wiąże się do biegnącego poniżej motywu katalitycznego DsbA powierzchniowego, hydrofobowego rowka. Reakcja inicjowana jest poprzez nukleofilowy atak Cys30 motywu katalitycznego EcDsbA na Cys104-Cys130, co skutkuje utworzeniem przejściowego mostka disiarczkowego pomiędzy Cys30(EcDsbA)--Cys104(EcDsbB). Opublikowane struktury trzeciorzędowe kompleksów EcDsbA-EcDsbB wykazały także, że za powstanie mieszanego wiązania pomiędzy enzymami są odpowiedzialne również inne (oprócz aktywnych cystein) aminokwasy. Zidentyfikowano 26 miejsc wiązania EcDsbA do EcDsbB (po 13 na każde białko). Między Arg148 EcDsbA, a Phe106 EcDsbB tworzone jest wiązanie wodorowe. Reszta oddziaływań ma charakter hydrofobowy [28, 30, 63]. Po reutlenieniu EcDsbA i jego uwolnieniu z przejściowego kompleksu, zredukowane w efekcie reakcji grupy tiolowe cystein 104 i 130 EcDsbB są utleniane przez parę reszt cysteinowych z pętli pierwszej (Cys41-Cys44), a elektrony transferowane są najpierw na chinon, a następnie na ich ostateczny akceptor (tlen w warunkach aerobowych lub fumaran/azotan w warunkach beztlenowych) [47]. Reakcja reutleniania białka EcDsbA przez EcDsbB została przedstawiona na rys. 2.

W przypadku białek zawierających więcej niż jedną parę cystein w cząsteczce położonych blisko siebie w strukturze pierwszorzędowej, EcDsbA działające szybko, często katalizuje wprowadzenie niewłaściwych wiązań disiarczkowych. Za ich usuwanie bądź rearanżację odpowiadają białka działające w szlaku izomeryzacji/redukcji. Główną izomerazą szlaku jest peryplazmatyczne, homodimeryczne (2 × 23 kDa) białko EcDsbC o kształcie litery V, które pozostaje aktywne w formie zredukowanej. Każdy z monomerów białka zawiera w swojej N-końcowej części domenę dimeryzacyjną, a w C-końcowej zwój tioredoksynowy z motywem CXXC, (Cys98 i Cys101) o właściwościach katalitycznych. Dwie inne cysteiny obecne w EcDsbC (Cys141 i Cys163) pełnią funkcję strukturalną. Po związaniu substratu do powstającej po połączeniu N-końcowych domen EcDsbC hydrofobowej kieszeni, Cys98 przeprowadza atak nukleofilowy na nieprawidłowo utworzone wiązanie disiarczkowe. W rezultacie powstaje kompleks przejściowy katalizatora z białkiem substratowym. Następnie, w zależności od pełnionej przez EcDsbC funkcji, przejściowe wiązanie jest rozrywane przez kolejną cysteinę substratu, przy czym w jego cząsteczce tworzy się stabilniejszy mostek disiarczkowy, a EcDsbC pozostaje w formie zredukowanej (EcDsbC



Rys. 2. Reakcja reutleniania EcDsbA przez EcDsbB (objaśnienia w tekście). Użyte oznaczenia: Q – chinon; utl – białko w stanie utlenionym; red – białko w stanie zredukowanym; int – kompleks EcDsbA-EcDsbB.

działa jak izomeraza). Alternatywnie, Cys104 aktywnego motywu EcDsbC usuwa błędnie wprowadzone wiązanie disiarczkowe w substracie pozostawiając go w formie zredukowanej. W tym przypadku EcDsbC ulega utlenieniu (działa jak reduktaza) [13].

Za przywrócenie białka EcDsbC do jego aktywnej, zredukowanej formy odpowiada 59 kDa, monomeryczne białko EcDsbD umiejscowione w błonie wewnętrznej, złożone z trzech odległych strukturalnie domen DsbDα, DsbDβ i DsbDγ, przy czym każda z nich zawiera parę cystein niezbędną do funkcjonowania białka. EcDsbD czerpie siłę redukcyjną niezbędną do utrzymania substratów w aktywnej formie z NADPH i tioredoksyny 1 (TrxA) przy udziale reduktazy tioredoksyny TrxB. Substratami dla EcDsbD, oprócz EcDsbC, są również CcmG (DsbE) – oksydoreduktaza zaangażowana w proces dojrzewania cytochromu c oraz homologiczne do EcDsbC białko EcDsbG (24% podobieństwo sekwencji aminokwasowej). Pomimo podobieństwa struktur trzeciorzędowych homodimerycznego białka EcDsbG (2 × 27 kDa) do białka EcDsbC, EcDsbG wykazuje węższą w porównaniu do EcDsbC specyficzność substratową. Główną rolą pełnioną przez EcDsbG jest kontrolowanie zawartości kwasu sulfenowego w peryplazmie, a co za tym idzie ochrona białek posiadających w swojej cząsteczce jedną cysteinę przed sulfenylacją w czasie ekspozycji na reaktywne formy tlenu (ROS). Udokumentowano, że EcDsbG współdziała z trzema transpeptydazami, odpowiadającymi za sieciowanie peptydoglikanu [13, 15, 47].

2.3. Rola motywu CXXC i pętli *cis*-Pro151 białka EcDsbA

Konserwowany motyw CXXC obecny w sekwencji aminokwasowej tiolowych oksydoreduktaz odpowiada za funkcjonalne właściwości białka oraz determinuje jego potencjał redoks. Prawidłowe funkcjonowanie tego centrum katalitycznego uwarunkowane jest zarówno przez aktywne cysteiny, jak i aminokwasy je oddzielające. Wiele grup badawczych skupiło się na wyjaśnieniu roli poszczególnych elementów tego motywu w przypadku EcDsbA (motyw katalityczny: Cys30-Pro31-His32-Cys33). Poddane analizie mutanty C30A i C33A w białku EcDsbA, gdzie aktywne cysteiny sekwencji CXXC zastąpiono alaniną, wykazały, że zarówno mutant podwójny jak i mutant EcDsbA C30A nie posiadają aktywności katalitycznej. W przypadku mutanta EcDsbA C33A udokumentowano, że jest on zdolny do wprowadzania mostków disiarczkowych do zredukowanej formy inhibitora trombiny – hirudyny, z wydajnością bliską białku natywnemu oraz tworzy stabilny kompleks z EcDsbB [70]. Rozwiązanie struktury kryształów zmutowanego EcDsbA C33A przyniosło interesujące rezultaty. Wykazano, że monomeryczne EcDsbA C33A są zdolne do łączenia się w dimery poprzez tworzenie mostków disiarczkowych pomiędzy wolnymi cysteinami C30. Zaobserwowano także zmianę izomeryzacji *trans*/*cis* P31 motywu katalitycznego oraz konformacyjne rearanżacje hydrofobowego rowka odpowiedzialnego za wiązanie substratów [53].

Bioinformatyczne analizy dipeptydu oddzielającego aktywne cysteiny motywu CXXC wykazały wysoki poziom konserwacji P31 (85% scharakteryzowanych struktur białek DsbA) i preferencję aminokwasu zasadowego lub aromatycznego w pozycji X32. Najprawdopodobniej P31 jest istotna ze względu na generowanie odpowiedniej geometrii w pobliżu aktywnego motywu CXXC – odpowiada za łamanie α1-helisy i tworzenie dipolu na jej końcu, co ma wpływ na siłę oksydacyjną EcDsbA [57]. P31, w przeciwieństwie do H32, nie jest bezpośrednio zaangażowana w utrzymanie niskiego pKa C30 i większej stabilności EcDsbA w zredukowanej formie. Wykazano, że histydyna ze względów sterycznych (długość łańcucha, konformacja) jest najskuteczniejszym z badanych aminokwasów mogącym tworzyć długotrwałe wiązanie wodorowe z anionem tiolowym C30 [37].

Kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu białka EcDsbA pełni również pętla *cis*-Pro151, odpowiedzialna za jego stabilność, właściwości redoks oraz zaangażowana w rozpoznawanie substratów. Analizy mutantów EcDsbA P151A (prolinę w pozycji 151 łańcucha polipeptydowego zastąpiono alaniną) wykazały, że substytucja ta skutkuje zmianą orientacji przestrzennej pętli oddziałującej z ligandami oraz zmniejszeniem siły oksydacyjnej EcDsbA w porównaniu z białkiem natywnym. Zarówno w przypadku mutantów EcDsbA P151A, jak i innych aminokwasów w tej pozycji, zaobserwowano akumulację przejściowych, połączonych mieszanym wiązaniem disiarczkowym, kompleksów EcDsbA-EcDsbB. Co więcej, mutacja EcDsbA P151T skutkowała nagromadzeniem się intermediatów DsbA--substrat [5, 35]. W obrębie podrodzin tioredoksyn stwierdzono również konserwację pozycji aminokwasowej Pro-minus1, kontrolującej i modyfikującej właściwości katalityczne aktywnych cystein motywu CXXC. W przypadku EcDsbA zamiana waliny (V150) na występującą zazwyczaj w tym miejscu w sekwencji aminokwasowej izomeraz DsbC i DsbG treoninę (mutant EcDsbA V150T), zwiększała właściwości utleniające tego białka. Sugeruje to rolę V150 w pętli V*c*P w utrzymaniu równowagi pomiędzy zdolnością EcDsbA do utleniania substratów i reoksydacji przez EcDsbB [58].

3. Różnorodność bakteryjnych szlaków oksydacji białek

Porównanie sekwencji genomów 421 organizmów bakteryjnych pozwoliło na identyfikację 330 homologów białka EcDsbA [63]. Rozpuszczalne białka DsbA

bakterii Gram-ujemnych zazwyczaj lokalizują się w peryplazmie, podczas gdy ich homologi u bakterii Gram-dodatnich mają często postać lipoprotein i są związane z błoną komórkową [38]. Analizy bioinformatyczne wykazały również, że niektóre bakterie (szczególnie Gram-ujemne patogeny) posiadają w swoim proteomie więcej niż jeden homolog DsbA, a każdy z nich spełnia specyficzną rolę w procesie oksydacyjnego zwijania białek.

3.1. Zwielokrotniona liczba białek DsbA

W genomie *Neisseria meningitidis*, będącej czynnikiem etiologicznym meningokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zidentyfikowano trzy geny kodujące białka DsbA przy obecności jednego białka DsbB: dwie lipoproteiny – NmDsbA1 i NmDsbA2 oraz peryplazmatyczne NmDsbA3. NmDsbA1 i NmDsbA2 są podobnych rozmiarów, wykazują względem siebie duże podobieństwo w sekwencji aminokwasowej (73%), co sugeruje, że geny je kodujące mogły ulec w toku ewolucji duplikacji. Podobnie jak EcDsbA, posiadają katalityczny motyw CPHC. NmDsbA3 jest mniejsze, wykazuje względem NmDsbA1 i NmDsbA2 50%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej i charakteryzuje się innym centrum aktywnym – CVHC [64, 65]. Wszystkie trzy białka posiadają motyw T*c*P, w przeciwieństwie do występującego w EcDsbA V*c*P. Treonina obecna w motywie T*c*P odpowiada za wyjątkowe właściwości redoks białek DsbA *N. meningitidis*. NmDsbA są enzymami o najwyższym potencjale oksydacyjnym wśród podrodziny tioredoksyn ($E^{\circ\prime} = -80$ mV), stabilnymi w formie zredukowanej. Rozwiązane drogą krystalografii struktury białek NmDsbA1 i NmDsbA3 okazały się być podobne, a główną różnicę stanowi orientacja helis w domenie TRX. Kryształ białka NmDsbA2 nie został jak dotąd otrzymany, jednak najprawdopodobniej, ze względu na obserwowane fizyko-chemiczne podobieństwa białek, jego właściwości są zbliżone do NmDsbA1 [42, 68, 69]. Substratem dla NmDsbA1 i NmDsbA2 jest sekretyna PilQ, zaangażowana w biogenezę pili typu IV oraz odpowiedzialna za wiązanie DNA i jego transport do komórki *Neisseria*. Szczep *N. meningitidis* pozbawiony genów *dsbA1* i *dsbA2* wykazuje obniżoną zdolność do adhezji. NmDsbA1 częściowo komplementuje brak zdolności do ruchu mutanta *ΔdsbA E. coli*, a NmDsbA2 całkowicie komplementuje brak EcDsbA w teście pomiaru aktywności alkalicznej fosfatazy. Substraty dla NmDsbA3 nie zostały jak dotąd poznane [64].

Kolejnym mikrorganizmem posiadającym trzy paralogi białka DsbA jest *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (Se). Białka nazwane SeDsbA, SeDsbL i SeSrgA charakteryzują się niską identycznością sekwencji aminokwasowej względem siebie (18–36%), co jest powodem ich unikalnych właściwości i odmiennej roli w procesie patogenezy. Wszystkie trzy białka mają budowę dwudomenową i posiadają strukturę homologiczną do EcDsbA, różnią się natomiast właściwościami redoks, aminokwasami oddzielającymi cysteiny motywu katalitycznego oraz położeniem i aminokwasami w pozycji Pro-minus1. Są to odpowiednio dla SeDsbA: CPHC i V*c*P, dla SeDsbL: CPFC i V*c*P, dla SeSrgA: CPPC i T*c*P. SeDsbA charakteryzuje się najszerszą specyficznością substratową (między innymi białko rzęski FlgI) i tworzy funkcjonalną parę redoks z SeDsbB, podczas gdy jedynym ligandem dla SeDsbL (tworzy parę z SeDsbI) jest ASST (sulfotransferaza arylosulfatu). Dla kodowanego na plazmidzie wirulencji SeSrgA substrat stanowi główna podjednostka fimbrii adhezyjnych Pef [25].

Mikroorganizmem, charakteryzującym się obecnością unikalnej ścieżki utleniania białek jest także *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) – oportunistyczny patogen często infekujący chorych na mukowiscydozę oraz pacjentów z zaburzeniami w funkcjonowaniu układu immunologicznego. W proteomie tej bakterii zidentyfikowano dwie peryplazmatyczne oksydoreduktazy DsbA – PaDsbA1 i PaDsbA2 oraz dwa homologi białek DsbB – PaDsbB1 i PaDsbB2. PaDsbA1 jest głównym donorem mostków disiarczkowych, pełniącym istotną rolę w fałdowaniu wielu białkowych czynników wirulencji *P. aeruginosa*, utrzymywanym w aktywnej, utlenionej formie zarówno przez PaDsbB1 jak i PaDsbB2. Funkcja *in vivo* PaDsbA2 pozostaje nieznana [1]. W porównaniu do EcDsbA, zarówno PaDsbA1 (27%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej) jak PadsbA2 (14%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej) charakteryzują się skróceniem hydrofobowego rowka wiążącego substraty i bardziej zasadową powierzchnią białka [1, 62].

Wielokrotną liczbę białek homologicznych do EcDsbA, które scharakteryzowano strukturalnie i funkcjonalnie, posiadają także bakteria *Xylella fastidiosa* (XfDsbA i XfDsbA2), która jest patogenem roślin, wywołującym duże straty w uprawach winogron, cytrusów, lucerny migdałów i kawy, pasożytniczy mikroorganizm *Wolbachia pipientis* (WpDsbA1 i WpDsbA2) oraz uropatogenny szczep *E. coli* (UPEC DsbA i DsbL), który zostanie dokładniej scharakteryzowany w rozdziale 4 [63].

3.2. Różnorodność strukturalna monomerycznych białek DsbA

Do tej pory scharakteryzowano strukturalnie i funkcjonalnie jedynie 13 monomerycznych białek DsbA. Dziesięć z nich pochodzi z komórek bakterii Gram-ujemnych, a trzy z Gram-dodatnich [51]. Białka homologiczne do EcDsbA charakteryzują się dużym zróżnicowaniem i stosunkowo niską identycznością sekwencji aminokwasowej, oscylującą w granicach 15–40%. Całkowicie konserwowanymi pozycjami aminokwasowymi okazały się jedynie aktywne cysteiny, wchodzące w skład motywu CXXC. W 85 procentach także, w pierwszej pozycji dipeptydu oddzielającego cysteiny motywu,

znajduje się prolina. Pomimo tak dużych rozbieżności w strukturze pierwszorzędowej tych białek, ich ogólna architektura jest podobna. We wszystkich scharakteryzowanych strukturalnie i funkcjonalnie białkach DsbA występuje zwój tioredoksynowy z insercyjną α-helikalną domeną oraz pętla *cis*-Pro. Różnice w sekwencji aminokwasowej determinują jednak unikalne cechy strukturalne tych białek, takie jak właściwości powierzchniowe i potencjał redoks [63]. Najbardziej podobnym strukturalnie homologiem EcDsbA (40-to procenowe podobieństwo sekwencji aminokwasowej) jest białko DsbA (TcpG) *Vibrio cholerae*. Dwoma zasadniczymi aspektami różniącymi obydwa białka jest krótszy w porównaniu z EcDsbA rowek wiążący substraty i mniej wygięta α_1-helisa białka DsbA *V. cholerae* [27].

Szeroka konserwacja genów kodujących białka DsbA w świecie mikroorganizmów oraz ich udział w prawidłowym zwijaniu wielu czynników wirulencji bakterii patogennych (patrz: podrozdział 4.2.) pozwala na rozpatrywanie tych protein jako potencjalnych nowych celów dla leków antybakteryjnych [12]. M c M a h o n i wsp. dokonali porównania białek DsbA pochodzących z różnych mikroorganizmów, mającego na celu wykazanie podobieństw strukturalnych pomiędzy nimi, które mogłyby następnie posłużyć jako platforma do projektowania substancji terapeutycznych. Ze względu na aranżację β-kartek, która zasadniczo odróżnia DsbA bakterii Gram-dodatnich od Gram-ujemnych (poza nielicznymi wyjątkami), dokonano podziału tych protein na dwie klasy. Następnie każdą z klas podzielono na dwie subklasy, biorąc pod uwagę właściwości powierzchniowe białek: otoczenie motywu katalitycznego oraz miejsce oddziaływania z partnerem redoks i substratami. Do klasy Ia zaliczono białka DsbA *E. coli* K-12, *S. enterica*, *K. pneumoniae* i *V. cholerae*, a do klasy Ib DsbA *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *X. fastidiosa* i *B. pseudomallei*. Podklasa Ia skupia DsbA o mniejszym potencjale oksydacyjnym niż Ib, lecz o większym rowku substratowym, który potencjalnie mógłby wiązać małe peptydy terapeutyczne. Do podklasy IIa przypisano DsbA *M. tuberculosis*, *S. aureus* i *B. subtilis*, a do podklasy IIb jedynie białko DsbA1 *W. pipientis* (w analizach bioinformatycznych podklasa ta nie została wyodrębniona) [51].

W ostatnim czasie rozwiązano strukturę białka DsbA *Proteus mirabilis* (Pm), która pozwala przypuszczać, że jest ono podobne strukturalnie do EcDsbA. Zbadano także miejsce, w którym PmDsbA wiąże się niekowalencyjnie ze swoim ligandem. Obszar ten mógłby stać się celem inhibitora blokującego maszynerię Dsb tego patogenu [40]. Nowe spojrzenie na potencjalne miejsce działania peptydów antybakteryjnych przyniosła także charakterystyka strukturalna DsbA *Acinetobacter baumanii* (Ab). Wykazano, że białko AbDsbA oddziałuje z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu i wiąże się z nim w innym miejscu niż partner redoks. Sugeruje to, że także niekatalityczny obszar powierzchni białka AbDsbA może pełnić rolę w interakcji z substratami [56]. Jak dotąd żadne leki, będące inhibitorami bazującymi na strukturze białek DsbA, nie zostały wprowadzone do obiegu klinicznego [51].

3.3. Dimeryczne oksydoreduktazy DsbA

Zdecydowana większość dotychczas poznanych oksydoreduktaz homologicznych do EcDsbA, działających w szlaku utleniania, ma budowę monomeryczną. Wyjątek stanowią białka HP0231 *Helicobacter pylori*, DsbA2 *Legionella pneumophila* (Lp), oraz enzymy DsbA-like *Corynebacterium glutamicum*.

Mikroaerofilna pałeczka *H. pylori* jest czynnikiem etiologicznym raka żołądka oraz stanów zapalnych i wrzodów górnego odcinka przewodu pokarmowego [19]. W przeciwieństwie do *E. coli*, system Dsb *H. pylori* jest słabo poznany. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne pozwoliły na identyfikację jedynie trzech białek potencjalnie działających w tym systemie: HP0231, HP0377 i HP0595. Sekwencje aminokwasowe tych białek przyrównano liniowo do sekwencji aminokwasowych białek Dsb *E. coli.* Na tej podstawie białka te opisano jako homologi EcDsbB (HP0595), EcDsbG (HP0231) i EcDsbC (HP0377). Nie rozpoznano natomiast genu kodującego białko homologiczne do oksydoreduktazy EcDsbA [33].

Białko HP0231, opisywane w literaturze jako HpDsbG, jest dimerem złożonym z dwóch identycznych monomerów połączonych domenami dimeryzacyjnymi znajdującymi się na ich N-końcach. Każda z domen składa się z jednej α1-helisy i czterech ułożonych antyrównolegle β-kartek (β1-β4). Na C-terminalnych domenach każdego z monomerów, odbiegających budową od klasycznych domen TRX (obecność dwóch insercyjnych α4.1 i α4.2-helis oraz dodatkowej β5-kartki), umiejscowione są motywy katalityczne CXXC na α3-helisie i pętla *cis*-Pro w jego bliskiej odległości. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej białek HP0231 i dimerycznej reduktazy EcDsbG wykazało, że są one podobne jedynie w 6%-ach, a budowa monomerów obydwu białek jest różna. Pomimo podobieństwa rozmiarów obydwu kryształów, analiza superimpozycji (nałożenia modeli struktur białkowych) wykazała, że różnią się one zasadniczo długością linkera łączącego monomery, a także kształtem i ładunkiem na powierzchni V-kształtnej kieszeni wiążącej substraty (dodatni ładunek u HP0231, a ujemny u EcDsbG). Dodatkowo pętla *cis*-Pro białka HP0231 jest dłuższa niż ta EcDsbG, a motywy katalityczne HP0231 (CPHC i V*c*P) są takie same jak EcDsbA, a nie EcDsbG (CPYC i T*c*P) [71]. Badania funkcji HP0231 wykazały, że białko HP0231 tak jak EcDsbA pełni funkcję oksydazy i sugerują zmianę jego nazwy na HpDsbA. Oprócz takich samych jak u EcDsbA motywów aktywnych, HP0231 ma zbliżony do EcDsbA potencjał redoks, w dużym

stopniu komplementuje mutację *ΔdsbA E. coli*, występuje tak jak oksydazy *in vivo* w formie utlenionej i współdziała z HP0595, homologiem EcDsbB. Ponad to, mutanty izogeniczne w genie *hp0231* są wydłużone, nieruchliwe i bardziej wrażliwe na DTT, co również jest podobne do fenotypu mutantów *dsbA*⁻ *E. coli* [59].

W genomie *L. pneumophila* zidentyfikowano dwa geny kodujące oksydoreduktazy tiolowe DsbA1 i DsbA2. Białko LpDsbA1 komplementuje mutację *ΔdsbA E. coli*, a jego brak w komórkach *L. pneumophila* nie skutkuje obserwowalną zmianą fenotypu mutanta, w przeciwieństwie do LpDsbA2, które jest niezbędne do przeżycia tej bakterii. Spokrewnione z białkiem Com1 *Coxiella burnetii* LpDsbA2 o masie 27 kDa jest odległe filogenetycznie od EcDsbA i poza kilkoma wyjątkami konserwowane w proteomach bakterii posiadających system sekrecji typu IV (T4SS). Transportowane na teren peryzplazmy LpDsbA2 w komórkach natywnego gospodarza występuje w 60%-ach w formie zredukowanej, a w 40%-ach w formie utlenionej, co jest zbliżone ze stanem obserwowanym w przypadku EcDsbA. Dodatkowo zamiana Pro198 na treoninę w petli *cis*-Pro (P198T) tego białka skutkuje tak jak w przypadku EcDsbA nagromadzeniem stabilnych kompleksów z białkami substratowymi. Na N-końcu białka LpDsbA2 zidentyfikowano domenę dimeryzacyjną, dzięki której oksydoreduktaza ta występuje na terenie komórki w postaci homodimerów. LpDsbA2 komplementuje mutację *ΔdsbC E. coli* i tak jak izomeraza występuje w komórkach *E. coli* wyłącznie w formie zredukowanej. Ponadto LpDsbA2N (monomeryczne białko pochodne LpDsbA2, pozbawione domeny dimeryzacyjnej), w przeciwieństwie do natywnego DsbA2 *Legionella*, komplementuje brak EcDsbA w komórkach *E. coli*. Powyżej opisane właściwości pozwalają wnioskować, że LpDsbA2 jest enzymem bifunkcyjnym, posiadającym zarówno aktywność oksydazy jak i izomerazy [32, 39].

Stabilizację struktur białkowych poprzez wprowadzanie mostków disiarczkowych zaobserwowano także w przypadku Gram-dodatnich, tlenowych bakterii z rodzaju *Actinobacteria.* U przedstawiciela tej klasy *C. glutamicum* zidentyfikowano dwa homodimeryczne białka DsbA-like, które posiadają motyw katalityczny CXXC. Obydwa białka, nazwane CG26 i CG2799, podobnie jak EcDsbA wykazują *in vitro* słabe właściwości redukujące (redukują insulinę *in vitro*) i oksydacyjne (wydajnie utleniają zredukowaną RNazę A). CG26 jest konserwowane u różnych gatunków *Actinobacteria*, podczas gdy CG2799 ma jedynie dwa homologi, co sugeruje specyficzną dla *Corynebacteria* funkcję. Partner redoks tych białek nadal nie został poznany. W proteomie badanych gatunków nie zidentyfikowano białka homologicznego do EcDsbB, z tego względu sugeruje się udział białka VKOR (patrz: podrozdział 3.4) w reoksydacji białek DsbA-like *C. glutamicum* [11].

3.4. Obecność lub brak białka pełniącego funkcję EcDsbB

W przypadku bakterii należących do klas α, β i γ-Proteobacteria, mostki disiarczkowe do struktury białek wprowadzane są na podobnej drodze jak u *E. coli* (system DsbAB), w przeciwieństwie do wielu bakterii z klas *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* oraz bakterii beztlenowych, gdzie nie funkcjonuje standardowy szlak utleniania. Tworzenie wiązań -S-S- jest katalizowane przez DsbA, a za jego reoksydację odpowiedzialne jest białko będące homologiem eukariotycznej reduktazy epoksydowej VKOR [17].

Bakteryjne białko VKOR ewoluowało niezależnie od DsbB, jednakże wykazuje podobieństwa do DsbB w budowie strukturalnej i mechanizmie działania [34]. Strukturę białka VKOR w kompleksie z naturalnym substratem (białkiem posiadającym domenę TRX) rozwiązano w *Synechcoccus* sp. We wszystkich białkach VKOR rdzeń katalityczny tworzą cztery helisy transmembranowe (TM1-4) otaczające chinon [45]. Białko VKOR *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb) funkcjonalnie zastępuje brak białka DsbB w mutancie *E. coli ΔdsbB*. Ponad to, podobnie jak w przypadku białka eukariotycznego, aktywność MtbVKOR jest hamowana przez warfarynę (antykoagulant stosowany w leczeniu przeciwzakrzepowym, hamujący powstawanie aktywnej formy witaminy K). Dodatkowo wykazano, że te same mutacje punktowe są odpowiedzialne za zwiększoną oporność na ten lek w obydwu białkach. Bakteryjne białko VKOR może być zatem potencjalnym celem dla antybiotykoterapii i modelem badawczym dla homologa ludzkiego [18].

W ostatnim czasie jako partnera redoks dla MtbVKOR zidentyfikowano białko nazwane MtbDsbA-like, będące produktem genu Rv2969c. MtbDsbA jest monomerem złożonym z dwóch domen – tioredoksynowej (TRX), w obrębie której umiejscowiony jest klasyczny motyw CXXC oraz α-helikalnej zbudowanej z czterech helis α2-5, która jest stabilizowana przez strukturalne wiązanie disiarczkowe pomiędzy α2 a α5-helisą. Pomimo wielu podobieństw do EcDsbA, unikalna dla MtbDsbA jest obecność w domenie TRX α8-helisy (EcDsbA zbudowane jest z siedmiu α-helis). Dodatkowo, w przeciwieństwie do EcDsbA, MtbDsbA nie wykazuje właściwości redukujących w teście redukcji insuliny oraz posiada płytki powierzchniowy rowek hydrofobowy, co może świadczyć o jego wąskiej specyficzności substratowej [6, 55].

Jednym z najbardziej podobnych strukturalnie do MtbDsbA białek jest DsbA *Stapchylococcus aureus* (Sa). *S. aureus* wraz z *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis* są organizmami, u których zidentyfikowano jedynie białko DsbA, bez obecności jego partnerów redoks – białek DsbB i VKOR.

Pomimo wielu podobieństw SaDsbA do EcDsbA (potencjał redoks, ogólna struktura), w przeciwieństwie do EcDsbA, lipoproteina SaDsbA o masie 23 kDa posiada taką samą stabilność w stanie utlenionym jak i zredukowanym. Umożliwia to efektywne utlenienie SaDsbA, zapewniające jego aktywność po wprowadzeniu mostka disiarczkowego, przez zewnątrzkomórkowe czynniki utleniające, bez udziału DsbB i VKOR. Ponad to SaDsbA nie posiada cech charakterystycznych dla funkcjonowania białek DsbA bakterii Gram-ujemnych takich jak obecność His w sekwencji CXXC oraz Val poprzedzającej pętlę *cis*-Pro (V*c*P). SaDsbA częściowo komplementuje *ΔdsbA E. coli* (niezależnie od EcDsbB), pomimo, że motywy CXYC i T*c*P SaDsbA są bardziej typowe dla izomeraz EcDsbC i EcDsbG [23].

4. Specyficzność substratowa oksydoreduktaz DsbA

Kolejnymi zasadniczymi różnicami pomiędzy oksydazą DsbA *E. coli* K-12, a jej homologami występującymi u innych gatunków bakterii jest specyficzność substratowa oraz rozmieszczenie genów *dsbAB* w genomie (w przypadku *E. coli* i wielu innych bakterii Gram-ujemnych są one umiejscowione w odległych względem siebie miejscach genomu). W proteomie *E. coli* zidentyfikowano około 300 białek transportowanych do peryplazmy, zawierających w sekwencji aminokwasowej kilka cystein, które mogą być potencjalnymi substratami dla utlenionego EcDsbA. Ligandem dla zredukowanego EcDsbA jest za to jedynie EcDsbB [52]. Mutanty *E. coli dsbA*$^-$ wykazują fenotyp plejotropowy, są nieruchliwe oraz bardziej wrażliwe na DTT oraz jony metali ciężkich [46]. Udokumentowano, że EcDsbA uczestniczy w zwijaniu kluczowych dla funkcjonowania komórki *E. coli* białek takich jak FlgI (buduje pierścień P rzęski), LivK (prekursor białka wiążącego leucynę), YodA (wiąże jony metali), RcsF (białko regulatorowe), MepA (endopeptydaza mureiny), alkaliczna fosfataza, β-laktamaza, OmpA i rybonukleaza I [26, 36].

Wiele bakterii posiada białka homologiczne do EcDsbAB o wąskiej specyficzności substratowej. Geny kodujące te homologi białek DsbA i DsbB, nazwane DsbLI, zlokalizowane są przeważnie w trójcistronowym operonie, zawierającym także gen kodujący sulfotransferazę aryloslulfatu (ASST), która jest ich jedynym substratem [34]. W przypadku *S. enterica* sv. Typihimurium, omówionej uprzednio w podrozdziale 3.1, geny *dsbL* i *dsbI* transkrybowane są niezależne od genu *assT* [25].

ASST jest enzymem katalizującym detoksykację związków fenolowych, występującym u bakterii z rodzajów *Salmonella*, *Shewanella*, *Campylobacter*, *Geobacter* i *E. coli*. W komórkach uropatogennej (UPEC) *E. coli* CFT073, posiadającej dwie funkcjonalne pary enzymów zdolnych do wprowadzania mostków disiarczkowych – DsbAB (podobnych do DsbAB *E. coli* K-12) i DsbLI, ASST jest jedynym substratem *in vivo* dla białka DsbL. DsbL jest silniejszym od EcDsbA oksydantem tiolowym posiadającym motyw katalityczny CPFC i potencjał redoks E°' = –95 mV, wykazującym względem EcDsbA 24%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej i duże różnice strukturalne. Białko to posiada także dodatnio naładowany rowek wiążący substrat, a z kolei w sekwencji aminokwasowej ASST w sąsiedztwie cystein dominują ładunki ujemne [21, 48]. Udokumentowano, że nie właściwości oksydacyjne lecz aktywność chaperonowa białka DsbL odgrywa kluczową rolę w procesie wprowadzania wiązania -S-S- do struktury ASST [49]. Bioinformatyczne analizy wykazały obecność genów kodujących białka DsbL w 17 genomach bakteryjnych, co jest skorelowane z występowaniem w ich sąsiedztwie genu *assT* i często też *dsbI* [66].

Klasyfikacja białek DsbB i DsbI jest nieprecyzyjna, a nomenklatura myląca. Białka DsbI występujące w proteomach bakterii z rodzaju ε-Proteobacteria (np. *C. jejuni*, *H. pylori*) nie są pokrewne białkom funkcjonującym w parze redoks DsbLI w komórkach UPEC *E. coli*, czy *S. enterica*. Nazwa „DsbI" powinna być zarezerwowana dla homologów EcDsbB posiadających 5 helis transmembranowych w domenie katalitycznej, motyw CXXC umiejscowiony w pętli peryplazmatycznej i strukturę β-śmigła na C-końcu białka. Proteiny DsbI obecne u *E. coli* i *S. enterica* powinny być raczej określane mianem DsbB2 lub DsbI(DsbB2) [20, 54].

4.1. Metody poszukiwania i lokalizacja substratów

Identyfikacja ligandów białek działających w szlaku utleniania jest stosunkowo trudna, ze względu na szybkie przejście pomiędzy kompleksem DsbA-substrat, a całkowicie utlenionym substratem (etap II reakcji wprowadzania mostków disiarczkowych; patrz: podrozdział 2.2) [63]. W ich rozpoznaniu wykorzystywanych jest kilka metod bioinformatycznych, niemniej jednak wymagane jest potwierdzenie interakcji w warunkach *in vivo*. W poszukiwaniu białek *in silico*, które potencjalnie mogą wymagać wprowadzania wiązań disiarczkowych wyróżnia się kilka podejść. Dobrym indykatorem są badania strukturalne pozwalające na pomiar odległości pomiędzy dwoma cysteinami w białku (powinna być ona mniejsza niż 2,5Å). Reaktywne, parzyste cysteiny, które potencjalnie mogą uczestniczyć w tworzeniu wiązania -S-S- są zazwyczaj konserwowane ewolucyjnie w sekwencji aminokwasowej białka, co pozwala na wykluczenie cystein nie zaangażowanych w ten proces. Obecność ortologów białek EcDsbA i EcDsbB również w oczywisty sposób sugeruje występowanie ich substratów [22].

Strategią wykorzystywaną do wychwytywania kompleksów DsbA-substrat w warunkach laboratoryjnych

jest wprowadzanie mutacji punktowych w obrębie pętli *cis*Pro. W przypadku EcDsbA (V*c*P) poddano badaniu 19 różnych mutantów, lecz jedynie trzy z wprowadzonych zmian przyniosły oczekiwane rezultaty. Zastąpienie Pro151 treonią skutkowało spowolnieniem drugiego etapu reakcji wprowadzania mostków disiarczkowych i akumulacją intermediatów DsbA-substrat. Z kolei mutacje P151S i V150G pozwalały na wychwycenie kompleksów EcDsbA z jego partnerem redoks EcDsbB [35]. Innymi wykorzystywanymi w tym celu metodami są elektroforeza dwukierunkowa w połączeniu ze spektrometrią mas [26]. Domniemane ligandy są również identyfikowane poprzez badanie ich stanu stanu redoks w komórkach mutantów *E. coli dsbA*$^-$ przy użyciu czynników alkilujących [43]. Zastosowanie mogłaby także znaleźć metoda wykorzystywana przy identyfikacji substratów tioredoksyny. Zmutowanie drugiej cysteiny motywu katalitycznego CXXC białka DsbA na alaninę mogłoby zapobiegać dysocjacji jego kompleksu z substratem [9, 63].

W przypadku *E. coli* jak i innych bakterii Gram-ujemnych wprowadzanie mostków disiarczkowych przez białka Dsb odbywa się w warunkach utleniających w peryplazmie – przedziale komórkowym otoczonym dwoma błonami komórkowymi: wewnętrzną/cytoplazmatyczną (IM/CM) i zewnętrzną (OM). Udokumentowano, że wiązania -S-S- są obecne nie tylko w strukturze rozpuszczalnych białek peryplazmatycznych, ale także w przypadku protein transportowanych po syntezie na zewnątrz komórki bakteryjnej. Jak dotąd niewiele wiadomo o charakterze uczestnictwa białek Dsb w procesie ich formowania [60]. W ostatnich latach wykazano, że w komórkach *E. coli* oksydoreduktaza EcDsbA we współpracy z EcDsbC i SurA (białko chaperonowe) bierze udział w fałdowaniu wbudowanej w OM lipoproteiny LptD. Dwa obecne w strukturze tego białka mostki disiarczkowe pomiędzy cysteinami Cys31-Cys137 i Cys724-Cys725 łączą domenę N-terminalną z C-terminalną, zapewniając jego prawidłowe funkcjonowanie [8]. Lipoproteina LptD o strukturze β-baryłki w kompleksie z LptE jest kluczowa do translokacji lipopolisacharydu przez zewnętrzną błonę komórkową, co stabilizuje barierę ochronną bakterii przeciw substancjom toksycznym, z włączeniem antybiotyków [14]. Udział systemu Dsb w formowaniu wiązań -S-S- zbadano również w przypadku małej (14 kDa), zakotwiczonej w OM liopoproteiny RcsF. Białko RcsF jest częścią ścieżki sygnałowej Rcs indukowanej w warunkach stresowych i w odpowiedzi na warunki środowiska kontrolującej transkrypcję wielu genów – odpowiedzialnych za podziały komórkowe (*ftsZ*), formowanie biofilmu, ruchliwość i produkcję czynników wirulencji [44]. W sekwencji aminokwasowej RcsF znajdują się cztery konserwowane cysteiny. Początkowo określono, że co najmniej dwie z nich połączone są wiązaniem disiarczkowym i zidentyfikowano to białko jako substrat oksydoreduktazy DsbA [36]. Założenia te potwierdziło rozwiązanie struktury RcsF, dzięki któremu zidentyfikowano obecność dwóch nierównocennych wiązań -S-S- pomiędzy Cys74-Cys118 i Cys109-Cys124 (wiązanie niezbędne do zachowania aktywności białka). Co więcej udokumentowano, że w proces tworzenia mostków disiarczkowych jest zaangażowana reduktaza EcDsbC: „wychwycono" kompleksy białek RcsF-EcDsbC i udokumentowano zahamowanie ścieżki Rcs w mutancie *E. coli dsbC*$^-$ [44].

W komórkach bakterii Gram-dodatnich brak jest klasycznej peryplazmy, a obszar w którym możliwe jest wprowadzanie mostków disiarczkowych, ogranicza się jedynie do przestrzeni pomiędzy błoną cytoplazmatyczną, a ścianą komórkową [50]. Bakterie Gram-dodatnie w porównaniu do Gram-ujemnych produkują mniej protein posiadających strukturalne wiązania -S-S- i alternatywnie zastępują je wiązaniami amidowymi [12]. Ciekawy mechanizm zaobserwowano u tlenowych bakterii z rodzaju *Firmicutes*, które mają zdolność do usuwania cystein z sekwencji aminokwasowej protein sekrecyjnych [11]. Chociaż w proteomach bakterii Gram-dodatnich zidentyfikowano i zcharakteryzowano białka homologiczne do DsbA, jednak proces generowania mostków disiarczkowych w komórkach tych mikroorganizmów nadal pozostaje słabo poznany. Przykładami protein w przypadku których udokumentowano obecność wiązań -S-S- są toksyny *Corynebacterium diphtheriae* i *Clostridium tetani*, neurotoksyna A *Clostridium botulinum* oraz egzotoksyna *Streptococcus pyogenes*, lecz maszyneria odpowiedzialna za ich formowanie jak do tej pory nie została rozpoznana [12]. Substratami białek TDORs (*thiol-disulfide oxidoreductases*) bakterii Gram-dodatnich są często białka błonowe, wbudowane w ścianę komórkową lub wydzielane na zewnątrz komórki. TDORs są zazwyczaj lipoproteinami wbudowanymi w błonę komórkową i posiadającymi wyspecjalizowaną funkcję. W proteomie *Bacillus subtilis*, występują dwie pary homologów białek DsbAB (znanych jako białka Bdb), przy czym udokumentowano, że każda z nich oddziałuje docelowo wyłącznie z jednym białkiem. Substratem dla pary BdbCD jest bakteriocyna sublancyna 168, a dla pary BdbCD pseudopilina ComGC, niezbędna do osiągnięcia przez komórki *B. subtilis* stanu kompetencji [38]. Również w przypadku *S. aureus*, SaDsbA jest odpowiedzialne za stabilność białka ComGC, przy czym jak dotąd nie rozpoznano innych ligandów tego białka [12, 67]. W ostatnim czasie, przeprowadzono badania w komórkach *Streptococcus gordonii* mające na celu identyfikację TDORs tego gatunku. Wykazano, że naturalnym substratem dla oksydoreduktazy SdbA jest autolizyna AtlS, a mutanty *S. gordonii* w genie *sdbA* charakteryzują się fenotypem plejotropowym. Ponad to, sekwencja aminokwasowa

białka SdbA cechuje się małym podobieństwem wobec dotychczas poznanych sekwencji oksydoreduktaz bakterii Gram-dodatnich i może reprezentować nowy typ tych enzymów w ich komórkach [12].

4.2. Czynniki wirulencji

Substraty homologów białek DsbA to często czynniki warunkujące wirulencję bakterii patogennych takie jak: adhezyny, pili, toksyny czy elementy systemów sekrecyjnych.

W przypadku UPEC *E. coli* aktywność białka DsbA jest konieczna do osiągnięcia prawidłowej konformacji PapD, białka opiekuńczego wiążącego transportowane do peryplazmy podjednostki fimbrii typu P, które odgrywają istotną rolę w kolonizacji dróg moczowych [24]. Ponad to, wprowadzanie mostków disiarczkowych przez system Dsb do struktury białka FimA (głównej podjednostki pili typu I, warunkujących przyleganie patogenu do komórek gospodarza) jest niezbędne do jego rozpoznania i utworzenia kompleksu z białkiem chaperonowym FimC, co inicjuje proces formowania pili [10]. Aktywność DsbA jest również wymagana do powstawania pili typu IV (długich filamentów warunkujących adhezję i ruch drgający komórek bakteryjnych) u enteropatogennej *E. coli*, *N. meningitidis*, *Vibrio cholerae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Mostki disiarczkowe są także wprowadzane w obrębie C-końcowej domeny zewnątrzbłonowej adhezyny (intiminy) jelitowych patogenów *E. coli*. Ponad to w komórkach *E. coli* jak również u *S. enterica*, *P. mirabilis*, *Ervinia carotovora*, *Burkholderia cepacia* i *Campylobacter jejuni* potwierdzono rolę DsbA w powstawaniu funkcjonalnej rzęski, warunkującej zdolność do ruchu. Niektóre bakterie produkują toksyny i enzymy takie jak proteazy, które warunkują uszkodzenie komórek gospodarza i rozprzestrzenianie się patogenu. Udział systemu Dsb w powstawaniu tych czynników wirulencji został dobrze scharakteryzowany w przypadku toksyn AB_5 *V. cholerae*. Substratami dla oksydoreduktazy DsbA *P. aeruginosa* są także enzymy sekrecyjne wydzielane przez system sekrecji typu II (T2SS) takie jak proteolityczna elastaza i lipaza, a w komórkach *Yersinia pestis* czy *Shigella flexneri* prawidłowemu zwijaniu z udziałem systemów Dsb ulegają także składniki niezbędne do prawidłowego działania systemu T3SS. W przypadku Gram-dodatnich organizmów takich jak *B. subtilis* czy *Streptococcus thermophilus* DsbA jest wymagane do produkcji antybakteryjnych peptydów (m.in. bakteriocyn), które negatywnie działają na organizmy pokrewne. Ułatwia to przetrwanie bakterii je wytwarzających w środowisku poprzez wyeliminowanie konkurencji o składniki pokarmowe [24, 46, 63].

Brak prawidłowego wprowadzenia mostków disiarczkowych do struktur czynników wirulencji warunkuje obniżenie poziomu kolonizacji organizmu gospodarza oraz zatrzymanie namnażania i rozprzestrzeniania komórek bakteryjnych w jego obrębie [24]. Z tego względu białka DsbA są rozpatrywane jako potencjalne cele dla antybiotykoterapii. W przypadku patogenów z rodziny *Enterobacteriaceae* takich jak *E. coli*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri* i *Cronobacter sakazakii*, będących przyczyną trudnych do zwalczenia i wymagających nowych środków terapeutycznych infekcji szpitalnych, sekwencja aminokwasowa, właściwości redoks, struktura i miejsce wiązania substratów homologów DsbA są wysoce konserwowane [41].

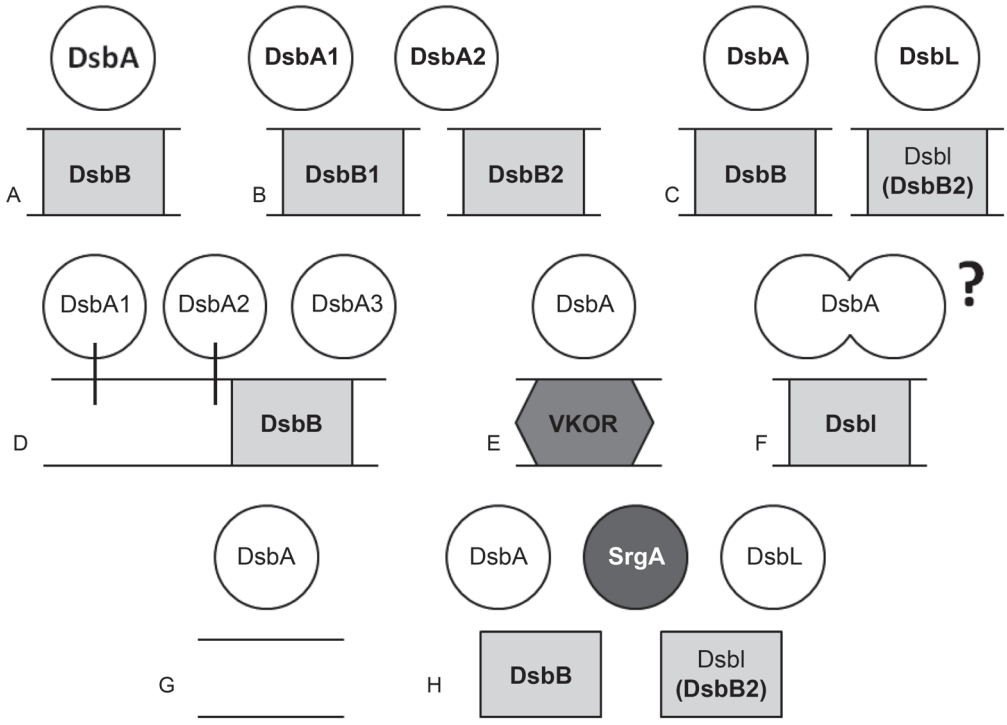
Na rys. 3 zobrazowano różnorodne, omawiane dotąd w niniejszej pracy systemy wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek.

5. Inne systemy Dsb

Chociaż obecność białka DsbA jest konieczna, aby proces wprowadzania mostków disiarczkowych zachodził efektywnie, wykazano, że w szczepach pozbawionych genów *dsbA* (lub *dsbB*) ich formowanie również ma miejsce lecz jest ono mniej wydajne w porównaniu ze szlakiem utleniania Dsb. Zjawisko to określono jako aktywność tła. Jest ono najprawdopodobniej spowodowane obecnością tlenu w peryplazmie. Podjęto próbę zidentyfikowania enzymów odpowiedzialnych za ten proces. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że nadekspresja zależnego od DsbC peryplazmatycznego białka PspE, które zawiera w sekwencji aminokwasowej tylko jedną cysteinę, zwiększa efektywność wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek w mutancie *ΔdsbA*. Co więcej system PspE/DsbC nie jest źródłem aktywności tła, co sugeruje, że może być on wykorzystywany przez komórki bakteryjne w których nie funkcjonuje standardowy szlak utleniania zależny od obecności białek DsbA i DsbB [7].

W genomach prokariotycznych zidentyfikowano także białka zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej selenocysteinę (SeCys), określane jako nowa klasa białek DsbA. Udokumentowano, że proste diselenidy w stężeniu katalitycznym funkcjonalnie zastępują brak białka DsbA w mutantach *dsbA*$^-$. Produkty genów SeCys DsbA-like nie zostały jak dotąd dobrze poznane [3].

Alternatywne szlaki wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek w komórkach *E. coli* zostały także stworzone w warunkach laboratoryjnych. Dołączenie sekwencji sygnalnej do cytoplazmatycznej tioredoksyny skutkowało jej transportem do peryplazmy, gdzie była utleniana przez DsbB i w niewielkim stopniu katalizowała tworzenie wiązań -S-S-. Zastąpienie motywu katalitycznego CXXC tioredoksyny na CXCC, przyczyniało się do tworzenia dimerów tego



Rys. 3. Schemat obrazujący zróżnicowanie bakteryjnych szlaków utleniania białek. Szczegóły i objaśnienia w tekście. **A)** modelowy szlak utleniania *E. coli* DsbAB; **B)** obecność w komórce dwóch białek DsbA i dwóch białek DsbB (np. *P. aeruginosa*); **C)** występowanie równolegle dwóch par enzymów katalizujących wprowadzanie mostków disiarczkowych DsbAB i DsbLI(B2) (np. uropatogennej *E. coli* CFT073); **D)** występowanie zwielokrotnionej liczby homologów DsbA, z których niektóre zakotwiczone są w błonie komórkowej (np. *N. meningitidis*); **E)** obecność białka DsbA w parze z białkiem VKOR, które jest jego partnerem redoks (np. *M. tuberculosis* H37Rv); **F)** występowanie dimerycznego DsbA (np. *H. pylori*), **?** – ścieżka utleniania nadal słabo poznana; **G)** występowanie w komórce bakteryjnej jedynie homologa DsbA (np. *S. aureus*); **H)** obecność szlaków DsbAB i DsbLI(B2) oraz dodatkowej, kodowanej plazmidowo oksydoreduktazy SrgA (np. *S. enterica* sv. Typhimurium).

białka zdolnych do efektywnego wprowadzania mostków disiarczkowych niezależnie od obecności DsbA i DsbB [34].

6. Podsumowanie

W komórkach *E. coli* mostki disiarczkowe wprowadzane są do struktury białek w szlaku utleniania przez system EcDsbA/EcDsbB. Monomeryczne, peryplazmatyczne EcDsbA jest główną oksydoreduktazą katalizującą proces, a zakotwiczone w błonie komórkowej EcDsbB odpowiada za utrzymanie EcDsbA w aktywnej, utlenionej formie. Prowadzone na przestrzeni ponad dwudziestu lat badania pozwoliły na szczegółowe poznanie funkcji, struktury i substratów EcDsbA, a ścieżka utleniania białek funkcjonująca w komórkach *E. coli* przez długi czas uznawana była za modelową. Wraz ze wzrostem liczby zsekwencjonowanych genomów bakteryjnych zidentyfikowano ponad 300 białek homologicznych do EcDsbA, pochodzących z różnych mikroorganizmów. Analiza porównawcza dostępnych struktur i funkcji tych białek wykazała ogólne podobieństwa pomiędzy nimi (obecność domeny TRX z insercyjną α-helisą, motywu aktywnego CXXC i pętli *cis*-Pro), ale także podkreśliła zasadnicze różnice (odmienny potencjał redoks, właściwości powierzchniowe oraz różna sekwencja aminokwasowa i specyficzność substratowa). Wykazano także ogromną różnorodność szlaków utleniania białek funkcjonujących w komórkach bakteryjnych. Udokumentowano: zwielokrotnienie liczby białek DsbA; samodzielne funkcjonowanie DsbA, bez obecności partnera redoks; zastąpienie działania DsbB przez homolog eukariotycznej reduktazy epoksydowej VKOR; umiejscowienie genu kodującego DsbA na plazmidzie wirulencji; obecność dwóch par enzymów działających w szlaku utleniania oraz odnotowano przypadki dimerycznej budowy białek DsbA.

Praca finansowana z funduszy grantu NCN nr 2012/05/B/NZ1/00039

Piśmiennictwo

1. Arts I.S., Collet J.F. i wsp.: Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, **4**, (2013)
2. Bader M.W., Xie T., Yu C.A., Bardwell J.C.: Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J. Biol. Chem*. **275**, 26082–26088 (2000)
3. Beld J., Woycechowsky K.J., Hilvert D.: Diselenides as universal oxidative folding catalysts of diverse proteins. *J. Biotechnol*. **150**, 481–489 (2010)

4. Berkmen M.: Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif*. **82**, 240–251 (2012)
5. Charbonnier J.B, Belin P., Moutiez M., Stura E.A., Quéméneur E.: On the role of the *cis*-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Sci*. **8**, 96–105 (1999)
6. Chim N., Harmston C.A., Guzman D.J., Goulding C.W.: Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Struct. Biol*. **18**, 13–23 (2013)
7. Chng S.S., Dutton R.J., Denoncin K., Vertommen D., Collet J.F., Kadokura H., Beckwith J.: Overexpression of the rhodanese PspE, a single cysteine-containing protein, restores disulphide bond formation to an *Escherichia coli* strain lacking DsbA. *Mol. Microbiol*. **85**, 996–1006 (2012)
8. Chng S.S., Xue M., Garner R.A., Kadokura H., Boyd D., Beckwith J., Kahne D.: Disulfide rearrangement triggered by translocon assembly controls lipopolysaccharide export. *Science*, **337**, 1665–1668 (2012)
9. Collet J.F., Messens J.: Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal*. **13**, 1205–1216 (2010)
10. Crespo M.D., Puorger C., Schärer M.A., Eidam O., Grütter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC. *Nat. Chem. Biol*. **8**, 707–713 (2012)
11. Daniels R., Mellroth P., Bernsel A., Neiers F., Normark S., von Heijne G., Henriques-Normark B.: Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem*. **285**, 3300–3309 (2010)
12. Davey L., Ng C.K.W., Halperin S. A., Lee S.F.: Functional Analysis of Paralogous Thiol-disulfide Oxidoreductases in Streptococcus gordonii. *J. Biol. Chem*. **288**, 16416–16429 (2013)
13. Denoncin K., Collet J.F.: Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid. Redox Signal*. **19**, 63–71 (2013)
14. Denoncin K., Vertommen D., Paek E., Collet J.F.: The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential β-barrel protein LptD. *J. Biol. Chem*. **285**, 29425–29433 (2010)
15. Depuydt M., Leonard S.E., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K.S., Collet J.F.: A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, **326**, 1109–1111 (2009)
16. Depuydt M., Messens J., Collet J.F.: How proteins form disulfide bonds. *Antioxid. Redox Signal*. **15**, 49–66 (2011)
17. Dutton R.J., Boyd D., Berkmen M., Beckwith J.: Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11933–11938 (2008)
18. Dutton R.J., Wayman A., Wei J.R., Rubin E.J., Beckwith J., Boyd D.: Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 297–301 (2010)
19. Godlewska R., Dzwonek A., Mikuła M., Ostrowski J., Pawłowski M., Bujnicki J.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* protein oxidation influences the colonization process. *Int. J. Med. Microbiol*. **296**, 321–324 (2006)
20. Grabowska A.D., Jagusztyn-Krynicka E.K. i wsp.: Functional and Bioinformatics Analysis of Two *Campylobacter jejuni* Homologs of the Thiol-Disulfide Oxidoreductase, DsbA. *PLoS One*, **9**, (2014)
21. Grimshaw J.P., Stirnimann C.U., Brozzo M.S., Malojcić G., Grütter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. **380**, 667–680 (2008)
22. Hatahet F., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1402–1414 (2014)
23. Heras B., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Frei P., Robin G., Cemazar M., Thöny-Meyer L., Glockshuber R., Martin J.L.: *Staphylococcus aureus* DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding. *J. Biol. Chem*. **283**, 4261–4271 (2008)
24. Heras B., Shouldice S.R., Totsika M., Scanlon M.J., Schembri M.A., Martin J.L.: DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol*. **7**, 215–225 (2009)
25. Heras B., Totsika M., Jarrott R., Shouldice S.R., Guncar G., Achard M.E., Wells T.J., Argente M.P., McEwan A.G., Schembri M.A.: Structural and functional characterization of three DsbA paralogues from *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Biol. Chem*. **285**, 18423–18432 (2010)
26. Hiniker A., Bardwell J.C.: *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem*. **279**, 12967–12973 (2004)
27. Hu S.H., Peek J.A., Rattigan E., Taylor R.K., Martin J.L.: Structure of TcpG, the DsbA protein folding catalyst from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol*. **268**, 137–146 (1997)
28. Inaba K., Ito K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 520–529 (2008)
29. Inaba K., Murakami S., Nakagawa A., Iida H., Kinjo M., Ito K., Suzuki M.: Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. *EMBO J*. **28**, 779–791 (2009)
30. Inaba K., Murakami S., Suzuki M., Nakagawa A., Yamashita E., Okada K., Ito K.: Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789–801 (2006)
31. Inaba K.: Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J. Biochem*. **146**, 591–597 (2009)
32. Jameson-Lee M., Garduño R.A., Hoffman P.S.: DsbA2 (27 kDa Com1-like protein) of *Legionella pneumophila* catalyses extracytoplasmic disulphide-bond formation in proteins including the Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol*. **80**, 835–852 (2011)
33. Kaakoush N.O., Kovach Z., Mendz G.L.: Potential role of thiol: disulfide oxidoreductases in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **50**, 177–183 (2007)
34. Kadokura H., Beckwith J.: Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid. Redox. Signal*. **13**, 1231–1246 (2010)
35. Kadokura H., Nichols L., Beckwith J.: Mutational alterations of the key *cis* proline residue that cause accumulation of enzymatic reaction intermediates of DsbA, a member of the thioredoxin superfamily. *J. Bacteriol*. **187**, 1519–1522 (2005)
36. Kadokura H., Tian H., Zander T., Bardwell J.C., Beckwith J.: Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*, **303**, 534–537 (2004)
37. Karshikoff A., Nilsson L., Foloppe N.: Understanding the -C-X1-X2-C- motif in the active site of the thioredoxin superfamily: *E. coli* DsbA and its mutants as a model system. *Biochemistry*, **52**, 5730–5745 (2013)
38. Kouwen T.R., van der Goot A., Dorenbos R., Winter T., Antelmann H., Plaisier M.C., Quax W.J., van Dijl J.M., Dubois J.Y.: Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol*. **64**, 984–999 (2007)
39. Kpadeh Z.Z., Jameson-Lee M., Yeh A.J., Chertihin O., Shumilin I.A., Dey R., Day S.R., Hoffman P.S.: Disulfide bond oxidoreductase DsbA2 of *Legionella pneumophila* exhibits protein disulfide isomerase activity. *J. Bacteriol*. **195**, 1825–1833 (2013)

40. Kurth F., Duprez W., Premkumar L., Schembri M.A., Fairlie D.P., Martin J.L.: Crystal Structure of the Dithiol Oxidase DsbA Enzyme from *Proteus Mirabilis* Bound Non-covalently to an Active Site Peptide Ligand. *J. Biol. Chem*. **289**, 19810–19822 (2014)
41. Kurth F., Rimmer K., Premkumar L., Mohanty B., Duprez W., Halili M.A., Shouldice S.R., Heras B., Fairlie D.P., Scanlon M.J., Martin J.L.: Comparative sequence, structure and redox analyses of *Klebsiella pneumoniae* DsbA show that anti-virulence target DsbA enzymes fall into distinct classes. *PLoS One*, **8**, 1–15 (2013)
42. Lafaye C., Iwema T., Carpentier P., Jullian-Binard C., Kroll J.S., Collet J.F., Serre L.: Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **392**, 952–966 (2009)
43. Leichert L.I., Jakob U.: Global methods to monitor the thiol--disulfide state of proteins *in vivo*. *Antioxid. Redox Signal*. **8**, 763–772 (2006)
44. Leverrier P., Declercq J.P., Denoncin K., Vertommen D., Hiniker A., Cho S.H., Collet J.F.: Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem*. **286**, 16734–16742 (2011)
45. Li W., Schulman S., Dutton R.J., Boyd D., Beckwith J., Rapoport T.A.: Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature*, **463**, 507–512 (2010)
46. Łasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev*. **31**, 626–636 (2007)
47. Łasica A.M., Staroń A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Charakterystyka białek Dsb organizmów prokariotycznych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 223–235 (2007)
48. Malojcić G., Glockshuber R.: The PAPS-independent aryl sulfotransferase and the alternative disulfide bond formation system in pathogenic bacteria. *Antioxid. Redox Signal*. **13**, 1247–1259 (2010)
49. Malojčić G., Owen R.L., Glockshuber R.: Structural and mechanistic insights into the PAPS-independent sulfotransfer catalyzed by bacterial aryl sulfotransferase and the role of the DsbL/Dsbl system in its folding. *Biochemistry*, **53**, 1870–1877 (2014)
50. Matias V.R., Beveridge T.J.: Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. **188**, 1011–1021 (2006)
51. McMahon R.M., Premkumar L., Martin J.L.: Four structural subclasses of the antivirulence drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1391–1401 (2014)
52. Messens J., Collet J.F.: Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **38**, 1050–1062 (2006)
53. Ondo-Mbele E., Vivès C., Koné A., Serre L.: Intriguing conformation changes associated with the *trans*/*cis* isomerization of a prolyl residue in the active site of the DsbA C33A mutant. *J. Mol. Biol*. **347**, 555–563 (2005)
54. Pawłowski M., Łasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., Bujnicki J.M.: AAN82231 protein from uropathogenic *E. coli* CFT073 is a close paralog of DsbB enzymes and does not belong to the DsbI family. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 181–184 (2009)
55. Premkumar L., Heras B., Duprez W., Walden P., Halili M., Kurth F., Fairlie D.P., Martin J.L.: Rv2969c, essential for optimal growth in *Mycobacterium tuberculosis*, is a DsbA-like enzyme that interacts with VKOR-derived peptides and has atypical features of DsbA-like disulfide oxidases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. **69**, 1981–1994 (2013)
56. Premkumar L., Kurth F., Duprez W., Grøftehauge M.K., King G.J., Halili M.A., Heras B., Martin J.L.: Structure of the *Acinetobacter baumannii* Dithiol Oxidase DsbA Bound to Elongation Factor EF-Tu Reveals a Novel Protein Interaction Site. *J. Biol. Chem*. **289**, 19869–19880 (2014)
57. Quan S., Schneider I., Pan J., Von Hacht A., Bardwell J.C.: The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem*. **282**, 28823–28833 (2007)
58. Ren G., Bardwell J.C. i wsp.: Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem*. **284**, 10150–10159 (2009)
59. Roszczenko P., Radomska K.A., Wywial E., Collet J.F., Jagusztyn--Krynicka E.K.: A novel insight into the oxidoreductase activity of *Helicobacter pylori* HP0231 protein. *PLoS One*, **7**, (2012)
60. Ruiz N., Chng S.S., Hiniker A., Kahne D., Silhavy T.J.: Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12245–12250 (2010)
61. Sato Y., Inaba K.: Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals. *FEBS J*. **279**, 2262–2271 (2012)
62. Shouldice S.R., Heras B., Jarrott R., Sharma P., Scanlon M.J., Martin J.L.: Characterization of the DsbA oxidative folding catalyst from *Pseudomonas aeruginosa* reveals a highly oxidizing protein that binds small molecules. *Antioxid. Redox Signal*. **12**, 921–931 (2010)
63. Shouldice S.R., Heras B., Walden P.M., Totsika M., Schembri M.A., Martin J.L.: Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid. Redox Signal*. **14**, 1729–1760 (2011)
64. Sinha S., Langford P.R., Kroll J.S.: Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000 (2004)
65. Tinsley C.R., Voulhoux R., Beretti J.L., Tommassen J., Nassif X.: Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J. Biol. Chem*. **279**, 27078–27087 (2004)
66. Totsika M., Heras B., Wurpel D.J., Schembri M.A.: Characterization of two homologous disulfide bond systems involved in virulence factor biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *J. Bacteriol*. **191**, 3901–3908 (2009)
67. van der Kooi-Pol M.M., Reilman E., Sibbald M.J., Veenstra--Kyuchukova Y.K., Kouwen T.R., Buist G., van Dijl J.M.: Requirement of signal peptidase ComC and thiol-disulfide oxidoreductase DsbA for optimal cell surface display of pseudopilin ComGC in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol*. **78**, 7124–7127 (2012)
68. Vivian J.P., Scanlon M.J. i wsp.: Structure and function of the oxidoreductase DsbA1 from *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol*. **394**, 931–943 (2009)
69. Vivian J.P., Scanlon M.J. i wsp.: Structural and biochemical characterization of the oxidoreductase NmDsbA3 from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 32452–32461 (2008)
70. Wunderlich M., Otto A., Maskos K., Mücke M., Seckler R., Glockshuber R.: Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol*. **247**, 28–33 (1995)
71. Yoon J.Y., Kim J., Lee S.J., Kim H.S., Im H.N., Yoon H.J., Kim K.H., Kim S.J., Han B.W., Suh S.W.: Structural and functional characterization of *Helicobacter pylori* DsbG. *FEBS Lett*. **585**, 3862–3867 (2011)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 33–43
http://www.pm.microbiology.pl

YARROWIA LIPOLYTICA – NIEKONWENCJONALNE DROŻDŻE W BIOTECHNOLOGII

Jolanta Krzyczkowska[1]*, Agata Urszula Fabiszewska[1]

[1] Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w lipcu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia i bioróżnorodność gatunku *Yarrowia lipolytica*. 3. Morfologia i fizjologia drożdży *Yarrowia lipolytica*. 4. Charakterystyka genetyczna *Yarrowia lipolytica*. 5. Biotechnologiczne znaczenie drożdży *Yarrowia lipolytica*. 5.1. Rola drożdży *Yarrowia lipolytica* w biotechnologii żywności. 5.2. *Yarrowia lipolytica* w ochronie środowiska. 5.3. Synteza białek enzymatycznych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. 6. Podsumowanie

***Yarrowia lipolytica* – non-conventional yeast in biotechnology**

Abstract: *Yarrowia lipolytica* is one of the most extensively studied "non-conventional" yeast. It is considered as nonpathogenic and several processes based on this organism were generally recognized as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA, USA). Numerous unique physiological as well as biochemical properties exhibited by these microorganisms allow their wide use in biotechnology of food. High secretory capacity contributes to the production of a number of important metabolites, including organic acids, polyalcohols, carotenoids, aroma compounds, single cell oil or microbial surfactants. The sequenced genome and fairly well studied metabolism of this yeast species allows also for its usage as a model in numerous basic research in the field, including secretory protein, biogenesis of peroxisomes or lipid homeostasis. In this review, we have summarizedthe potential applications of the yeast *Y. lipolytica*, including the commercialization of some processes. The article provides also a synthetic description of the systematics, morphology and physiology of the species.

1. Introduction. 2. Taxonomy and biodiversity of species of *Yarrowia lipolytica*. 3. The morphology and physiology of the yeast *Yarrowia lipolytica* 4. Genetic characteristics of *Yarrowia lipolytica.* 5. Biotechnological importance of yeast *Yarrowia lipolytica*. 5.1. The role of the yeast *Yarrowia lipolytica* in the biotechnology of food. 5.2. *Yarrowia lipolytica* in environmental protection. 5.3. Synthesis of enzymes by yeast *Yarrowia lipolytica*. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, drożdże niekonwencjonalne, biosynteza
Key words: *Yarrowia lipolytica*, non-conventional yeast, biosynthesis

1. Wprowadzenie

Yarrowia lipolytica jest jednym z najpowszechniej badanych w ostatnich latach gatunków niekonwencjonalnych drożdży. Mikroorganizmy te są wybitnie tlenowe, produkują wiele ważnych metabolitów i posiadają wysoką zdolność sekrecyjną. Powyższe cechy rzutują na coraz większe biotechnologiczne znaczenie tego gatunku. Aktualnie *Y. lipolytica* znajduje zastosowanie m.in. w syntezie kwasów organicznych, w tym kwasów dikarboksylowych, w syntezie substancji słodzących, karotenoidów, oleju mikrobiologicznego czy związków zapachowych. Za jej pośrednictwem produkowane są również wysokobiałkowe pasze (Skotan S.A.). *Y. lipolytica* należy do drożdży niepatogennych i wielu procesom prowadzonym na komercyjną skalę przy jej udziale Amerykańska Agencja Rządowa Żywności i Leków *Food and Drug Administration – FDA*) przyznała status GRAS (*Generally Recognized As Safe*).

Należy wspomnieć, iż z uwagi na wysoką produkcję szeregu enzymów, w tym lipaz, drożdże *Y. lipolytica* stanowią cenne narzędzie w ochronie środowiska. Z ich udziałem możliwa jest bowiem bioremediacja gleb i wód skażonych olejami, detoksykacja związków aromatycznych czy utylizacja uciążliwych ścieków przemysłu rybnego, olejowego bądź spożywczego.

Mając na względzie coraz większe biotechnologiczne znaczenie tego gatunku, starano się w niniejszym artykule dokonać syntetycznego zestawienia informacji na temat systematyki gatunku, jego morfologii, fizjologii i przede wszystkim możliwości aplikacyjnych. Wskazano, poprzez staranny dobór literatury ostatnich kilkunastu lat, na liczne, aktualnie prowadzone badania nad wykorzystaniem drożdży *Yarrowia*. W artykule wspomniano także o początkach prac badawczych i pierwszych komercjalizacjach procesów z udziałem tego gatunku.

2. Taksonomia i bioróżnorodność gatunku *Yarrowia lipolytica*

Nazwa rodzajowa *Yarrowia* została zaproponowana w 1980 roku przez van der Walt i von Arx. Było to następstwem identyfikacji w 1972 roku przez Davida

* Autor korespondencyjny: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Chemii, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa; tel. (0-22) 59 37 618, e-mail: jolanta_krzyczkowska@sggw.pl

Yarrow z Delft Microbiology Laboratory rodzaju wyróżniającego się charakterystycznym kształtem aksospor oraz obecnością koeznymu Q-9 [51, 86, 88]. Nazwa gatunkowa „*lipolytica*" pochodzi z kolei od zdolności tych drożdży do hydrolizowania lipidów. *Yarrowia* należy do klasy S*accharomycetes* i wcześniej znana była pod nazwą *Candida*, *Endomycopsis* lub *Saccharomycopsis lipolytica* [12, 44]. Nieformalnie *Y. lipolytica* zaliczana jest do grupy drożdży niekonwencjonalnych (*ang. non-conventional yeast*), obok takich gatunków jak *Pichia pastoris*, *Pichia guilliermondii* czy *Kluyveromyces lactis*, zaś w odróżnieniu od drożdży *Saccharomyces cerevisiae* czy *Schizosaccharomyces pombe* [81].

Szczepy *Y. lipolytica* powszechnie występują w przyrodzie i są często izolowane z produktów mlecznych, takich jak sery (Camembert, Livarot, Rokpol) czy jogurty; produktów mięsnych, np. kiełbas, ze środowisk bogatych w tłuszcze. Spotyka się również szczepy izolowane ze ścieków, gleby oraz środowisk morskich o dużym zasoleniu [12, 28, 51].

W 2014 roku, w bazie CBS [www.cbs.knaw.nl/collections] znanych i zatwierdzonych po genetycznych badaniach było już 38 szczepów *Y. lipolytica*. W przypadku 22 szczepów znany jest geograficzny region ich pochodzenia, w większości są to kraje europejskie: Holandia (4 szczepy); Włochy (3 szczepy); Niemcy (3 szczepy); Norwegia (3 szczepy); Wielka Brytania (1 szczep) i Francja (1 szczep), ale także Rosja (2 szczepy), USA (3 szczepy) i Argentyna (2 szczepy). Izolowano je np. z gleby ($n = 7$); węglowodorów (np. *n*-parafin, nafty) ($n = 4$); oliwek ($n = 2$); odpadów z przerobu kukurydzy ($n = 2$); zjełczałych margaryn i majonezów ($n = 4$); soku jabłkowego ($n = 1$) bądź produktów mlecznych ($n = 1$) [34].

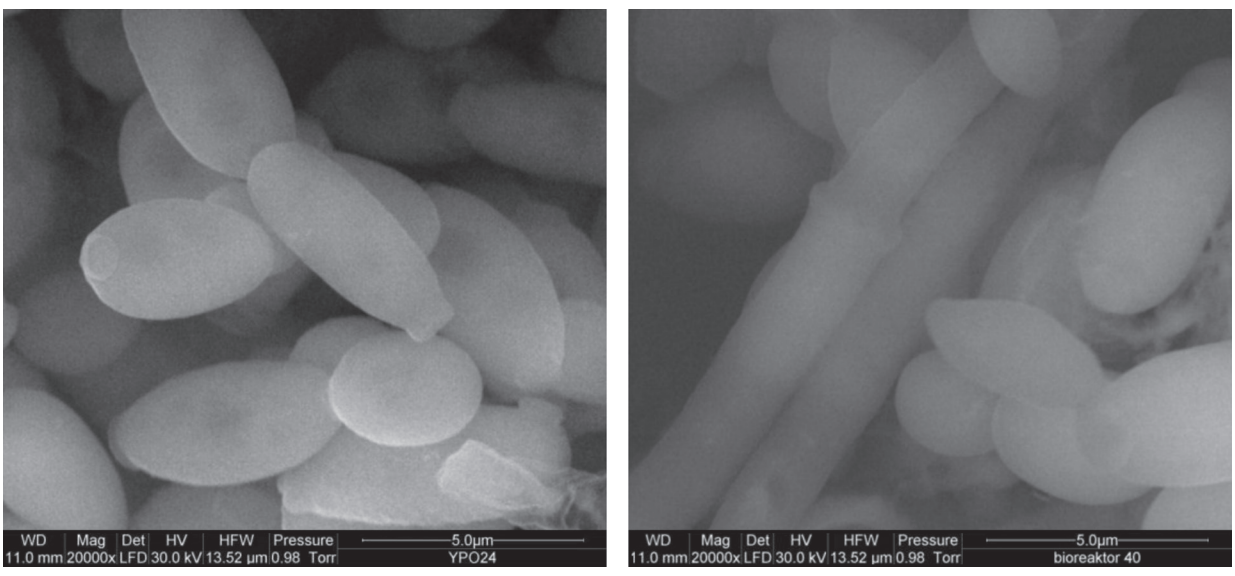
3. Morfologia i fizjologia drożdży *Yarrowia lipolytica*

Komórki drożdży z gatunku *Y. lipolytica* cechują się kształtem kulistym, elipsoidalnym lub wydłużonym, a ich wielkość waha się w granicach 3,0–5,0 × 3,3–15,0 µm. Ściana komórkowa tych drożdży zbudowana jest z galaktomannanów. Komórki występują pojedynczo lub w niewielkich skupiskach. Kolonie drożdży, rosnące na zestalonym ekstrakcie słodowym, przybierają postać gładką, błyszczącą i charakteryzują się barwą od białej do opalizująco-białej. Należy mieć jednak na względzie to, iż morfologię komórek determinują zarówno warunki środowiskowe, jak i genotyp danego szczepu [44].

Drożdże *Y. lipolytica* zaliczane są do gatunków dimorficznych, co oznacza, że komórki mogą przybierać formę od typowych komórek o sferycznym kształcie, przez pseudogrzybnię (*pseudohyphae*), aż po septowaną grzybnię (*hyphae*) charakterystyczną dla grzybów strzępkowych (Rys. 1) [12, 86].

Szerokość pojedynczej strzępki może wynosić 3,0–5,0 µm, a jej długość nawet kilka milimetrów. W każdym segmencie strzępki znajduje się jedno jądro komórkowe, a septa posiada centralnie położone zagłębienie/por, przez które rozciągają się, od jednego do drugiego segmentu, błony retikulum endoplazmatycznego [40].

Y. lipolytica stanowi modelowy organizm do badań nad dimorfizmem drożdży [51]. Do dnia dzisiejszego mechanizm tego zjawiska nie jest bowiem w pełni poznany. Wielu autorów podaje, że dimorfizm jest zależny szczepowo oraz silnie kontrolowany przez warunki środowiska [71]. Aktualnie najintensywniej badane są dwa szlaki sygnałowe związane z dimor-



Rys. 1. Formy morfologiczne szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 (*fot. własna*).
Zdjęcia komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 wykonano techniką skaningowej mikroskopii elektronowej w Centrum Analitycznym SGGW w Warszawie przy użyciu Elektronowego Mikroskopu Skaningowego Quanta FEI Electron Optics.

fizmem drożdży – szlak kinazy MAP (*mitogen activated protein*) i kinazy białkowej A (PKA) [21]. Udowodniono, iż zmiany w morfologii komórek drożdży *Y. lipolytica* związane są z jednobiegunowym wzrostem, asymetrycznym podziałem, obecnością dużych polarnie zlokalizowanych wakuol oraz zahamowaniem separacji komórek po podziale. Tworzenie strzępek obserwuje się zazwyczaj w warunkach ograniczonej dostępności azotu, a także w warunkach stresu termicznego i tlenowego. Badania naukowe dowodzą, iż obecność wielu form morfologicznych jednego mikroorganizmu nie jest korzystne. Wywiera to bowiem negatywny wpływ na przebieg procesów fermentacyjnych, utrudnia ich optymalizację, gdyż wraz ze zmianą form morfologicznych drożdży zmieniają się właściwości reologiczne oraz zaburzeniu ulega transfer ciepła i masy w bioreaktorze [25, 37, 52].

Drożdże *Y. lipolytica* zaliczamy do gatunków heterotallicznych, u których istnieją zarodniki o różnym typie koniugacyjnym, determinowanym przez dwa allele MATA i MATB. Częstotliwość koniugacji u naturalnych izolatów jest bardzo niska (poniżej 1% wszystkich żywych komórek). Sporulacja u tego gatunku drożdży zachodzi nawet w warunkach dużej dostępności źródła azotu, w przeciwieństwie do takich drożdży jak *Saccharomyces cerevisiae*. Szczepy diploidalne tworzą zarodniki w momencie, kiedy w podłożu zostanie wyczerpane źródło węgla, np. glukoza. Najwyższą częstotliwość komórek koniugujących obserwuje się w późnej fazie wzrostu logarytmicznego, a za optymalną temperaturę, w której zachodzi koniugacja uznaje się 20–28°C [81]. W każdym worku może powstać od 1 do 4 askospor, których kształt jest różnorodny, w dużej mierze determinowany koniugującymi ze sobą typami. Wśród szczepów izolowanych naturalnie ze środowiska spotyka się najczęściej komórki haploidalne [12, 44].

Drożdże *Y. lipolytica* są organizmami tlenowymi i nie prowadzą procesów fermentacji. Optymalna temperatura ich wzrostu zawiera się w przedziale 20–28°C, choć obserwuje się również namnażanie tych organizmów w szerszym zakresie temperaturowym: 5–37°C. *Y. lipolytica* rośnie w przedziale pH od 2 do 8, przy aktywności wody rzędu 0,85–0,89. Mikroorganizmy te tolerują dość wysokie zasolenie – do 10–12% w/v NaCl oraz duże stężenie sacharozy w środowisku – nawet ok. 50% w/v [12, 34, 44].

Mikroorganizmy, o których mowa w niniejszym przeglądzie posiadają zdolność do wykorzystywania jako źródła węgla szerokiej gamy substratów. Wśród nich znajdują się m.in.: węglowodany, alkohole, kwasy organiczne oraz związki hydrofobowe (np. alkany, kwasy tłuszczowe oraz triglicerydy) [24].

Spośród węglowodanów *Y. lipolytica* asymiluje heksozy, przede wszystkim glukozę, fruktozę i mannozę. Transport cukrów prostych przez błonę odbywa się zazwyczaj za pośrednictwem specyficznych przenośników/białek transportowych zwanych permeazami [30]. W przypadku di- bądź tri- sacharydów konieczna jest wcześniejsza hydroliza tych związków, przeprowadzana na zewnątrz komórki. Nie wszystkie szczepy *Y. lipolytica* tę zdolność jednak posiadają. Udowodniono to na przykładzie sacharozy, która nie jest wykorzystywana przez dzikie szczepy *Yarrowia*, z uwagi na brak zdolności tych mikroorganizmów do syntezy inwertazy – enzymu hydrolizującego wiązania fruktofuranozydowe [61].

Obok węglowodanów, *Y. lipolytica* wykorzystuje również kwasy organiczne. Badania Rodrigues i Pais [67] potwierdziły możliwość wykorzystywania przez te drożdże, jako źródła węgla i energii, kwasów: octowego, mlekowego, propionowego, bursztynowego, jabłkowego czy cytrynowego. Niektóre kwasy karboksylowe mogą mieć jednak inhibitujące działanie. Takie cechy w stosunku do komórek *Yarrowia* przejawiają m.in. kwas masłowy i sorbowy. Spowolniony wzrost komórek drożdży może być obserwowany również w przypadku przyswajalnego kwasu octowego, po przekroczeniu 1% stężenia w podłożu [24].

Z uwagi na obecność w komórkach drożdży *Y. lipolytica* enzymów z klasy oksydoreduktaz, źródłem węgla dla tych mikroorganizmów mogą być także alkohole. Drożdże, syntetyzując dehydrogenazę alkoholową, mogą wykorzystywać etanol [11]. Maksymalne stężenie alkoholu w podłożu nie powinno przekraczać jednak 3%, gdyż w wyższych stężeniach działa on na komórki toksycznie [12, 24]. Liczne badania z zakresu metabolizmu drożdży potwierdzają, iż *Y. lipolytica* posiada także zdolność do asymilacji glicerolu [5, 75]. W świecie *Procaryota* odkryto dwa główne szlaki przemian biochemicznych tego alkoholu. Pierwszy z nich polega na fosforylacji glicerolu przy pomocy kinazy glicerolowej do 3-fosfoglicerolu. Następnie związek ten poprzez działanie dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej zostaje przekształcany w fosfodihydroksyaceton. Fosfodihydroksyaceton może powstawać także w odmiennym szlaku metabolicznym drożdży, w którym początkowo następuje utlenianie glicerolu do dihydroksyacetonu, a dopiero w następnym etapie jego fosforylacja [39]. Wykorzystywanie przez drożdże *Y. lipolytica* glicerolu jako źródła węgla może prowadzić do otrzymywania szeregu cennych metabolitów, w tym m.in. kwasu cytrynowego [74], erytrytolu [72, 73], mannitolu [84] bądź lipidów, z dużą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych [58].

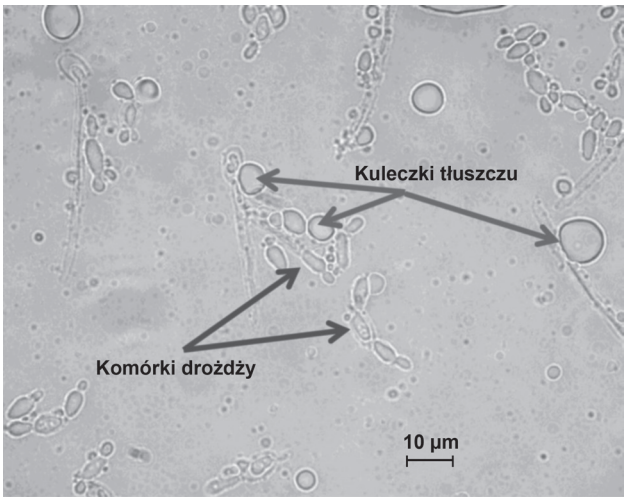
Komórki drożdży *Y. lipolytica* mogą asymilować także substraty hydrofobowe. Do najistotniejszych etapów ich asymilacji należą: pobranie i transport cząsteczek do wnętrza komórki, wstępne terminalne utlenianie cząsteczek alkanów do odpowiednich kwasów tłuszczowych w retikulum endoplazmatycznym

(ER) oraz peroksysomach, aktywacja wolnych kwasów tłuszczowych do odpowiednich estrów acetylo-CoA na drodze β-oksydacji w peroksysomach (na tym etapie może także zachodzić ich akumulacja w postaci lipidów komórkowych) oraz synteza substratów pośrednich cyklu kwasów trikarboksylowych [28].

Triglicerydy są najpierw hydrolizowane do wolnych kwasów tłuszczowych za pośrednictwem syntetyzowanych przez drożdże enzymów lipolitycznych, a następnie pobierane do wnętrza komórek. Alkany wnikają do komórki bezpośrednio, bez wstępnych modyfikacji enzymatycznych. Istnieją dwie hipotezy dotyczące transportu cząsteczek hydrofobowych do wnętrza komórki. Pierwszym etapem asymilacji alkanów jest prawdopodobnie ich emulgacja, którą umożliwia m.in. liposan – glikoproteina o masie 27 kDa, syntetyzowana przez drożdże *Y. lipolytica*. Drugi mechanizm dotyczy zdolności adhezyjnych struktury ściany komórkowej drożdży (Rys. 2) oraz transportu pasywnego drogą dyfuzji.

Drożdże *Y. lipolytica* posiadają zdolność do modyfikacji hydrofobowych właściwości powierzchni komórki i są one w stanie modyfikować zarówno grubość ściany komórkowej, jak i przestrzeni periplazmatycznej oraz tworzyć system wpukleń błony komórkowej, które łączą kanały w ścianie komórkowej, z systemem błon wewnętrznych ER [28].

Asymilacja kwasów tłuszczowych przez drożdże *Y. lipolytica* odbywa się dzięki obecności kilku specyficznych białek transportowych FABP (*fatty acid binding proteins*) oraz syntetaz acylo-CoA (I i II), a cząsteczki alkanów ulegają hydroksylacji przez monooksygenazy cytochromu P-450 [12, 23, 28]. Jak dotąd w komórkach *Y. lipolytica* zidentyfikowano 40 kompleksów białkowych, które biorą udział w metabolizmie substratów hydrofobowych [45].



Rys. 2. Adsorbcja kuleczek tłuszczowych na powierzchni komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* MTLY40-2p namnażanych na podłożu z olejem rycynowym (*fot. własna*).

Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Carl Zeiss Axioplan 2.

W zależności od warunków środowiska drożdże potrafią kumulować kwasy tłuszczowe w postaci triglicerydów lub estrów steroli, tworząc tzw. ciała lipidowe LB (*lipid bodies*). Ciała lipidowe składają się z hydrofobowego rdzenia zbudowanego głównie z triacyloglyceroli, otoczonego pojedynczą warstwą fosfolipidów i związanych z nimi cząsteczek białek [28]. Biosynteza lipidów odbywa się dwiema drogami – *de novo* z prekursorów acetylo- i malonylo-CoA oraz *ex novo* czyli z substratów obecnych w podłożu [13].

4. Charakterystyka genetyczna *Yarrowia lipolytica*

Kompletny genom jądrowy szczepu *Y. lipolytica* E150 (CLIB99) opublikowany został w 2004 roku przez konsorcjum Génolevures, kierowane przez B e r n a r d a D u j o n [27, 44].

Zawartość par zasad GC (guanina i cytozyna) w genomie *Y. lipolytica* wynosi 49,6% [44]. Wielkość genomu tych drożdży nie jest stała dla wszystkich szczepów dzikich oraz laboratoryjnych i waha się w zakresie od 12,7 Mb (milionów par zasad) do 22,1 Mb. Genom *Y. lipolytica* koduje 6448 genów, z czego 957 z nich posiada co najmniej jeden intron. Liczba chromosomów wynosi od czterech do sześciu [12, 27].

Drożdże *Y. lipolytica* różnią się znacznie od pozostałych workowców m.in. pod względem zawartości par zasad GC, brakiem polimerazy RNA I, większym rozmiarem snRNA (mały jądrowy RNA, *small nuclear RNA)* i 7S RNA [12]. Kod genetyczny używany w komórkach *Y. lipolytica* wykazuje podobieństwo do tego wykorzystywanego przez komórki *A. niger*, a różni się od kodu genetycznego drożdży *S. cerevisiae* [32]. Drzewo filogenetyczne, zbudowane na podstawie porównania sekwencji genów najbardziej znanych gatunków drożdży, kodujących dobrze zakonserwowane funkcjonalności (jak geny rRNA), umiejscawia gatunek *Y. lipolytica* na oddzielnej w stosunku do pozostałych workowców gałęzi [10, 55].

Geny rDNA drożdży z rodzaju *Yarrowia* cechuje duży polimorfizm oraz rozproszona lokalizacja w genomie [12]. Komórki *Y. lipolytica* nie posiadają plazmidów DNA, natomiast odkryto u nich linearne cząsteczki dsRNA o długości 4,9 oraz 6 kb, podobnie jak w komórkach *S. cerevisiae*. Dodatkowo cząsteczki dsRNA zamknięte są wewnątrz białkowej otoczki przypominającej kapsyd wirusowy. Mimo to nie znaleziono żadnego dowodu na występowanie u tego gatunku fenotypu killerowego [12]. W genomie *Y. lipolytica* odkryto retrotranspozon Ylt1 o długości 9,4 kb, należący do grupy retrotraspozonów *Ty3*/gypsy i posiadający długie powtórzone sekwencje nukleotydów tzw.

LTR (*long terminal repeats*) oraz retrotranspozon Ylli, należący do rodziny L1 i nie posiadający sekwencji tego typu. Elementy transpozonowe biorą udział w rekombinacji homologicznej oraz rearanżacji genomu i szeroko spotyka się je u eukariontów [12, 19, 49, 78].

Genom mitochondrialny szczepu drożdży *Y. lipolytica* W29 opublikowany został w 2001 roku przez zespół naukowców z Niemiec i Francji. Jest to kolista dwuniciowa cząsteczka DNA wielkości 47,9 kb. Zawartość par zasad GC wynosi 22,7%. Na tej samej nici znajdują się geny: oksydoreduktazy NADH-ubichinon (kompleks I), oksydoreduktazy ubichinon-cytochrom oraz apocytochromu b (kompleks III), oksydazy cytochromowej (kompleks IV), 3 podjednostek syntazy ATP, dużej i małej podjednostki rybosomu i zestaw 27 tRNA. Co ciekawe, kod genetyczny mitochondrialnego genomu *Y. lipolytica* jest typowy dla pleśni, a wśród kodowanych cząsteczek tRNA brakuje tRNA dla argininy rozpoznającej kodon CGN [38].

5. Biotechnologiczne znaczenie drożdży *Yarrowia lipolytica*

Zainteresowanie przemysłowe gatunkiem *Y. lipolytica* rośnie nieustająco od ponad pół wieku, kiedy w latach 60-tych drożdże te badano pod kątem wykorzystania jako źródła białka SCP (*single-cell protein*). Pionierską firmą w tym zakresie było British Petroleum (BP), które rozpoczęło swą działalność w 1957 roku, tworząc z francuską spółką konsorcjum Societé Francaise des Petroles BP. BP opracowało wówczas mikrobiologiczną metodę produkcji białka opartą na wykorzystaniu *n*-parafin. Uruchomiono dwie linie produkcyjne: we Francji, gdzie produkowano białko pod handlową nazwą Toprina L przy zastosowaniu drożdży *Candida tropicalis* oraz w Szkocji, gdzie do produkcji SCP pod nazwą Tropina G wykorzystywano drożdże *Y. lipolytica* [34].

Obecnie komercyjną produkcję biomasy drożdży *Y. lipolytica* wznowiła polska firma Skotan S.A. z siedzibą w Katowicach [http://www.skotansa.pl/]. Od 2009 roku spółka produkuje ok. 1200 ton biomasy rocznie. Komórki drożdży namnażane są na podłożu zawierającym w formie źródła węgla odpadowy glicerol i produkty po odśluzowywaniu olejów roślinnych używanych przy produkcji biodiesla. Firma deklaruje, iż zawartość białka w produkowanych drożdżach paszowych sięga poziomu 41–45%, a w jego skład wchodzą istotne z żywieniowego punktu widzenia aminokwasy, w ilości wyższej niż rekomenduje to FAO/WHO [76]. Aktualnie, przy współpracy z grupą naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Skotan S.A. prowadzi badania nad zdolnościami probiotycznymi i prebiotycznymi drożdży *Y. lipolytica*.

Właściwości fizjologiczne i biochemiczne, w tym wysoka zdolność sekrecyjna przejawiana przez drożdże *Y. lipolytica* stały się podstawą szerokiego biotechnologicznego wykorzystania tych mikroorganizmów, zarówno w procesach biosyntezy, biotransformacji jak i biodegradacji.

5.1. Rola drożdży *Yarrowia lipolytica* w biotechnologii żywności

Na skalę przemysłową, z udziałem drożdży *Y. lipolytica* produkowane są kwasy organiczne, w tym kwasy będące produktami pośrednimi cyklu trikarboksylowego: kwas cytrynowy, izocytrynowy, α-ketoglutarowy i pirogronowy. Synteza kwasu cytrynowego (CA) przez drożdże *Y. lipolytica* stanowi alternatywną technologię w stosunku do procesów prowadzonych z udziałem grzybów strzępkowych *Aspergillus niger*. Wiele naturalnych szczepów tych drożdży odznacza się dobrą wydajnością i produktywnością tego kwasu [72]. Problemem jest jednak równoczesna produkcja znacznych ilości kwasu izocytrynowego (ICA) (obserwowana szczególnie u dzikich szczepów *Yarrowia*, niezależnie od zastosowanego rodzaju źródła węgla i azotu w podłożu hodowlanym oraz ich wzajemnych proporcji), a także ograniczona zdolność asymilacji cukrów. Dlatego też prowadzone są szerokie badania w kierunku ulepszania cech technologicznych tych mikroorganizmów. Celem uzyskania szczepów o wyższej wydajności produkcji i czystości procesów oraz poszerzenia możliwości wykorzystywania alternatywnych źródeł węgla prowadzone są działania w kierunku mutagenizacji czy hybrydyzacji na drodze fuzji protoplastów. Szczególnie szerokie badania w tym zakresie wykonane były dotychczas m.in. w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stosując różnorodne techniki genetyczne szukano m.in. mutantów z defektami metabolicznymi minimalizującymi uboczną produkcję ICA oraz rekombinantów o poszerzonej zdolności asymilacji cukrów. Przy zastosowaniu klasycznej mutagenizacji z udziałem różnych mutagenów, w tym: promieniowania UV, NTG (nitrozoguanidyny) oraz EMS (metanosulfonianu etylu) otrzymano mutanty *oct*-: A-101; 1.31 i K-1 produkujące kwas cytrynowy przy znacząco zmniejszonej produkcji kwasu izocytrynowego (stosunek CA:ICA – 42:1) [66]. Stosunek kwasu cytrynowego do jego izoformy na poziomie 95:5 udało się uzyskać w hodowli *Yarrowia* również zespołowi K r u s e i wsp. [41], dzięki amplifikacji w komórkach drożdży genu ICL (liazy izocytrynianowej). F ö r s t e r i wsp. [31] wskazali z kolei na możliwość obniżenia ilości syntetyzowanego kwasu izocytrynowego nawet poniżej 5% poprzez całkowite pozbawienie szczepu aktywności liazy izocytrynianowej.

Liczne badania naukowe [35, 57, 92, 94] wskazują także na potencjał drożdży *Yarrowia* w biosyntezie ketokwasów: kwasu α-ketoglutarowego i pirogronowego. Pierwsze wzmianki o zastosowaniu drożdży *Y. lipolytica* do produkcji KGA pojawiły się w 1969 roku, kiedy Tsugawa i wsp. opracowali proces biosyntezy KGA, używając jako źródła węgla podłoża z 8% dodatkiem *n*-parafin. Zastosowany szczep – *Candida lipolytica* AJ5004 pozwalał wówczas na otrzymanie 46 g KGA/dm^3 w czasie 72 godzin hodowli [26]. Na początku lat siedemdziesiątych Maldonado i wsp. [48] opatentowali syntezę kwasu KGA przez diploidalny szczep *Y. lipolytica*. Aktualne badania z tego zakresu dotyczą m.in. optymalizacji warunków hodowli w kierunku nadprodukcji KGA z glicerolu (szczep *Y. lipolytica* WSH-Z06) [95]; nadekspresji genu kodującego karboksylazę pirogronianową ScPYC1 z *Saccharomyces cerevisiae* i RoPYC2 z *Rhizopus oryzae* w komórkach szczepu *Y. lipolytica* WSH-Z06 [91]; regulacji metabolizmu acetylo-CoA poprzez ekspresję genu ACS1, kodującego syntetazę acetylo-CoA z *S. cerevisiae* oraz genu ACL, kodującego ATP-zależną liazę cytrynianową z *Mus musculus* w komórkach ww. szczepu *Y. lipolytica* [94].

Również kwasy dikarboksylowe (DCA), takie jak dodekanodiowy (C_{12}) czy brasylowy (C_{13}) mogą być syntetyzowane z udziałem drożdży *Yarrowia*. Wymienione DCA stanowią istotne półprodukty dla przemysłu chemicznego. Zarówno same kwasy, jak i ich pochodne znajdują bowiem zastosowanie m.in. przy produkcji topliwych żywic, klejów proszkowych, inhibitorów korozji, smarów i plastyfikatorów (środków zmiękczających). Produkcja DCA na drodze syntezy chemicznej przebiega wydajnie, jedynie dla kwasów o łańcuchu węglowym poniżej 12 atomów węgla. Dlatego też prowadzone są badania nad biotechnologiczną syntezą długołańcuchowych DCA, opartą o biokonwersje kwasów tłuszczowych. Dotychczas podejmowano liczne próby bioprodukcji kwasów dikarboksylowych przez drożdże *Candida cloacae*, *Candida tropicalis* i *Y. lipolytica*, w oparciu o rozkład alkanów. Pilotażowe badania w tym zakresie prowadziła m.in. japońska firma Ajinomoto Company (1971 r). Szereg badań nad syntezą DCA przez drożdże *C. cloacae* uwidocznił konieczność modyfikacji genetycznych mikroorganizmów, z uwagi na degradację syntetyzowanych DCA i kwasów tłuszczowych w szlaku β-oksydacji. Dodatkowo, w przypadku drożdży *Y. lipolytica* wskazano na kumulację triglicerydów w komórce w postaci ciał lipidowych (*lipid bodies*), co rzutowało na wydajność biokonwersji z uwagi na ograniczoną hydrolizę kumulowanych związków [83].

Athenstaedt i wsp. [6] na podstawie licznych badań biochemicznych i proteomicznych zidentyfikowali u drożdży *Y. lipolytica* białka odpowiedzialne za magazynowanie triglicerydów. Odkryto gen DGA1 (YALI0E32769g) kodujący aktywność acylotransferazy diglicerolowej acyl-CoA oraz gen LRO1 (YALI0E16797g) odpowiedzialny za syntezę białka o domniemanej aktywności acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej. Usunięcie tych dwóch genów przyczyniło się do znacznej poprawy wydajności biosyntezy DCA przez drożdże *Y. lipolytica*.

Nicaud i wsp. [50], w badaniach nad syntezą długołańcuchowych DCA przez wyżej wymienione drożdże, udało się zidentyfikować dodatkowe geny: G3P (dehydrogenaza 3-fosfoglicerolowa), SCP2 (prawdopodobny przenośnik specyficzny steroli, *putative sterol carrier*), oraz IFP 621 IPF, IPF 905 i IPF 2569 (reduktaza NADH-ubichinon). Modyfikacja ich aktywności (poprzez zakłócenia, bądź nadekspresję) pozwoliła na zmniejszenie poziomu kumulacji substratów biokonwersji w obrębie komórek *Y. lipolytica* i umożliwiła syntezę DCA na poziomie ok. 23 g/l w ciągu 130-godzinnej hodowli.

Wspomniana wcześniej zdolność *Y. lipolytica* do kumulacji lipidów przyczyniła się do włączenia tych drożdży do grupy mikroorganizmów oleogennych (czyli zdolnych do kumulacji lipidów w ilości powyżej 20% suchej masy komórki). O ile w przypadku biosyntezy DCA cecha ta nie jest pożądana, o tyle stała się cenna w opracowywaniu technologii otrzymania oleju mikrobiologicznego, czyli tzw. SCO (*single cell oil*). SCO przyciągnął uwagę naukowców, ze względu na możliwość jego stosowania w formie suplementów diety, bądź wykorzystywania przy produkcji biopaliw płynnych. Badania naukowe potwierdziły zdolność wybranych szczepów *Yarrowia* do syntezy tłuszczy, w ilości do 50% suchej masy komórki, z czego ponad 90% stanowią triglicerydy, w skład których wchodzą m.in.: kwas linolowy (ok. 50%), kwas oleinowy (ok. 30%) oraz kwas palmitynowy (ok. 10%) [14]. Tai i Stephanopoulos [82], przeprowadzając modyfikację komórek *Yarrowia* byli w stanie uzyskać nawet 61,7% tłuszczu w suchej masie komórek, po 120 h hodowli.

O praktycznym aspekcie zdolności drożdży oleogennych wspomina Papanikolaou i Aggelis [59] wskazując na możliwość stosowania lipidów syntetyzowanych przez *Yarrowia* w formie substytutów masła kakaowego. Aktualnie komercyjnie, ze zdolności kumulowania lipidów przez *Y. lipolytica* korzysta amerykańska firma DuPont, sprzedająca w formie suplementów diety mikrobiologiczny olej wzbogacony w kwas eikozapentaenowy (EPA), dostępny na rynku pod handlowa nazwą New Harvest™ [34].

Inna firma ze Stanów Zjednoczonych – Microba (koncern DSM) podjęła z kolei próbę wykorzystania drożdży *Yarrowia* w syntezie karotenoidów. Doniesienia naukowe [89] i patenty dotyczące syntezy tych związków przez drożdże oleogenne [7, 8, 79] skłoniły

firmę do badań pilotażowych, które zaowocowały wystąpieniem do *FDA* o status *GRAS* dla procesu syntezy β-karotenu przez drożdże *Y. lipolytica* [34].

Biotechnologiczne zastosowanie drożdży *Yarrowia* jest szerokie i dotyczy także m.in. syntezy alkoholu cukrowego z grupy polioli – erytrytolu. Związek ten stosowany jest jako dodatek do żywności, pełniący funkcję słodzącą, wzmacniającą smak, utrzymującą wilgoć w produkcie, ale także jako stabilizator, zagęstnik i substancja teksturująca. Od 2003 roku chińska firma Baolingbao Biology Co. z siedziba w Shandong produkuje erytrytol przy zastosowaniu drożdży *Yarrowia*. Produkt był dotychczas dystrybuowany był w Chinach, Japonii, Korei i Norwegii [34]. Od maja 2011 roku proces produkcji erytrytolu stosowany przez Baolingbao Biologu Co. zyskał status *GRAS* (http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/GRN000382.pdf).

Liczne badania w zakresie syntezy erytrytolu przez drożdże *Yarrowia* prowadzone są na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Przy okazji prac nad syntezą kwasu cytrynowego odkryto i wyłoniono szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 zdolny do biosyntezy ok. 100 g erytrytolu na dm^3 podłoża, przy wzroście na podłożu z dodatkiem odpadowego glicerolu [76, 84].

Obok polioli, *Y. lipolytica* jest w stanie syntetyzować również inne alkohole, np. 2-fenyloetanol. Alkohol ten jest cennym komponentem aromatów, cechuje się bowiem przyjemnym, różanym zapachem. Szczep *Y. lipolytica* zdolny do syntezy 2 – fenyloetanolu, w ilości ok. 0,6 g/l przy wzroście na pożywce płynnej, zawierającej jako źródło węgla glukozę lub glicerol oraz organiczne źródło azotu w formie m.in. L-fenyloalaniny, wyizolował zespół naukowców z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu [20].

Od dawna prowadzone są także liczne badania nad syntezą przez *Yarrowia* składników aromatotwórczych typu laktonów. Możliwość produkcji cyklicznych estrów na drodze biotransformacji kwasów tłuszczowych przez drożdże (*Candida tropicalis*) odkryto już w 1963 roku [56]. Od momentu tego odkrycia nieustannie podejmowane są próby wykorzystani różnych gatunków mikroorganizmów w wydajnej syntezie laktonów. *Y. lipolytica* okazała się w tym zakresie wdzięcznym mikroorganizmem. Komórki tych drożdży są aktywne w procesie β-oksydacji kwasu rycylowego [(*R*)-12-hydroksy--9-oktadeka-enowego], z którego finalnie, po cyklizacji otrzymuje się γ-dekalakton – związek charakteryzujący się brzoskwiniowym, morelowym zapachem. Dane literaturowe podają możliwość syntezy przez *Yarrowia* nawet ok. 12,3 g γ-dekalaktonu na dm^3 podłoża [1, 87].

Do estrów syntetyzowanych z udziałem drożdży *Y. lipolytica* należy także m.in. octan 2-fenyloetylu. Związek ten syntetyzowano z udziałem biomasy drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 w zespole prof. Białeckiej--Florjańczyk z SGGW w Warszawie [16].

Kolejną grupą związków zapachowych, możliwych do otrzymania na drodze biotechnologicznej z udziałem komórek *Yarrowia* są lotne C_6–C_9 aldehydy, kreujące zieloną nutę zapachową (*green note aroma compounds*). Modyfikacja genetyczna drożdży, polegająca na ekspresji systemu liazy wodoronadtlenkowej i lipooksygenazy roślinnej w ich komórkach pozwala na produkcję heksanalu w ilości nawet ok. 0,6 g/l [18, 77].

Zdolność drożdży *Y. lipolytica* do syntezy szeregu związków zapachowych, determinowana m.in. właściwościami lipolitycznymi i proteolitycznymi ma istotne znaczenie w kształtowaniu tekstury, smaku i aromatu produktów mięsnych i mleczarskich, tj. suszonych kiełbas oraz serów różnych typów, w tym m.in. Cheddar, Gouda, Brie czy Camembert. Niektóre szczepy są zdolne do syntezy amin biogennych oraz lotnych związków siarki. Obecnie prowadzone są liczne prace nad zastosowaniem drożdży z rodzaju *Yarrowia* w produkcji nowych kultur starterowych o pożądanych właściwościach przemysłowych i żywieniowych [97].

Do długiej listy substancji syntetyzowanych z udziałem *Yarrowia* należą także bioemulgatory, które stanowią dobrą alternatywę dla surfaktantów syntetycznych, m.in. z uwagi na naturalne pochodzenie, niższą toksyczność, wyższą biodegradowalność oraz często wyższą aktywność w ekstremalnych temperaturach, warunkach pH i zasoleniu [85]. Aktualnie znane są cztery biosurfaktanty produkowane przez *Y. lipolytica*: „Liposan" izolowany z hodowli na heksadekanie [23] „Yansan" syntetyzowany przy namnażaniu komórek na podłożu z glukozą [4] surfaktant „BS-I" otrzymywany z podłoża serwatkowego [90] oraz „Rufisan" produkowany podczas wzrostu mikroorganizmów na oleju sojowym, stanowiącym odpad rafineryjny [70].

5.2. *Yarrowia lipolytica* w ochronie środowiska

Uważa się, iż synteza Yansanu może być przyszłościowo obiecująca przy zastosowaniu drożdży *Yarrowia* w oczyszczaniu tanków przemysłu olejowego oraz w procesach bioremediacji [85]. Z punktu widzenia ochrony środowiska *Y. lipolytica* może odgrywać bowiem istotną rolę zarówno w bioremediacji gleb, jak i wód skażonych olejami, detoksykacji związków aromatycznych (w tym bifenyli, fenolu, dibenzofuranu), biosorpcji metali ciężkich oraz utylizacji ścieków z przemysłu rybnego, olejowego czy spożywczego [9]. Obecnie znane są udane próby stosowania drożdży w doświadczeniach mających na celu bioremediację środowisk zanieczyszczonych odpadami przemysłu tłuszczowego i paliwowego. Szczepy *Yarrowia* W29, CBS 2073 oraz IMUFRJ 50682 wykorzystywano m.in. w utylizacji odpadów pochodzących z procesu tłoczenia oliwy z oliwek i produkcji oleju palmowego [24]. Na aktywności lipolitycznej *Y. lipolytica* bazowano także

podczas usuwaniu biofilmów olejowych na powierzchni wody, gdzie immobilizowane w piankach poliuretanowych komórki drożdży były w stanie wykorzystać ok. 7–9 g oleju/g pianki [54]. Również immobilizowane komórki drożdży *Yarrowia* wykorzystano w modelowych badaniach konstrukcji biosensora wykrywającego alkany o średniej długości łańcuchach, w tym dodekan z limitem detekcji 3 mM [2].

Ciekawe rozwiązanie z punktu widzenia ochrony środowiska przedstawiła belgijska spółka Artechno SA, produkująca liofilizowaną kulturę drożdży i lipaz zewnątrzkomórkowych, pozyskaną z namnażania komórek *Yarrowia* na olejowych substratach odpadowych [28].

Aktywność *Yarrowia* w detoksykacji związków aromatycznych potwierdził z kolei zespół R o m e r o i wsp. [69], izolując szczep *Y. lipolytica* LPS 605 zdolny do biotransformacji bifenylu do 4-hydroksybifenylu i 3,4-dihydroksybifenylu oraz hydroksylacji dibenzofuranu [68]. U szczepu *Y. lipolytica* Y103 obserwowano z kolei zdolność do hydroksylacji fenolu [46]. Udowodniono także zdolność niektórych szczepów *Y. lipolytica* do detoksykacji 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) poprzez redukcję pierścienia aromatycznego oraz bezpośrednią redukcję grup nitrowych [36, 96].

5.3. Synteza białek enzymatycznych przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Nie bez znaczenia dla przyszłych komercyjnych zastosowań drożdży *Y. lipolytica* jest ich zdolność do syntezy zewnątrzkomórkowych enzymów, w tym m.in. proteaz: alkalicznej (AEP, EC 3.4.21 – *alkaline extracellular protease*) oraz kwaśnej (AXP, EC 3.4.23 – *acid extracellular protease*). Ich sekrecja regulowana jest w znacznej mierze przez pH środowiska, a wydajność produkcji AEP może wynosić nawet 2 g/dm^3 [12, 53, 81]. Istotne znaczenie odgrywa także synteza zewnątrzkomórkowej RNazy [22], zewnątrzkomórkowej fosfatazy [47], esteraz oraz kilku lipaz.

Aktywność lipolityczna drożdży *Y. lipolytica* została opisana po raz pierwszy przez P e t e r s a i N e l s o n a [62, 63], zaś geny kodujące białka o aktywności lipaz odkryto w ostatnim dziesięcioleciu. Wyróżnia się dwie frakcje lipaz *Y. lipolytica*: zewnątrzkomórkową oraz wewnątrzkomórkową (enzymy znajdujące się w cytozolu oraz związane ze strukturami ściany komórkowej). Lipazy i esterazy gatunku *Y. lipolytica* kodowane są przez rodzinę genów *LIP* (Tab. 1) [28, 29, 60].

Za główną zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną drożdży *Y. lipolytica* odpowiada gen *LIP2* kodujący proenzym lipazy Lip2p, składający się z 334 aminokwasów. Jego aktywacja następuje przez odcięcie odcinka 12 aminokwasów przez endoproteazę kodowaną przez gen *XP* R6. Lipaza Lip2p należy do rodziny lipaz „GX". To enzym *sn*-1,3-regiselektywny, a produktami reakcji hydrolizy przez nią katalizowanej są głównie 2-monoglicerydy. Podobnie jak lipazy ssaków, nie jest hamowana przez sole żółciowe, wykazuje stabilność przy niskich wartościach pH oraz optimum działania w zakresie pH 6,0–7,5 i w temperaturze 37°C [3, 29, 80]. F i c k e r s i wsp. [28] potwierdzili znaczącą rolę Lip2p w aktywności lipolitycznej gatunku *Y. lipolytica*. Nokaut genu *LIP2* spowodował spadek aktywności lipolitycznej modyfikowanego szczepu o ponad 97% w stosunku do szczepu dzikiego. Co ciekawe, białko enzymatyczne Lip2p nie potrzebuje pełnej glikozylacji, aby zachować znaczną część swojej aktywności [33], a B o r d e s i wsp. [17] sugerują, że mechanizm otwierania „wieczka" lipazy Lip2 jest dwuetapowy. Lipazę Lip2p charakteryzuje wysokie powinowactwo do estrów kwasu oleinowego, zaś lipazy Lip7p oraz Lip8p odpowiednio do estrów kwasu kapronowego (C6) oraz kwasu kaprynowego (C10). Drugą zasadniczą różnicą pomiędzy lipazą Lip2p a lipazami Lip7p i Lip8p jest lokalizacja ich aktywności. Pierwsze białko pod-

Tabela I
Geny kodujące białka o aktywności lipaz i esteraz u gatunku *Y. lipolytica*

Nazwa genu	Nazwa kodowanego białka	Aktywność enzymu	Źródło
LIP1	–	karboksyesteraza (EC 3.1.1.1)	[28]
LIP2	Lip2p	lipaza zewnątrzkomórkowa (EC 3.1.1.3)	[64, 65]
LIP3	–	karboksyesteraza (EC 3.1.1.1)	[28]
LIP6	–	karboksyesteraza (EC 3.1.1.1)	[28]
LIP7	Lip7p	lipaza związana ze ścianą komórkową (EC 3.1.1.3)	[29]
LIP8	Lip8p	lipaza związana ze ścianą komórkową (EC 3.1.1.3)	[28]
LIP9	Lip9	lipaza (EC 3.1.1.3)	[93]
LIP11	Lip11	regioselektywna lipaza (EC 3.1.1.3)	[43]
LIP12	Lip12	niespecyficzna lipaza (EC 3.1.1.3)	[43]
LIP14	Lip14	termostabilna lipaza (EC 3.1.1.3)	[42]

lega intensywnej sekrecji, podczas gdy dwa pozostałe w znacznej mierze pozostają związane ze strukturami ściany komórkowej [28, 64, 65].

Inne lipazy *Y. lipolytica* (Tab. 1) zostały sklonowane i scharakteryzowane, choć wiedza na ich temat jest nadal niewielka. Niewiele wiadomo także na temat lipaz wewnątrzkomórkowych tego gatunku znajdujących się w cytozolu. W ciałach lipidowych zidentyfikowano białko Tgl3, które scharakteryzowano wcześniej jako lipazę wewnątrzkomórkową u drożdży *S. cerevisiae*, ale jego funkcja nie została potwierdzona [6, 15].

6. Podsumowanie

Liczne badania laboratoryjne nad gatunkiem *Yarrowia lipolytica* prowadzone na całym świecie pozwoliły uzyskać duży zasób wiedzy na temat tych mikroorganizmów. Zsekwencjonowany genom i dość dobrze poznany metabolizm drożdży sprawia, że *Y. lipolytica* jest obecnie gatunkiem modelowym w licznych badaniach podstawowych z zakresu: sekrecji białek, biogenezy peroksysomów, badań nad kompleksem I łańcucha oddechowego, dimorfizmem, wykorzystaniem substratów hydrofobowych czy homeostazy lipidowej.

Przytoczone w niniejszym artykule przykłady ukazują, że potencjał zastosowań szczepów drożdży *Y. lipolytica* w różnych gałęziach przemysłu jest ogromny. Opisane technologie, na chwilę obecną w większości ograniczają się jednak do skali laboratoryjnej. Aby nabrały właściwego znaczenia należy podjąć działania w kierunku zwiększenia skali procesów i komercyjnej dostępności.

Piśmiennictwo

1. Alchihab M., Destain J., Aquedo M., Thonart P.: Production d'aromes de type lactone par des levures. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **14**, 681–691 (2010)
2. Alkasrawi M., Nandakumar R., Margesin R., Schinner F., Mattiasson B.: A microbial biosensor based on *Yarrowia lipolytica* for the off-line determination of middle-chain alkanes. *Biosens. Bioelectron*. **14**, 723–727 (1999)
3. Aloulou A., Puccinelli D., De Caro A., Leblond Y., Carriére F.: A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 1446–1456 (2007)
4. Amaral P.F., Lehocky M., Barros-Timmons A.M.: Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*, **23**, 867–877 (2006)
5. André A., Chatzifragkou A., Diamantopoulou P., Sarris D., Philippoussis A., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Papanikolaou S.: Biotechnological conversions of bio-dieselderived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng. Life Sci*. **9**, 468–478 (2009)
6. Athenstaedt K., Jolivet P., Boulard C., Zivy M., Negroni L., Nicaud J.M., Chardot T.: *Proteomics*, **6**, 1450–1459 (2006)
7. Bailey R., Madden K.T., Trueheart J.: Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. International Patent WO 2006/102342 A2 (2006)
8. Bailey R.B., Madden K.T., Trueheart J.: Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. International Patent WO 2008/042338 A2 (2008)
9. Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S.: Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **84**, 847–865 (2009)
10. Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C., Weisburg W.G.: Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J. Bacteriol.* **173**, 2250–2255 (1991)
11. Barth G., Künkel W.: Alcohol dehydrogenase (ADH) in yeast. II. NAD+–and NADP+–dependent alcohol dehydrogenases in *Saccharomycopsis lipolytica*. Z. *Allg. Mikrobiol*. **19**, 381–390 (1979)
12. Barth G., Gaillardin C.: Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 219–237 (1997)
13. Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.-M.: *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res*. **48**, 375–387 (2009)
14. Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res*. **48**, 375–387 (2009)
15. Beopoulos A., Chardot T., Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, **91**, 692–696 (2009)
16. Białecka-Florjańczyk E., Krzyczkowska J., Stolarzewicz I., Kapturowska A.: Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *J. Mol. Caalt. B-Enzym*. **74**, 241–245 (2012)
17. Bordes F., Barbe S., Escalier P., Mourey L., André I., Marty A., Tranier S.: Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophys. J.* **99**, 2225–2234 (2010)
18. Bourel G., Nicaud J.M., Nthangeni B., Santiago-Gomez P., Belin J.-M., Husson F.: Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehyde. *Enz. Microb. Technol*. **35**, 293–299 (2004)
19. Casaregola S., Neuvéglise C., Bon E., Gaillardin C.: Ylli, a non-LTR retrotransposon L1 family in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Biol. Evol*. **19**, 664–677 (2002)
20. Celińska E., Kubiak P., Białas W., Dziadas M., Grajek W.: *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenyloethanol producer. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **40**, 389–392 (2013)
21. Cervantes-Chávez J.A., Kronberg F., Passeron S., Ruiz-Herrera J.: Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet. Biol*. **46**, 390–399 (2009)
22. Cheng S.C., Ogrydziak D.M.: Extracellular RNase produced by *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol*. **168**, 581–589 (1986)
23. Cirigliano M.C., Carman G.M.: Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol*. **50**, 846–850 (1995)
24. Coelho M.A.Z., Amaral P.F.F., Belo I.: *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse (w) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, red. A. Méndez-Vilas, *Formatex*, 2010, s. 930–944.
25. Cruz J.M., Domínguez J.M., Domínguez H., Parajó J.C.: Dimorphic behaviour of *Debaryomyces hansenii* grown on barley bran acid hydrolyzates. *Biotechnol. Lett*. **22**, 605–610 (2000)
26. Cybulski K., Tomaszewska L., Rywińska A.: Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **11**, 5–14 (2012)

27. Dujon B., Souciet. J.L. i wsp.: Genome evolution in yeasts. *Nature,* **430**, 35–44 (2004)
28. Fickers P., Benetii P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M.: Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*. **5**, 527–543 (2005)
29. Fickers P., Marty A., Nicaud J.-M.: The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv*. **29**, 632–644 (2011)
30. Flores C.L., Rodriguez C., Petit T., Gancedo C.: Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Reviews.* **24**, 507–529 (2000)
31. Förster A., Jacobs K., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G.: Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **77**, 861–869 (2007)
32. Gaillardin C., Heslot H.: Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **28**, 161–174 (1988)
33. Grillitsch K., Daum G.: Triacylglicerol lipases of the yeast. *Front. Biol*. **6**, 219–230 (2011)
34. Groenewald M., Boekhout T., Neuveglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W.M., Wyss M.: *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol*. **40**, 187–206 (2014)
35. Holz M., Otto C., Kretzschmar A. Yovkova V., Aurich A., Pötter M., Marx A., Barth G.: Overexpression of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its effect on production of organic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1519–1526 (2007)
36. Jain M.R., Zinjarde S.S., Deobagkar D.D., Deobagkar D.N.: 2,4,6-Trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Mar. Poll. Bull*. **49**, 783–788 (2004)
37. Kawasse F.M., Amaral P.F., Rocha-Leão M.H., Amaral A.L., Ferreira E.C., Coelho M.A.: Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioproc. Biosyst. Eng*. **25**, 371–375 (2003)
38. Kerscher S., Durstewitz G., Casaregola S., Gaillardin C., Brandt U.: The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp. Funct. Genomics*. **2**, 80–90 (2001)
39. Kośmider A., Czaczyk K.: Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol*. **48**, 277–287 (2009)
40. Kreger-van Rij N. J. W., Veenhuis M.: Electron microscopy of septa in ascomycetous yeasts. *Ant. Van Leeuwenhoek*. **39**, 481–490 (1973)
41. Kruse K., Förster A., Juretzek T., Mauersberger S., Barth G.: Method for biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast *Yarrowia lipolytica*. Patent WO2004/009828. Technische Universität Drezno, Niemcy (2004)
42. Kumari A., Gupta R.: Extracellular expression and characterization of thermostable Lip8, Lip14 and Lip18, from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1733–1739. (2012)
43. Kumari A., Verma V. V., Gupta R.: Comparative biochemical characterization and in silico analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 with Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **28**, 3103–3111 (2012)
44. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T.: The yeasts: a taxonomic study, wyd. 5, Elsevier, 2011, tom 1.
45. Lasserre J. P., Nicaud J.-M., Pagot Y., Joubert-Caron R., Caron M., Hardouin J.: First complexomic study of alkane-binding protein complexes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Talanta,* **80**, 1576–1585 (2010)
46. Lee J.S., Kang E.J., Lee D.H., Bae K.S., Kim C.K.: Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol. *J. Microbiol. Biotechnol*. **11**, 112–117 (2001)
47. López M. C., Domínguez A.: Purification and properties of a glycoprotein acid phosphatase from the yeast form of *Yarrowia lipolytica*. *J. Basic Microb*. **28**, 249–263 (1988)
48. Maldonado P., Desmarquest J., Gaillardin C., Binet D.: Process for getting diploid *Candida lipolytica* starins for alpha-ketoglutarate fermentation. Patent USA nr 3930946. Institute Francaise du Petrole, Francja (1973)
49. Neuvéglise C., Chalvet F., Wincker P., Gaillardin C., Casaregola S.: Mutator-like element in the yeast *Yarrowia lipolytica* displays multiple alternative splicings. *Eukaryot. Cell*, **4**, 615–624 (2005)
50. Nicaud J.M., Thevenieau F., Le Dall M.T., Marchal R.: Production of dicarboxylic acids by improved mutant strains of *Yarrowia lipolytica*. Patent US 20100041115 A1. (2010)
51. Nicaud J.M.: *Yarrowia lipolytica*. *Yeast,* **29**, 409–418 (2012)
52. O'Shea D.G., Walsh P.K.: The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* NRRLy 2415: a study incorporating image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **53**, 316–322 (2000)
53. Ogrydziak D.M.: Yeast extracellular proteases. *Crit. Rev. Biotechnol*. **13**, 1–55 (1993)
54. Oh Y.S., Maeng J., Kim S.J.: Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **54**, 418–423, (2000)
55. Ohkuma M., Hwang C.W., Masuda Y., Nishida H., Sugiyama J., Ohta A., Takagi M.: Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. *Biosci. Biotech. Biochem*. **57**, 1793–1794 (1993)
56. Okui S., Uchiyama M. and Mizugaki M.: Metabolism of hydroxy fatty acids: 2. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by Genus *Candida*. *J. Biochem*. **54**, 536–540 (1963)
57. Otto C., Yovkova V., Barth G.: Overproduction and secretion of α-ketoglutaric acid by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **92**, 689–695 (2011)
58. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol*. **82**, 43–49 (2002)
59. Papanikolaou S., Aggelis G.: Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. **113**, 1052–1073 (2011)
60. Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leão M.H.M., Sant'Anna Jr. G.L.: Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett*. **22**, 71–75 (2000)
61. Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H., Sant'Anna G.L.: A stable lipase from *Candida lipolytica,* cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63**, 73–85 (1997)
62. Peters I.I., Nelson F.E.: Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol*. **55**, 581–591 (1948)
63. Peters I.I., Nelson F.E.: Preliminary characterization of the lipase of *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol*. **55**, 593–600 (1948)
64. Pignède G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.-M.: Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**, 2802–2810 (2000)
65. Pignède G., Wang H., Fudalej F., Seman M., Gaillardin C., Nicaud J.-M.: Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**, 3283–3289 (2000)
66. Robak M.: Studia nad wykorzystaniem octanu I wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Rozprawa habi-

litacyjna. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu Rozprawy CXCII, 422 (2002)
67. Rodrigues G, Pais C.: The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food Technol. Biotechnol.* **38**, 27–32 (1997)
68. Romero M.C., Hammer E., Cazau M.C., Arambarri A.M.: Isolation and characterization of biacrylic structure-degrading yeasts: hydroxylation potential of dibenzofuran. *Environ. Pollut*. **118**, 379–382 (2002)
69. Romero M.C., Hammer E., Cazau M.C., Arambarri A.M.: Selection of autochthonous yeast strains able to degrade biphenyl. *World J. Microb. Biot*. **17**, 591–594 (2001)
70. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A.: Antimicrobial and antiadhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloid. Surface. B.* **84**, 1–5 (2011)
71. Ruiz-Herrera J., Sentandreu R.: Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Microbiol*. **178**, 477–483 (2002)
72. Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W.: Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chem. Pap*. **62**, 239–246 (2008)
73. Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M.: High yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett*. **31**, 377–380 (2009)
74. Rywińska A., Rymowicz W., Marcinkiewicz M.: Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Electron. J. Biotechnol*. **13** (2010)
75. Rywińska A., Juszczyk P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W.: Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy*, **48**, 148–166 (2013)
76. Rywińska A., Tomaszewska L., Rymowicz W.: Erythritol biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast under various culture conditions. *Afr. J. Microbiol. Res*. **7**, 3511–3516 (2013)
77. Santiago-Gomez M.P., Thanh H.Y., De Coninck J. Cachon R., Kermasha S., Belin J.M., Gervais P., Husson F. Modeling hexanal production in oxido-reducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem*. **44**, 1013–1018 (2009)
78. Schmid-Berger N., Schmid B., Barth G.: Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **176,** 2477–2482 (1994)
79. Sharpe P.L., Ye R.W., Zhu Q.Q.: Carotenoid production in a recombinant oleaginous yeast. International Patent WO 2008/073367 A1 (2008)
80. Singh A.K., Mukhopadhyay M.: Overview of fungal lipase: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 486–520 (2012)
81. Spencer J.F., Ragout de Spencer A.L., Laluce C.: Non-conventional yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 147–156 (2002)
82. Tai M., Stephanopoulos G.: Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng*. **15**, 1–9 (2013)
83. Thevenieau F., Nicaud J.-M., Gaillardin C.: Applications of the Non-Conventional Yeast Yarrowia lipolytica (w) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, red. T. Satyanarayana, G. Kunze: Springer Netherlands, 2009, s. 589–613.
84. Tomaszewska L, Rywińska A, Gładkowski W.: Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 1333–1343 (2012)
85. Trindade J.R., Freire M.G., Amaral P.F.F., Coelho M.A.Z., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M.: Aging mechanisms of oil-in--water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **324**, 149–154 (2008)
86. Van der Walt J.P., von Arx J.A.: The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Anton. Leeuw.* **46**, 517–521 (1980)
87. Waché Y., Aguedo M., Nicaud J.M., Belin J.M.: Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **61**, 393–404 (2003)
88. Yarrow D.: Four new combinations in yeasts. *Anton. Leeuw.* **38**, 357–360 (1972)
89. Ye R.W., Sharpe P.L., Zhu Q.: Bioengineering of Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* for Lycopene Production. Microbial Carotenoids From Fungi. *Method. Mol. Biol.* **898**, 153–159 (2012)
90. Yilmaz F., Ergene A., Yalcin E., Tan S.: Production and characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from milk factory wastewaters. *Environ. Technol*. **30**, 1397–1404 (2009)
91. Yin X., Madzak C., Du G., Zhou J., Chen J.: Enhanced alpha--ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1527–1537 (2012)
92. Yu Z., Du G., Zhou J, Chen J.: Enhanced a-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresour. Technol.* **114**, 597–602 (2012)
93. Zhao H., Zheng L., Wang X., Liu Y., Xu L., Yan Y.: Cloning, expression and characterization of new lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett*. **33**, 2445–2452 (2011)
94. Zhou J., Yin X., Madzak C., Du G., Chen J.: Enhanced a-ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J Biotechnol.* **161**, 257–264 (2012)
95. Zhou J., Zhou H., Du G., Liu L., Chen J.: Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for α-ketoglutaric acid production. *Lett. Appl. Microbiol*. **51**, 264–271 (2010)
96. Ziganshin A.M., Gerlach R., Borch T., Naumov A.V., Naumova R.P.: Production of eight different hydride complexes and nitrite release from 2,4,6-trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol*. **73**, 7898–7905 (2007)
97. Zinjarde S.S.: Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem*. **152**, 1–10 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 44–52
http://www.pm.microbiology.pl

GRZYBY Z RODZAJU *SCOPULARIOPSIS* – MAŁO ZNANE PATOGENY CZŁOWIEKA

Magdalena Skóra[1], Jacek Bielecki[2], Małgorzata Bulanda[3], Anna Barbara Macura[1], Tomasz Jagielski[2*]

[1] Zakład Mykologii, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
[2] Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
[3] Zakład Epidemiologii Zakażeń, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wpłynęło we wrześniu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Pozycja taksonomiczna. 3. Morfologia. 4. Występowanie. 5. Znaczenie w medycynie człowieka. 5.1. Grzybice skóry i paznokci. 5.2. Inne postacie zakażeń. 6. Diagnostyka zakażeń. 7. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze. 8. Leczenie. 9. Podsumowanie. 10. Piśmiennictwo

Fungi of the genus *Scopulariopsis* – ill-defined human pathogens

Abstract: The genus *Scopulariopsis* accommodates more than 30 species of mitosporic moulds. Their natural habitat is the soil, where they live as saprophytes and are involved in the decomposition of organic matter. However, some members of the *Scopulariopsis* genus may cause opportunistic infections in humans. Superficial skin lesions and onychomycosis in particular are the most predominant clinical manifestations. Much rarer are subcutaneous, deep tissue and disseminated infections, most of which occur in immunocompromised individuals and are associated with high mortality. Treatment of *Scopulariopsis* infections is difficult and usually empirically-based, one reason for this being resistance of *Scopulariopsis* spp. to a broad spectrum of antifungal agents. Identification of pathogenic *Scopulariopsis* spp. still largely relies on the phenotype-based methods, employing both morphological and biochemical criteria. These methods require highly qualified personnel and are usually considered as slow and laborious, often leading to misidentification. Therefore, molecular diagnostic methods are preferred, since they provide rapid, high-throughout, unambiguous and highly specific identification of fungal pathogens. Earlier attempts to develop assays for detecting *Scopulariopsis* spp. resulted in limited success. These assays, almost exclusively based on the hypervariable regions of the large subunit (LSU) rRNA, often produce inconclusive results and, more importantly, lack specificity, being unable to discriminate between different *Scopulariopsis* spp. Hence, currently available molecular methods do not allow inter- and intra-species differentiation of *Scopulariopsis* fungi.

1. Introduction. 2. Taxonomic position. 3. Morphology. 4. Distribution. 5. Significance in human medicine. 5.1. Skin and nail mycoses. 5.2. Other forms of infections. 6. Diagnosis of infections. 7. Antifungal susceptibility. 8. Treatment. 9. Summary. 10. References

Słowa kluczowe: chorobotwórczość, identyfikacja, *Scopulariopsis*, *Scopulariopsis brevicaulis*, wrażliwość na leki
Key words: identification, pathogenicity, sensitivity to drugs, *Scopulariopsis*, *Scopulariopsis brevicaulis*

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost częstości zakażeń grzybami w populacji ludzkiej. Dotyczy to przede wszystkim grzybic oportunistycznych, tzn. wywoływanych przez grzyby, które współtworzą fizjologiczną mikrobiotę człowieka lub bytują w środowisku naturalnym jako saprotrofy, a które w pewnych warunkach (gł. depresji układu immunologicznego) nabierają cech patogennych i wywołują objawowe zakażenia. Przyczyn rosnącej liczby grzybic oportunistycznych należy szukać m.in. w powiększającej się grupie chorych z upośledzoną, w różnym stopniu, odpornością komórkową lub humoralną. To z kolei ma związek z coraz częściej notowanymi chorobami nowotworowymi, zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi, ale także coraz częstszym wykonywaniem inwazyjnych zabiegów medycznych, czy stosowaniem agresywnych metod terapii.

Patogeny oportunistyczne z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus* są najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń grzybiczych u ludzi. Coraz częściej opisuje się jednak przypadki grzybic wywołane przez grzyby uważane jeszcze do niedawna za niepatogenne. Mikroorganizmy te określane są obecnie angielskim terminem „emerging pathogens". Do grupy tej należą grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*, którego charakterystyka jest tematem niniejszego artykułu.

2. Pozycja taksonomiczna

Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* należą do grzybów strzępkowych, wytwarzających strzępki przejrzyste (hyaline moulds) lub ciemnopigmentowe (dematiaceous moulds). Tradycyjna systematyka zalicza rodzaj *Scopulariopsis* do rodziny *Microascaceae*, rzędu *Microascales*, podklasy *Hypocreomycetidae*, klasy *Sordario-*

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 55 41 312; fax: 22 55 41 402; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

mycetes, podtypu *Pezizomycotina*, typu *Ascomycota* w królestwie *Fungi* [58].

Rodzaj *Scopulariopsis* liczy kilkadziesiąt gatunków[1]. Jednym z pierwszych wykrytych gatunków był *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier (gatunek typowy dla rodzaju), opisany przez Saccardo w 1882 roku jako *Penicillium brevicaule*. Nazwa *P. brevicaule* Sacc. (1882), a także nazwy *Monilia penicillioides* Delacr. (1897), *P. brevicaule var. hominis* Brumpt & Langeron (1910), *Acaulium insectivorum* Sopp (1912) są synonimami nazwy *S. brevicaulis* [58].

Nazwa rodzajowa *Scopulariopsis* określa postać grzyba rozmnażającą się bezpłciowo (postać anamorficzna) za pomocą jednokomórkowych zarodników (amerokonidia) wytwarzanych przez wyspecjalizowane komórki zwane annelidami. Dla niektórych gatunków, tj. *S. brevicaulis*, *S. candida*, *S. cinerea*, *S. paisii*[2], *S. soppii*, *S. trigonospora* opisano formy rozmnażające się płciowo (formy teleomorficzne), wytwarzające zarodniki workowe (askospory). Postacie te zaklasyfikowano do rodzaju *Microascus*, tj. kolejno: *Microascus brevicaulis*, *M. manginii*, *M. cinereus*, *M. cirrosus*, *M. soppii*, *M. trigonosporus var. trigonosporus* [58].

W dostępnej literaturze niewiele jest informacji dotyczących filogenetyki i ewolucji tych grzybów. Badaniom filogenetycznym grzybów z rodzaju *Scopulariopsis* poświęcono jak dotąd tylko jedno wnikliwe opracowanie. Issakainen i wsp. [37] podjęli próbę ustalenia pokrewieństw genetycznych w obrębie rodzaju *Scopulariopsis* (9 gatunków *Scopulariopsis* i 14 gatunków *Microascus*), w oparciu o analizą sekwencji (350 pz) w obrębie dużej podjednostki rDNA. Wykazano wówczas, że większość patogennych gatunków (m.in. *S. asperula*, *S. flava*, *S. fusca*, *S. koningii*, *S. brevicaulis*) tworzy wspólną grupę (klad), arbitralnie nazwaną MmC (*Microascus manginii Clade*).

3. Morfologia

Kolonie *Scopulariopsis* w zależności od gatunku mogą mieć barwę białą, płową, brązową lub czarną. Są puszyste, aksamitne, nieco sznurowate. Nie wytwarzają synnemata. Konidiofory (struktury zarodnikotwórcze) są proste, krótkie, często rozgałęzione, jasne. Komórki zarodnikotwórcze (annelidy) mają kształt ampułkowaty do cylindrycznego i wydłużają się z pierścieniowatymi strefami, na których wytwarzane są zarodniki. Mogą występować pojedynczo lub w skupiskach, na szczycie konidioforu, a także na niewyspecjalizowanych strzępkach. Zarodniki są kuliste, jajowate, maczugowate, w kształcie pocisku, ścięte u podstawy, gładkościenne, kropkowane lub brodawkowate, przejrzyste lub jasnobrązowe. Układają się w suche, bazypetalne łańcuchy [3, 21, 47].

Gatunek typowy – *S. brevicaulis*, będący równocześnie najczęstszą przyczyną zakażeń u ludzi, tworzy początkowo kolonie białawe, które szybko przybierają barwę orzechową, różowobrązową lub żółtawobrązową. W środku kolonii może powstawać kępka białych strzępek. Są puszyste lub filcowate (rys. 1A). Spód kolonii może być płowy, kremowy lub brązowawy (rys. 1B). Annelidy występują na szczycie odgałęzień konidioforu lub na niewyspecjalizowanych strzępkach, pojedynczo lub w skupiskach przypominających szczotkę. Są cylindryczne, z lekko nadętą podstawą. Zarodniki są półprzejrzyste, kuliste, owalne lub w kształcie pocisku. Mają ściętą podstawę i zwykle są szorstkościenne. Tworzą łańcuchy (rys. 2). U teleomorfy (*M. brevicaulis*) można zaobserwować owocniki workowe o typie perytecjum, które są kuliste, z krótką szyją, porowate, czarne. Wewnątrz owocników znajdują się okrągławe worki zawierające po 8 askospor. Zarodniki workowe są szerokie, nerkowate, gładkościenne, w skupiskach pomarańczowe [3, 21, 47][3].

4. Występowanie

Grzyby należące do rodzaju *Scopulariopsis* izolowano m.in. z gleby [64, 83], powietrza (zarówno wewnątrz budynków jak i na zewnątrz) [1, 53], wody [4], a także z różnych produktów spożywczych, jak ziarno [68] czy orzechy [25]. Grzyby *Scopulariopsis* kolonizują również zwierzęta i ludzi, zwłaszcza tkanki zawierające keratynę – pióra, rogi, kopyta, skórę, paznokcie, włosy [7, 45, 52].

Gatunki *Scopulariopsis* występują kosmopolitycznie. Izolowano je m. in. w różnych krajach europejskich, w Afryce, Azji, Ameryce Południowej [7, 25, 60, 65].

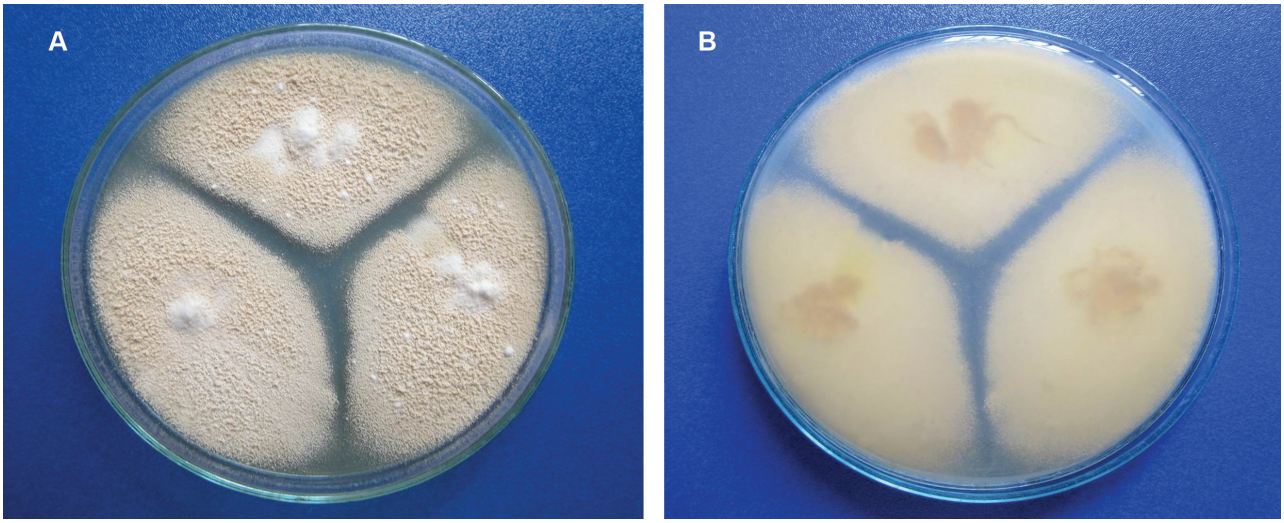
5. Znaczenie w medycynie człowieka

Do niedawna grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* traktowano jedynie jako potencjalny czynnik etiologiczny dermato- i onychomykoz. Obecnie grzyb ten zaliczany

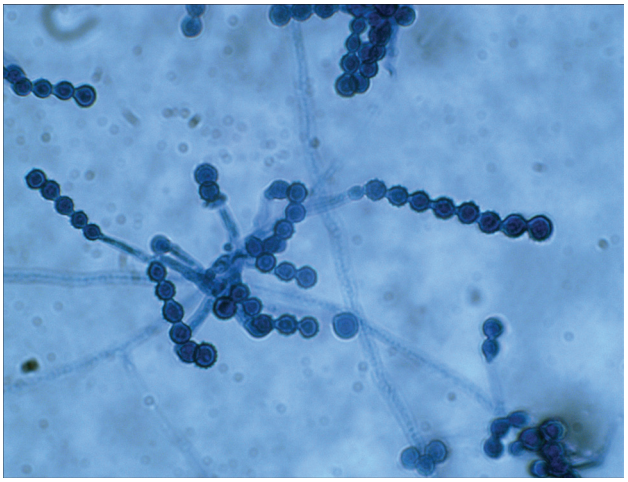
[1] Różne źródła podają różną liczbę gatunków opisanych w rodzaju *Scopulariopsis*. W bazie Mycobank [58] nazwie *Scopulariopsis* przypisano 93 powiązane rekordy, którym odpowiadają 93 różne nazwy gatunkowe, z czego część oznaczonych jest jako nieważna. Sandoval-Denis i wsp. [70] przywołują natomiast liczbę około 40 zatwierdzonych gatunków.

[2] Według bazy Mycobank [58] obecna nazwa to *Torula paisii* (teleomorfa: *Microascus cirrosus*), ale nazwa *S. paisii* jest dla niej synonimem.

[3] Morfologia poszczególnych gatunków *Scopulariopsis*, zwłaszcza wygląd makroskopowy kolonii, zależy w dużej mierze od zastosowanego podłoża hodowlanego.



Rys. 1. Kolonie *Scopulariopsis brevicaulis* na podłożu CYA (Czapek Yeast Agar) widziane od góry (A) i spodu (B). Fot. Magdalena Skóra



Rys. 2. Konidiofory *Scopulariopsis brevicaulis* z szorstkościennymi, ściętymi u podstawy zarodnikami. Fot. Magdalena Skóra

jest do tzw. „*emerging pathogens*" – nowo wyłaniających się patogenów, zdolnych do wywołania także poważnych zakażeń podskórnych i głębokich.

Grzyby *Scopulariopsis* są organizmami oportunistycznymi, powodującymi zakażenia przede wszystkim u osób, u których wystąpi czynnik sprzyjający określonej postaci grzybicy. Większość gatunków *Scopulariopsis* zaliczana jest do I. klasy bezpieczeństwa pracy z mikroorganizmami (BSL-1), niektóre natomiast, w tym *S. brevicaulis*, do klasy II. (BSL-2) [21].

Opisano przypadki zakażeń wywołane przez *S. acremonium*, *S. americana*, *S. brevicaulis*, *S. brumptii*, *S. candida*, *S. flava*, *S. fusca*, *S. hominis*, a także przez teleomorfy gatunków *S. cinerea*, *S. paisii* i *S. trigonospora* czyli *M. cinereus*, *M. cirrosus* i *M. trigonosporus* [36, 59, 70]. Gatunkiem *Scopulariopsis* najczęściej identyfikowanym jako przyczyna zakażeń u ludzi jest *S. brevicaulis*. Grzybice wywołane przez inne gatunki *Scopulariopsis* opisywane są kazuistycznie. W jednej z nielicznych prac dotyczących epidemiologii zakażeń *Scopulariopsis*, autorstwa I s s a k a i n e n i wsp. [36], poświęconej występowaniu *Scopulariopsis* i *Scedosporium* w próbkach paznokci i skóry, autorzy na podstawie danych uzyskanych z dwóch wiodących fińskich laboratoriów wykazali, że za 80% przypadków zakażeń *Scopulariopsis* odpowiedzialny był gatunek *S. brevicaulis*, za 10% *S. candida*, a za 5% *S. fusca*. Pozostałe 5% przypadków zakażeń spowodowane było m. in. przez *S. acremonium*, *S. brumptii* i teleomorfy z rodzaju *Microascus*.

5.1. Grzybice skóry i paznokci

Zakażenia wywołane przez przedstawicieli *Scopulariopsis* zazwyczaj dodytczą tkanek bogatych w kreatynę. Grzybice skórne mają różną lokalizację (m.in. kończyny górne i dolne, tułów [36]), ale występują sporadycznie, natomiast onychomykozy o etiologii *Scopulariopsis* są jednymi z najczęstszych postaci pleśnic paznokci [8, 10, 27, 56, 57]. Grzyby *Scopulariopsis* odpowiadają za około 1–5% wszystkich grzybic paznokci [36] i około 1–10% onychomykoz wywołanych przez grzyby pleśniowe [48]. Opisuje się zarówno dalszą i boczną onychomykozę podpaznokciową (DLSO – distal and lateral subungual onychomycosis), jak i bliższą onychomykozę podpaznokciową (PSO – proximal subungual onychomycosis) [36, 48, 82]. Zmiany chorobowe zwykle dotyczą paznokci stóp i najczęściej ograniczone są jedynie do paznokcia palucha. Zakażenia paznokci rąk opisywane są bardzo rzadko [36, 57].

Zakażenia skóry i paznokci grzybami z rodzaju *Scopulariopsis* mogą dotyczyć zarówno osób w immunosupresji, jak i immunokompetentnych. Immunosupresja jest wymieniana jako czynnik predysponujący do grzybicy paznokci spowodowanej przez *Scopulariopsis* [36,

56], ale brak badań które wskazywałyby, że zakażenia te rzeczywiście częściej występują u osób z upośledzoną odpornością niż u pacjentów ze sprawnym systemem immunologicznym. Czynnikami sprzyjającymi zakażeniom powierzchniowym *Scopulariopsis* są także: uszkodzenie płytki paznokciowej i skóry, inne schorzenia dermatologiczne (np. łuszczyca), a także choroby ogólnoustrojowe jak cukrzyca [36, 56]. Ponadto grzybice paznokci o etiologii *Scopulariopsis* występują częściej u osób w wieku średnim i podeszłym, a także u osób z zaburzeniami krążenia, zwłaszcza w kończynach dolnych [80].

5.2. Inne postacie zakażeń

Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*, kiedyś uważane jedynie za nieszkodliwe saprotrofy lub czynniki etiologiczne wyłącznie grzybic paznokci, dzisiaj mogą stanowić realne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. W literaturze medycznej można znaleźć opisy przypadków zakażeń *Scopulariopsis* dotyczące m.in. następujących lokalizacji: rogówki [51], wnętrza gałki ocznej [5], siatkówki i naczyniówki [79], ucha [9], zatok [28], jamy szczękowej [67], przegrody nosowej [39], mózgu [33], płuc [72], oskrzeli [89], wsierdzia [42], a także grzybic rozsianych [85].

Grzybice tkanek nieskeratynizowanych spowodowane przez *Scopulariopsis* spp. występują zazwyczaj u osób z istotnym czynnikiem predysponującym do tego typu zakażeń, czyli głównie z zaburzeniami immunologicznymi lub po inwazyjnych zabiegach leczniczych. Odnotowywano je m.in. u pacjentów z białaczkami [89], chłoniakami [46], chorych na AIDS [73], po transplantacjach [87], chemioterapii [28], wszczepieniu sztucznych zastawek serca [42], a także u osób z cukrzycą [38].

6. Diagnostyka zakażeń

W klasycznej diagnostyce mykologicznej, opartej na analizie cech fenotypowych, identyfikacja grzybów *Scopulariopsis* opiera się przede wszystkim na ocenie wyglądu kolonii wyrosłych na określonych podłożach hodowlanych oraz szczegółów morfologicznych konidioforów, komórek zarodnikotwórczych i zarodników, obserwowanych w obrazie mikroskopowym. Klucze do oznaczania ważniejszych gatunków *Scopulariopsis* na podstawie ich morfologii dostępne są w atlasach grzybów o znaczeniu klinicznym [3, 21, 47]. Należy mieć jednak na uwadze, że metody te, z powodu podobieństwa morfologii różnych grzybów, mogą dawać niejednoznaczne wyniki. Co więcej, wymagają pozyskania kultury drobnoustroju i przez to są wydłużone o czas trwania hodowli (od kilku dni do nawet kilku tygodni). Dlatego coraz częściej zwraca się ku metodom molekularnym, które pozwalają na znaczne skrócenie procedury diagnostycznej i umożliwiają wiarygodną identyfikację czynnika zakaźnego już na wczesnym etapie choroby.

Metody molekularne stosowane w diagnostyce i epidemiologii zakażeń grzybiczych oparte są, w ogromnej większości, na analizie polimorfizmu wybranych markerów genetycznych, tj. unikalnych sekwencji DNA, specyficznych dla rodziny, rodzaju, gatunku, a nawet szczepu. Regionami skupiającymi najwięcej sekwencji wykorzystywanych w funkcji markerów genetycznych w diagnostyce i taksonomii grzybów, w tym także grzybów pleśniowych, są operony rDNA. Zlokalizowane są tu geny kodujące elementy strukturalne (rRNA) małej (SSU – small subunit) i dużej (LSU – large subunit) podjednostki rybosomu oraz rozdzielające je tzw. wewnętrzne sekwencje niekodujące (ITS – internal transcribed spacer) (rys. 3). Największe znaczenie dla diagnostyki molekularnej grzybic mają regiony ITS, gdyż charakteryzują się dużą zmiennością międzygatunkową. W identyfikacji gatunkowej oceniana jest też nierzadko wariantywność regionu bliższego końcowi 5' genu kodującego rRNA (28S) dużej podjednostki, w którym zawierają się trzy zmienne domeny (D1, D2, D3).

Rys. 3. Schemat organizacji operonu rDNA

Większość metod molekularnych stosowanych w diagnostyce grzybów chorobotwórczych, opartych o analizę operonu rDNA, łączy użycie łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR). Technika PCR umożliwia, przy odpowiednio zaprojektowanych starterach, amplifikację dowolnych sekwencji DNA, specyficznych dla określonych taksonów grzybów. Poszczególne metody diagnostyki molekularnej różnią się przede wszystkim sposobem analizy otrzymanego produktu PCR. Polega ona zwykle na ustaleniu jego wzorów restrykcyjnych (technika PCR-RFLP – restriction fragment length polymorphism), hybrydyzacji ze specyficznymi sondami i ostatnio, coraz częściej, oznaczeniu jego sekwencji nukleotydowej (PCR-sequencing). Metody te, w różny sposób modyfikowane, są z powodzeniem stosowane, nierzadko w formie komercyjnych zestawów diagnostycznych, do wykrywania i identyfikacji drożdży i grzybów drożdżopodobnych [50, 66, 71, 23], grzybów dimorficznych [49], dermatofitów [40, 88] oraz niektórych grzybów pleśniowych, głównie z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* [14, 22, 32, 35]. Co więcej, znane są metody pozwalające na równoległą detekcję grzybów reprezentujących niekiedy bardzo odległe grupy taksonomiczne. Przy tym oznaczenie do gatunku możliwe

jest dzięki analizie sekwencyjnej lub zastosowaniu technologii mikromacierzy DNA [6, 76, 86]. Ogromną zaletą wielu spośród przywołanych wyżej metod jest możliwość ich stosowania bezpośrednio w materiale klinicznym, co w istotny sposób skraca czas trwania postępowania diagnostycznego [6, 23, 76, 86, 88].

W literaturze przedmiotu, dane dotyczące diagnostyki molekularnej grzybów z rodzaju *Scopulariopsis* są niezwykle skąpe. Jednocześnie brak jakichkolwiek informacji na temat technik genetycznych umożliwiających różnicowanie poszczególnych gatunków w obrębie rodzaju, a tym bardziej różnicowanie wewnątrzgatunkowe (na poziomie szczepów). Wśród nielicznych prac z zakresu molekularnej diagnostyki różnicowej zakażeń grzybiczych, w których wymieniane są grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*, jedną z najwcześniejszych jest opracowanie S a n d h u i wsp. [69], gdzie przy użyciu uniwersalnych starterów wykrywano zmienny region genu 28S rDNA w genomie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych. Analiza sekwencyjna amplifikowanego regionu była podstawą różnicowania gatunkowego. W ten sposób oznaczono pojedyncze szczepy reprezentujące dwa gatunki *Scopulariopsis*, tj. *S. brevicaulis* i *S. brumptii*. Nie udało się natomiast zaprojektować sond DNA specyficznych dla obu gatunków. Konstrukcję sondy specyficznej dla *S. brevicaulis* podali H s i a o i wsp. [35], choć jej użyteczność oceniano w oparciu jedynie o 4 szczepy referencyjne *S. brevicaulis*. W innej pracy, H a l l i wsp. [32] weryfikowali oznaczenie metodą konwencjonalną wybranych grzybów chorobotwórczych, reprezentujących różne rodzaje, przy pomocy komercyjnego zestawu MicroSeq D2 LSU rDNA (Applied Biosystems), którego zasada opiera się na analizie sekwencyjnej domeny D2 w obrębie genu 28S rDNA, a następnie porównaniu wyników z bazą danych zdeponowanych w bibliotece MicroSeq D2. Dla 4 spośród 5 badanych szczepów *Scopulariopsis* sp., wynik identyfikacji obu metodami był zbieżny (*S. koningii*). Jeden szczep wcześniej oznaczony jako *S. brumptii* został metodą genetyczną sklasyfikowany jako *Penicillium rubrum* [32]. W 2006 roku K a r d j e v a i wsp. [44] przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych starterów, zaproponowali protokół PCR wykrywający fragment (336 pz) genu kodującego 28S rRNA, specyficzny dla rodzaju *Scopulariopsis*. W istocie, specyficzność PCR była szersza, obejmując większość grzybów sytuujących się w klasie *Sordariomycetes*. Wszystkie (13) badane szczepy *Scopulariopsis* sp. dały pozytywny wynik PCR. Ponadto, reakcja była dodatnia dla 6 próbek klinicznych (dla 4 z nich hodowla na obecność *Scopulariopsis* sp. była ujemna). Jednak użyta metoda nie pozwalała na różnicowanie gatunkowe. Identyczną sekwencję amplifikowanego fragmentu, jak tę otrzymaną we wszystkich 19 reakcjach, wykrywa się w 3 różnych gatunkach *Scopulariopsis*: *S. brevicaulis*, *S. koningii* i *M. manginii* (anamorfa: *S. candida*). Ponownie fragmentu genu kodującego LSU rRNA jako markera molekularnego w PCR dla wykrywania grzybów powiązanych etiologicznie z grzybicami paznokci (i to bezpośrednio w materiale klinicznym) użyli M o n o d i wsp. [55], a następnie B o n t e m s i wsp. [11]. Zaproponowany algorytm identyfikacji zakładał amplifikację fragmentu genu 28S rDNA przy pomocy 3 par starterów, specyficznych dla grzybów z rodzajów *Candida* (I), *Fusarium* (II), a także dermatofitów i grzybów strzępkowych nie należących do dermatofitów, włączając grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Mucor* oraz *Scopulariopsis* (III), a następnie analizę restrykcyjną otrzymanego amplikonu przy użyciu 2 enzymów restrykcyjnych, tj. *Rsa*I i *Hinf*I. Jednak wyniki uzyskane tą metodą (PCR-RFLP) nie zawsze pokrywały się z wynikami identyfikacji metodą konwencjonalną (hodowla). Czyli na przykład, spośród 17 szczepów oznaczonych jako *Scopulariopsis* sp. w hodowli, 12 (71%) zostało podobnie oznaczonych metodą PCR-RFLP [24]. W takich rozbieżnych przypadkach, rozstrzygające były wyniki analizy sekwencyjnej. Nowy protokół PCR (tzw. nested PCR) pozwalający wykrywać w materiale pobranym od pacjentów sekwencję (168 pz) specyficzną dla *S. brevicaulis* opisali E b i h a r a i wsp. [24]. Jednak stosując tę metodę zidentyfikowano tylko jeden szczep *S. brevicaulis*, co oznacza, że dla oceny jej skuteczności potrzeba znacznie większej liczby próbek klinicznych, względnie kultur tego grzyba z próbek klinicznych [24]. Technikę „nested PCR", której molekularnym celem były regiony ITS, wykorzystano do identyfikacji grzybów, w tym szczepów *S. brevicaulis*, w próbkach pochodzących z naturalnych cieków wodnych [63].

Stosunkowo niedawno opisano nową technikę umożliwiającą różnicowanie najważniejszych grzybów odpowiedzialnych za zakażenia paznokci, włączając grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*. Technika ta, zwana analizą polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (T-RFLP) polega na amplifikacji LSU rDNA przez PCR, restrykcji otrzymanych amplikonów przy pomocy odpowiednio dobranych enzymów restrykcyjnych, a następnie detekcji wyznakowanych (dzięki wyznakowaniu jednego ze starterów barwnikiem fluorescencyjnym) terminalnych fragmentów restrykcyjnych. Charakterystyczny wzór prążków (fingerprint) oraz intensywność ich świecenia pozwala zdefiniować czynnik etiologiczny. Metoda ta ma szczególne znaczenie w identyfikacji zakażeń heterogennych (mieszanych) [84].

Jak widać z powyższego przeglądu, tylko analiza sekwencyjna regionów z operonu rDNA, umożliwiała, choć w ograniczonym stopniu, identyfikację grzybów *Scopulariopsis*. Technika „PCR sequencing" uważana jest za najbardziej wiarygodną metodę diagnostyczną.

Niemniej posiada swoje ograniczenia; wynik identyfikacji zależy tutaj od obranego markera genetycznego (stopnia jego polimorfizmu, stabilności genetycznej) oraz dostępności i zasobności baz danych, w których zdeponowane sekwencje służą jako materiał porównawczy dla sekwencji ustalanych w badaniu własnym. W przypadku *Scopulariopsis* spp., analizy sekwencyjne koncentrowały się niemal wyłącznie na różnych regionach operonu rDNA. Jednak jak wskazują wyniki przytoczonych prac, analiza sekwencji rDNA nie pozwala na różnicowanie międzygatunkowe. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez J a g i e l s k i e g o i wsp. [41, dane niepublikowane], oparte o analizę sekwencyjną regionów ITS (1 i 2) dla 78 szczepów reprezentujących 30 różnych gatunków *Scopulariopsis* i *Microascus*. Pewne rozwiązanie może stanowić połączona analiza sekwencyjna dla dwóch lub więcej genetycznych loci. Rozważane są tu przede wszystkim tzw. geny metabolizmu podstawowego (house-keeping genes), które, z różnym powodzeniem, stosowane były jako markery genetyczne w identyfikacji grzybów, w ich różnych rangach taksonomicznych; są to geny *EF1α*, *TUB*, *CHS-1*, *RPB1* i RPB2, kodujące, odpowiednio, czynnik elongacji translacji 1α, β-tubulinę, syntazę chitynową 1, oraz podjednostki (1 i 2) polimerazy RNA II [54]. Badania nad zastosowaniem kombinowanej analizy sekwencyjnej genów metabolizmu podstawowego dla opracowania nowego algorytmu identyfikacji gatunkowej grzybów *Scopulariopsis* prowadzi zespół dr. T. Jagielskiego z Uniwersytetu Warszawskiego.

W ostatnim czasie coraz większą popularność w diagnostyce mikrobiologicznej, w tym także mykologicznej, zyskują techniki oparte na spektrometrii mas. Podstawową zasadą jest tutaj wytworzenie, rozdział i detekcja zjonizowanych składników chemicznych komórki (biomolekuł, gł. białek), w funkcji stosunku ich masy do ładunku. Taką nową techniką analityczną wykorzystującą spektrometrię mas jest technika MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) umożliwiająca szybką i precyzyjną analizę profilów białkowych różnych drobnoustrojów. Identyfikacja metodą MALDI-TOF polega na porównaniu widma masowego białek szczepu badanego z widmami wzorcowymi drobnoustrojów, zdeponowanymi w bazie danych. Optymalizację parametrów techniki MALDI-TOF dla celów rutynowej identyfikacji grzybów podjęli N o r m a n d i wsp. [61]. W opracowanych przez nich bibliotekach widm białkowych szczepów referencyjnych znalazły się także widma 3 szczepów *S. brevicaulis*. Obecnie, badania nad ustaleniem profilów białkowych, metodą MALDI-TOF MS, dla różnych gatunków *Scopulariopsis* prowadzi, we współpracy z Wolnym Uniwersytetem Berlina, zespół dr. T. Jagielskiego.

Rozpoznawanie powierzchniowych zakażeń wywołanych przez grzyby należące do rodzaju *Scopulariopsis* dokonywane jest na podstawie wstępnego rozpoznania klinicznego grzybicy, potwierdzonego następnie w badaniu mikrobiologicznym, obejmującym tradycyjne metody mikroskopowe i hodowlane, a także techniki molekularne. Należy pamiętać, że jednokrotne stwierdzenie *Scopulariopsis* spp. w próbkach pobranych ze zmienionej chorobowo skóry lub paznokci nie jest równoznaczne z zakażeniem, ponieważ grzyb ten może kolonizować skórę i paznokcie nie wywołując zmian chorobowych lub może być zanieczyszczeniem materiału klinicznego lub hodowli. W przypadku stwierdzenia w materiałach klinicznych obok *Scopulariopsis* innych grzybów, uchodzących za niekwestionowane czynniki etiologiczne grzybic powierzchniowych, tj. dermatofitów i grzybów z rodzaju *Candida*, pleśń ta traktowana jest zazwyczaj jako wtórny saprotrof [36].

Inwazyjne zakażenia wywołane przez grzyby *Scopulariopsis*, podobnie jak inne inwazyjne grzybice, nie dają charakterystycznych objawów klinicznych, w związku z czym do potwierdzenia zakażenia niezbędne jest wykonanie badań laboratoryjnych. W badaniach wykorzystuje się zarówno metody mikroskopowe i hodowlane, metody immunologiczne (w celu wykluczenia zakażenia przez inny niż *Scopulariopsis* patogen, dla którego dostępny jest test komercyjny, np. *Candida*, *Aspergillus*), badania histopatologiczne, a także metody biologii molekularnej.

6. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze

Dotychczas niewiele uwagi poświęcono wrażliwości grzybów *Scopulariopsis* na antymykotyki. Zdecydowana większość dostępnych w literaturze medycznej informacji dotyczy gatunku *S. brevicaulis*, który, jak wskazują przeprowadzone badania, jest oporny *in vitro* na amfoterycynę B, 5-fluorocytozynę, flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, worykonazol, gdyż większość szczepów wykazuje wysokie wartości MIC (minimal inhibitory concentration) dla tych leków [2, 13, 16–19, 78]. Najlepsze działanie przeciwgrzybicze w stosunku do *S. brevicaulis* wykazują amorolfina, cyklopiroks i terbinafina; wartości MIC dla tych leków wynosiły odpowiednio 0,01–0,5 mg/L [15, 43, 77], 0,125–10 mg/L [29, 43, 62, 77] i 0,01–> 16 mg/L [12, 16, 17, 26]. Informacje te potwierdzają badania przeprowadzone przez S k ó r ę i M a c u r ę [75] oraz S k ó r ę i wsp. [74].

7. Leczenie

W terapii grzybic paznokci najczęściej stosuje się ogólnie terbinafinę i itrakonazol [20, 30, 31, 34, 81], a także miejscowo natamycynę [81]. Przypadki zakażeń inwazyjnych najczęściej leczone są amfoterycyną B,

a także kaspofunginą, itrakonazolem i worykonazolem, w połączeniu z chirurgicznym oczyszczeniem zmienionej chorobowo tkanki.

Leczenie zakażeń spowodowanych przez grzyby *Scopulariopsis* może być mało skuteczne z powodu niskiej wrażliwości *in vitro* tych grzybów na większość dostępnych antymykotyków. Grzybice inwazyjne, pomimo wdrażania niejednokrotnie różnych opcji terapeutycznych często kończą się zgonem.

Dotychczas nie opracowano optymalnych algorytmów leczenia zakażeń wywołanych przez grzyby należące do rodzaju *Scopulariopsis*. Europejskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) i Europejska Konfederacja Mykologii Medycznej (European Confederation of Medical Mycology, ECMM) w wytycznych dotyczących leczenia hialohyfomykoz [81], w przypadku zakażeń wywołanych przez *Scopulariopsis* spp. wymieniają jedynie terapię itrakonazolem (siła zalecenia C – w niewielkim stopniu), terapię liposomalną postacią amfoterycyny B (siła zalecenia C – w niewielkim stopniu), a także zastosowanie każdego leku przeciwgrzybiczego w połączeniu z opracowaniem chirurgicznym (siła zalecenia A – zdecydowanie).

8. Podsumowanie

Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* są mało poznanymi mikroorganizmami. Najwięcej uwagi poświęca się im w odniesieniu do grzybic paznokci. Zagadnienia dotyczące determinantów patogenności tych grzybów, mechanizmów lekooporności, czy w końcu diagnostyki zakażeń, w tym różnicowania między- i wewnątrzgatunkowego, poruszane są sporadycznie. Należy jednak pamiętać, że postęp nauk medycznych, który przyniósł nowe możliwości leczenia różnych chorób, przyczynił się także do wzrostu zapadalności na grzybice. Ponadto zmienił spektrum gatunków odpowiedzialnych za te zakażenia. Obecnie, obok wiodących patogenów grzybiczych z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus*, przyczyną zakażeń mogą być grzyby o potencjalnie niskiej patogenności, uchodzące powszechnie za saprotrofy. Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* idealnie wpisują się w ten obraz. Wzrastająca liczba odnotowywanych przypadków inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *Scopulariopsis* spp. i związane z nimi trudności terapeutyczne pokazują, że grzybów tych nie wolno lekceważyć. Przeciwnie, należy je lepiej poznać, aby skuteczniej diagnozować, leczyć i zapobiegać wywoływanym przez nie zakażeniom.

Artykuł powstał w ramach projektu badawczego «Iuventus Plus» realizowanego ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Nr: IP12013 023672).

Piśmiennictwo

1. Abdel Hameed A.A., Yasser I.H., Khoder I. M.: Indoor air quality during renovation actions: a case study. *J. Environ. Monit.* **6**, 740–744 (2004)
2. Aguilar C., Pujol I., Guarro J.: In vitro antifungal susceptibilities of *Scopulariopsis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1520–1522 (1999)
3. Andreoni S., Farina C., Lombardi G.: Medical mycology atlas. Systems, Paderno Dugnano, 2004
4. Asan A., Kirgiz T., Sen B., Camur-Elipek B., Guner U., Guher H.: Isolation, identification and seasonal distribution of airborne and waterborne fungi in Terkos Lake (Istanbul-Turkey). *J. Basic Microbiol.* **43**, 83–95 (2003)
5. Aydin S., Ertugrul B., Gultekin B., Uyar G., Kir E.: Treatment of two postoperative endophthalmitis cases due to *Aspergillus flavus* and *Scopulariopsis* spp. with local and systemic antifungal therapy. *BMC Infect. Dis.* **7**, 87 (2007)
6. Babady N.E., Miranda E., Gilhuley K.A.: Evaluation of Luminex xTAG fungal analyte-specific reagents for rapid identification of clinically relevant fungi. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3777–3782 (2011)
7. Bagy M.M., Abdel-Mallek A.Y.: Saprophytic and keratinolytic fungi associated with animals hair from Riyadh, Saudi Arabia. *Zentralbl. Mikrobiol.* **146**, 305–310 (1991)
8. Bassiri-Jahromi S., Khaksar A. A.: Nondermatophytic moulds as a causative agent of onychomycosis in Tehran. *Indian J. Dermatol.* **55**, 140–143 (2010)
9. Besbes M., Makni F., Cheikh-Rouhou F., Sellami H., Kharrat K., Ayadi A.: Otomycosis due to *Scopulariopsis brevicaulis*. Rev. *Laryngol. Otol. Rhinol.* (Bord.) **123**, 77–78 (2002)
10. Bonifaz A., Cruz-Aguilar P., Ponce R.M.: Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. *Eur. J. Dermatol.* **17**, 70–72 (2007)
11. Bontems O., Hauser P. M., Monod M.: Evaluation of a polymerase chain reactionrestriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **161**, 791–796 (2009)
12. Carrillo-Muñoz A. J., Giusiano G., Cárdenes D., Hernández--Molina J.M., Eraso E., Quindós G., Guardia C., del Valle O., Tur-Tur C., Guarro J.: Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**, 540–543 (2008)
13. Carrillo-Muñoz A. J., Giusiano G., Guarro J., Quindós G., Guardia C., del Valle O., Rodríguez V., Estivill D., Cárdenes C.D.: *In vitro* activity of voriconazole against dermatophytes, *Scopulariopsis brevicaulis* and other opportunistic fungi as agents of onychomycosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **30**, 157–161 (2007)
14. Chen Y., Prior B.A., Shi G., Wang Z.: A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. *J. Microbiol.* **49**, 675–679 (2011)
15. Clayton Y.M.: Relevance of broad-spectrum and fungicidal activity of antifungals in the treatment of dermatomycoses. *Br. J. Dermatol.* **130**, 7–8 (1994)
16. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Buitrago M.J., Mellado E., Garcia-Effron G., Rodriguez-Tudela J.L.: *In vitro* activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2248–2250 (2006)
17. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M.J., Monzón A., Rodriguez-Tudela J.L.: *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2339–2341 (2003)
18. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M.J., Monzon A., Rodriguez-Tudela J. L.: Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against

3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 917–921 (2006)
19. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Garcia--Effron G., Monzon A., Rodriguez-Tudela J. L.: *In vitro* activity of ravuconazole against 923 clinical isolates of nondermatophyte filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5136–5138 (2005)
20. de Doncker P.R., Scher R.K., Baran R.L., Decroix J., Degreef H.J., Roseeuw D.I., Havu V., Rosen T., Gupta A.K., Piérard G.E.: Itraconazole therapy is effective for pedal onychomycosis caused by some nondermatophyte molds and in mixed infection with dermatophytes and molds: a multicenter study with 36 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**, 173–177 (1997)
21. de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000
22. Dean T.R., Kohan M., Betancourt D., Menetrez M.Y.: A simple polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay capable of identifying medically relevant filamentous fungi. *Mol. Biotechnol.* **31**, 21–28 (2005)
23. Dunyach C., Bertout S., Phelipeau C., Drakulovski P., Reynes J., Mallié M.: Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**, 263–271 (2008)
24. Ebihara M., Makimura K., Sato K., Abe S., Tsuboi R.: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Br. J. Dermatol.* **161**, 1038–1044 (2009)
25. Freire F.C., Kozakiewicz Z., Paterson R.R.: Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, **149**, 13–19 (2000)
26. Garcia-Effron G., Gomez-Lopez A., Mellado E., Monzon A., Rodriguez-Tudela J.L., Cuenca-Estrella M.: *In vitro* activity of terbinafine against medically important nondermatophyte species of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 1086–1089 (2004)
27. García-Martos P., Domínguez I., Marín P., Linares M., Mira J., Calap J.: Onychomycoses caused by non-dermatophytic filamentous fungi in Cádiz. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **18**, 319–324 (2000)
28. Gluck O., Segal N., Yariv F., Polacheck I., Puterman M., Greenberg D., Daniel B.: Pediatric invasive sinonasal *Scopulariopsis brevicaulis* – a case report and literature review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **75**, 891–893 (2011)
29. Gupta A.K, Kohli Y.: *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Br. J. Dermatol.* **149**, 296–305 (2003)
30. Gupta A.K., Gregurek-Novak T., Konnikov N., Lynde C.W., Hofstader S., Summerbell R.C.: Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. *J. Cutan. Med. Surg.* **5**, 206–210 (2001)
31. Gupta A.K., Gregurek-Novak T.: Efficacy of itraconazole, terbinafine, fluconazole, griseofulvin and ketoconazole in the treatment of *Scopulariopsis brevicaulis* causing onychomycosis of the toes. *Dermatology*, **202**, 235–238 (2001)
32. Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D.: Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 622–626 (2004)
33. Hart A.P., Sutton D.A., McFeeley P.J., Kornfeld M.: Cerebral phaeohyphomycosis caused by a dematiaceous scopulariopsis species. *Clin. Neuropathol.* **20**, 224–228 (2001)
34. Hasse-Cieślińska M.: Diagnostyka i leczenie powierzchownych zakażeń grzybiczych. *Przew. Lek.* **7**, 109–120 (2006)
35. Hsiao C.R., Huang L., Bouchara J.P., Barton R., Li H.C., Chang T.C.: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3760–3768 (2005)
36. Issakainen J., Heikkilä H., Vainio E., Koukila-Kähkölä P., Castren M., Liimatainen O., Ojanen T., Koskela M., Meurman O.: Occurrence of *Scopulariopsis* and *Scedosporium* in nails and keratinous skin. A 5-year retrospective multi-center study. *Med. Mycol.* **45**, 201–209 (2007)
37. Issakainen J., Jalava J., Hyvönen J., Sahlberg N., Pirnes T., Campbell C. K.: Relationships of Scopulariopsis based on LSU rDNA sequences. *Med. Mycol.* **41**, 31–42 (2003)
38. Issakainen J., Meurman O. i wsp.: Deep, respiratory tract and ear infections caused by *Pseudallescheria* (*Scedosporium*) and *Microascus* (*Scopulariopsis*) in Finland. A 10-year retrospective multi-center study. *Med. Mycol.* **48**, 458–465 (2010)
39. Jabor M.A., Greer D.L., Amedee R.G.: *Scopulariopsis*: an invasive nasal infection. *Am. J. Rhinol.* **12**, 367–371 (1998)
40. Jackson C.J., Barton R.C., Evans E.G.: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 931–936 (1999)
41. Jagielski T., Kosim K., Skóra M., Macura A.B., Bielecki J.: Identification of *Scopulariopsis* species by partial 28S rRNA gene sequence analysis. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 303–306 (2013)
42. Jain D., Oberoi J.K., Shahi S.K., Shivnani G., Wattal C.: *Scopulariopsis brevicaulis* infection of prosthetic valve resembling aspergilloma on histopathology. *Cardiovasc. Pathol.* **20**, 381–383 (2011)
43. Jo Siu W. J., Tatsumi Y., Senda H., Pillai R., Nakamura T., Sone D., Fothergill A.: Comparison of *in vitro* antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1610–1616 (2013)
44. Kardjeva V., Summerbell R., Kantardjiev T., Devliotou-Panagiotidou D., Sotiriou E., Gräser Y.: Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1419–1427 (2006)
45. Keller M., Krehon S., Stanek C., Rosengarten R.: Keratinopathogenic mould fungi and dermatophytes in healthy and diseased hooves of horses. *Vet. Rec.* **147**, 619–622 (2000)
46. Kriesel J.D., Adderson E.E., Gooch W.M. 3rd, Pavia A.T.: Invasive sinonasal disease due to *Scopulariopsis candida*: case report and review of scopulariopsosis. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 317–319 (1994)
47. Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. MedPharm Polska, Wrocław, 2011.
48. Lee M.H., Hwang S.M., Suh M.K., Ha G.Y., Kim H., Park J.Y.: Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: report of two cases. *Ann. Dermatol.* **24**, 209–213 (2012)
49. Lindsley M.D., Hurst S.F., Iqbal N.J., Morrison C.J.: Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3505–3511 (2001)
50. Linton C.J., Borman A.M., Cheung G., Holmes A.D., Szekely A., Palmer M.D., Bridge P.D., Campbell C.K., Johnson E.M.: Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United kingdom mycology reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1152–1158 (2007)
51. Malecha M.A.: Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treated successfully with natamycin. *Cornea*, **23**, 201–203 (2004)
52. Mandeel Q., Nardoni S., Mancianti F.: Keratinophilic fungi on feathers of common clinically healthy birds in Bahrain. *Mycoses* **54**, 71–77 (2011)

53. Matković K., Vucemilo M., Vinković B.: Airborne fungi in dwellings for dairy cows and laying hens. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **60**, 395–399 (2009)
54. Meyer W., Serena C., Firacative C., Kröger B., Arabatzis M., Robert V., de Hoog S., Balajee A., Velegraki A.: An update on DNA barcoding of human pathogenic fungi. Fourth International Barcode of Life Conference, Adelaide, Australia, 2011
55. Monod M., Bontems O., Zaugg C., Léchenne B., Fratti M., Panizzon R.: Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1211–1216 (2006)
56. Moreno G., Arenas R.: Other fungi causing onychomycosis. *Clin. Dermatol.* **28**: 160–163 (2010)
57. Mügge C., Haustein U.F., Nenoff P.: Causative agents of onychomycosis – a retrospective study. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **4**, 218–228 (2006)
58. MycoBank Website, Database Copyright © 2014 MycoBank in English, http://www.mycobank.org/ (25 września 2014 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu)
59. Naidu J., Singh S. M., Pouranik M.: Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brumptii*. A case report and sensitivity studies. *Mycopathologia* **113**, 159–164 (1991)
60. Nieguitsila A., Arné P., Durand B., Deville M., Benoît-Valiergue H., Chermette R., Cottenot-Latouche S., Guillot J.: Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in a poultry farmhouse in France. *Environ. Res.* **111**, 248–253 (2011)
61. Normand A.C., Cassagne C., Ranque S., L'Ollivier C., Fourquet P., Roesems S., Hendrickx M., Piarroux R.: Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol.* **13**, 76 (2013)
62. Pawlik B., Macura A.B.: Fungal susceptibility to cyclopirox. *Mikol. Lek.* **6**, 240–242 (1999)
63. Pereira V.J., Fernandes D., Carvalho G., Benoliel M.J., San Romao M.V., Barreto Crespo M.T.: Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Res.* **44**, 4850–4859 (2010)
64. Piecková E., Jesenská Z.: Occurrence of itraconazole-tolerant micromycetes in the soil and food products. *Folia Microbiol.* (*Praha*) **44**, 677–682 (1999)
65. Plewa K., Lone E.: Seasonal biodiversity of pathogenic fungi in farming air area. Case study. *Wiad. Parazytol.* **57**, 118–122 (2011)
66. Putignani L., Paglia M.G., Bordi E., Nebuloso E., Pucillo L.P., Visca P.: Identification of clinically relevant yeast species by DNA sequence analysis of the D2 variable region of the 25–28S rRNA gene. *Mycoses*, **51**, 209–227 (2008)
67. Rai S., Tiwari R., Sandhu S.V., Rajkumar Y.: Hyalohyphomycosis of maxillary antrum. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **16**, 149–152 (2012)
68. Roigé M.B., Aranguren S.M., Riccio M.B., Pereyra S., Soraci A.L., Tapia M.O.: Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. Rev. *Iberoam. Micol.* **26**, 233–237 (2009)
69. Sandhu G.S., Kline B., Stockman L., Roberts G.: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2913–2919 (1995)
70. Sandoval-Denis M., Sutton D.A., Fothergill A.W., Cano-Lira J., Gené J., Decock C.A., de Hoog G.S., Guarro J.: *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and *in vitro* responses to antifungal drugs. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 3937–3943 (2013)
71. Sanguinetti M., Porta R., Sali M., La Sorda M., Pecorini G., Fadda G., Posteraro B.: Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1343–1346 (2007)
72. Satyavani M., Viswanathan R., Harun N.S., Mathew L.: Pulmonary *Scopulariopsis* in a chronic tobacco smoker. *Singapore Med. J.* **51**, 137–139 (2010)
73. Shankar E.M., Kumarasamy N. i wsp.: Hydrothorax in association with *Scopulariopsis brumptii* in an AIDS patient in Chennai, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**, 1270–1272 (2007)
74. Skóra M., Macura A.B., Bulanda M.: *In vitro* antifungal susceptibility of *Scopulariopsis* brevicaulis isolates. *Med. Mycol.* **52**, 723–727 (2014)
75. Skóra M., Macura A.B.: *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Scopulariopsis brevicaulis* strains using agar diffusion method. *Wiad. Parazytol.* **57**, 111–116 (2011)
76. Soeta N., Terashima M., Gotoh M., Mori S., Nishiyama K., Ishioka K., Kaneko H., Suzutani T.: An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1037–1044 (2009)
77. Strassmann K.: Kinetik der minimalen Hemmkonzentration verschiedener Antimykotika gegenüber den klinisch isolierten Erregern der Onychomykosen während einer Beobachtungszeit von 20 Wochen. Philipps-Universität, 2003.
78. Szekely A., Johnson E. M., Warnock D. W.: Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1480–1483 (1999)
79. Szental J.A., Kam J.K., Yohendran J., Morrissey O., Hall A.J.: Presumed *Scopulariopsis brevicaulis* chorioretinitis in a stem cell transplant recipient. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **38**, 314–315 (2010)
80. Szepietowski J., Reich A., Garłowska E., Kulig M., Baran E.: Czynniki predysponujące do rozwoju grzybicy paznokci stóp w populacji polskiej. *Mikol. Lek.* **12**, 231–234 (2005)
81. Tortorano A.M., Lass-Flörl C. i wsp.: ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin. Microbiol. Infect.* **20** Sup. 3, 27–46 (2014)
82. Tosti A., Piraccini B. M., Lorenzi S.: Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, 217–224 (2000)
83. Ulfig K., Płaza G., Sztyler A., Bronder J., Terakowski M., Guarro J.: General assessment of the influence of a municipal landfill site and environmental factors on the occurrence of keratinolytic fungi in soil. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **51**, 167–181 (2000)
84. Verrier J., Monod M. i wsp.: Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 553–561 (2012)
85. Vignon M., Michonneau D., Baixench M.T., Al-Nawakil C., Bouscary D., Buzyn A., Salmon D., Paugam A.: Disseminated *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an allogeneic stem cell recipient. *Bone Marrow Transplant.* **46**, 1276–1277 (2011)
86. Vollmer T., Störmer M., Kleesiek K., Dreier J.: Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1919–1926 (2008)
87. Wuyts W.A., Molzahn H., Maertens J., Verbeken E.K., Lagrou K., Dupont L.J., Verleden G.M.: Fatal *Scopulariopsis* infection in a lung transplant recipient: a case report. *J. Heart Lung Transplant.* **24**, 2301–2304 (2005)
88. Yang G., Zhang M., Li W., An L.: Direct species identification of common pathogenic dermatophyte fungi in clinical specimens by semi-nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Mycopathologia,* **166**, 203–208 (2008)
89. Yang Q., Wei J., Chen Z.: Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute monocytic leukemia patient. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**, 369–371 (2012)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 53–64
http://www.pm.microbiology.pl

ANTYGENY POWIERZCHNIOWE I CZYNNIKI WIRULENCJI *ESCHERICHIA COLI* O157

Jolanta Kutkowska[1]*, Małgorzata Michalska-Szymaszek[2], Renata Matuszewska[3], Elżbieta Chmiel[1], Teresa Urbanik-Sypniewska[1]

[1] Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS
[2] Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie, Oddział Laboratoryjny w Tarnobrzegu
[3] Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Higieny Środowiska

Wpłynęło we wrześniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Występowanie w środowisku i źródła zakażenia bakteriami EHEC *E. coli* O157. 3. Patogeneza. 3.1. Objawy kliniczne zakażenia *E. coli* EHEC. 4. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach. 5. Antygen O; struktura, biosynteza, znaczenie w chorobotwórczości i jako markera w diagnostyce. 6. Antygeny H serotypu O157. 7. Identyfikacja *E. coli* O157. 8. Epidemie EHEC *E. coli* przenoszące się drogą wodną. 9. Zapobieganie. 10. Podsumowanie

Cell-surface antigens and virulence factors of *Escherichia coli* O157

Abstract: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are commensal bacteria in cattle with high potential for transmission to humans. The serotype *E. coli* O157:H7 is the main cause of hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *E. coli* O157 synthesizes an O-antigen containing a repeating tetrasaccharide with the structure (4-*N*-acetyl-perosamine →3-fucose →3-glucose →3-N-acetyl-galactosmine). The presence of a common epitope consisting of 2-substituted N-acyl-perosamine is responsible for the serological cross-reactions with *Yersinia enterocolitica* O9 or *Vibrio cholerae* O1. The sequence homology indicates that the O157:H7 *rfbE* gene encoding perosamine synthetase may have originated in a species other than *E. coli.* The peculiarity of O157 repeat unit biosynthesis is a new pathway performed by epimerase Gnu that catalyses the reversible epimerization of N-acetyl-glucosamine-P-P-undecaprenol to N-acetyl-galactosmine-P-P-undecaprenol. The potential of the bacterial epimerase as a new target for antimicrobial agents is discussed. O157 and H7 antigens seem to be accessory virulence factors implicated in the pathogenesis of human diseases. The O157 antigen is important in the animal and plant host immune response and plays a role in the adherence of this organism to epithelial cells. One of the sources of epidemic outbreaks is water from the municipal water supply and other reservoirs. Survival of O157 bacteria in water environments has been recorded. The comparative analysis of nucleotide sequences within the *rfb* O antigen gene cluster and of other genes in the genome among STEC strains will elucidate the genetic basis of the evolution and virulence of these enteric pathogens.

1. Introduction. 2. Environmental occurrence and sources of EHEC *E. coli* O157 infections. 3. Pathogenesis. 3.1. Clinical symptoms of *E. coli* EHEC infection. 4. Plasmid-encoded virulence factors. 5. The O-antigen; the structure, biosynthesis and the role in pathogenesis and as a diagnostic marker. 6. H antigens of the O157 serotype**.** 7. *E. coli* O157 identification. 8. Waterborne EHEC outbreakes. 9. Prevention. 10. Summary

Słowa kluczowe: antygen O, czynniki wirulencji, *E. coli* O157:H7, perozamina
Key words: O antygen, virulence factors, *E. coli* O157:H7, perosamine

1. Wstęp

Escherichia coli O157 należy do patotypu EHEC (Enterohemorragic *E. coli*) enterokrwotocznych *E. coli*, które mogą powodować biegunki. Infekcje często mają charakter bezobjawowy, co sprzyja rozprzestrzenianiu patogenów [95].

Grupa szczepów EHEC określana terminem STEC (Shiga Toxin-producing *E. coli*, Shigatoksyczne *E. coli*) obejmuje szczepy wytwarzające toksyny Shiga tzw. werotoksyny, białka działające cytotoksycznie na komórki linii Vero nerek małpy zielonej. Najlepiej poznano szczepy STEC należące do grupy serologicznej O157. Na podstawie charakterystyki antygenów somatycznych O, rzęskowych H i otoczkowych K zidentyfikowano dotychczas ~400 serotypów, w tym ok. 100 związanych z infekcjami ludzi i ponad 200 serotypów (~70 serogrup) innych niż O157 tzw. nie-O157 STEC (non-O157 STEC) [18, 59].

Główną siłą napędową ewolucji szczepów EHEC jest horyzontalny przepływ genów, którego wkład w dywersyfikację genomu jest nieporównanie większy niż zmienność genomu. Różne pochodzenie szczepów należących do tego samego patotypu nadal nie jest wyjaśnione na poziomie molekularnym. Szczepy EHEC są znakomitym przykładem ewolucji równoległej, przebiegającej różnymi drogami i prowadzącej do wytworzenia złożonych systemów wirulencji, takich jak system sekrecji 3 typu T3SS (Type 3 Secretion System) [66]. Najważniejszymi czynnikami wirulencji w szczepach EHEC są: toksyny Shiga (Stx1 i Stx2), wyspa patogenności LEE (Locus of Enterocyte Effacement – złuszczanie komórek nabłonka jelitowego) i duży plazmid wirulencji. Wyspa LEE, która występuje także

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. (81) 537 59 05; fax: (81) 537 59 59; e-mail: jolanta.kutkowska@poczta.umcs.lublin.pl

w szczepach patotypu EPEC (Enteropathogenic *E. coli*, enteropatogenne *E. coli*) i *Citrobacter rodentium*, koduje zespół białek systemu T3SS i kilkanaście innych związanych z tym systemem.

Wielkość genomu szczepu referencyjnego O157 STEC; Sakai (RIMD 0509952) przewyższa o 1,5 Mpz wielkość genomu szczepu laboratoryjnego *E. coli* K-12. Znakomita większość genów związanych z patogennością szczepów EHEC jest zlokalizowana w tej „dodatkowej" części genomu. Składają się na nią trzy elementy: (i) 18 profagów lambdoidalnych (PPs; Sp-1 do Sp-18), (ii) 6 elementów integracyjnych (IEs; SpLE1 do SpLE6), definiowanych jako elementy genetyczne zawierające spokrewnione integrazy ale nie posiadające genów fagowych ani elementów transferu koniugacyjnego oraz (iii) 2 plazmidy. Większość genów związanych z wirulencją jest zlokalizowana na SpLE4, odpowiedniku locus LEE oraz w genomach profagów (PPs), które kodują toksyny Stx1 i Stx2 oraz białka efektorowe systemu T3SS (tzw. efektory non-LEE). Inne nie-O157 serotypy EHEC mają bardzo podobny potencjał chorobotwórczy, ponieważ część genów wirulencji szczepów nie-O157 i O157 jest wspólna. Porównanie całych genomów szczepów EHEC O157 i nie-O157 (np. O26, O111, O103) potwierdza, że niezależne nabywanie mobilnych elementów (PPs, IEs i plazmidów) było przyczyną różnych dróg ewolucji szczepów EHEC. Szczególny przebieg miało wytworzenie systemu T3SS, który u EHEC powstał z genów nabywanych wraz z trzema typami elementów mobilnych: IE jako odpowiednikiem LEE, kodującym zasadniczą część systemu T3SS, SpLE3, IE-podobnym elementem oraz fagami lambdoidalnymi [59].

Bakterie EHEC (STEC) są egzogennym składnikiem flory jelitowej człowieka [83]. Obecność *E. coli* O157 w odchodach zwierząt (bydło, owce, kozy) mimo krótkiego okresu nosicielstwa (do 30 dni) stanowi ryzyko dla zdrowia ludzi ze względu na możliwość zakażenia żywności i wody oraz długi okres pozostawania tych bakterii w środowisku [27].

W tym artykule zwrócono szczególną uwagę na heterogenność antygenów somatycznych O i rzęskowych H jako markerów determinujących właściwości chorobotwórcze bakterii STEC oraz znaczenie wody jako źródła infekcji *E. coli* O157.

2. Występowanie w środowisku i źródła zakażenia bakteriami EHEC *E. coli* O157

Głównym rezerwuarem, biorąc pod uwagę możliwość zakażenia jest zdrowe bydło, w którego przewodzie pokarmowym te bakterie występują najliczniej w odcinku rekto-analnym. Największą i udokumentowaną rolę w nosicielstwie *E. coli* O157 odgrywają przeżuwacze [7, 20], rezerwuarem shigatoksycznych pałeczek *E. coli* mogą być także konie, psy oraz jelenie, żyrafy, i ptaki [24, 49].

Bakterie *E. coli* O157, które wraz z zanieczyszczoną wodą lub kompostem dostają się do gruntu przeżywają w zależności od typu gleby i stopnia jej nawodnienia do 47 dni, a w rizosferze ponad 200 dni [28, 69]. Bakterie *E. coli* O157:H7 wyizolowane z mleka przeżywały bardzo długo w wodzie pobranej ze strefy przybrzeżnej; 73 do 100 dni w niskiej temperaturze (6°C) i 30–60 dni w temperaturze 24°C. Wraz z deszczami bakterie są spłukiwane do jezior, rzek i kąpielisk, gdzie wchodzą w skład flory allochtonicznej [22].

Badania działania światła słonecznego na przeżywalność w warstwach powierzchniowych stawów bakterii wskaźnikowych; enterokoki i komensalne *E. coli* w porównaniu do *E. coli* O157:H7 wykazały, że bakterie tego serotypu przeżywają dłużej niż bakterie wskaźnikowe, szczególnie w wyższej temperaturze i dużym stężeniu związków organicznych [35]. W wodzie bieżącej do picia chlorowanej standardowo podchlorynem sodu (NaOCl) bakterie *E. coli* O157:H7 nie przeżywają, ale w takiej samej wodzie pozbawionej chloru *E. coli* O157 przeżywały po tygodniu inkubacji w 15°C. Niewłaściwe chlorowanie wody było przyczyną jednej z największych epidemii w Walkerton, Kanada [32]. Szczególne niebezpieczeństwo stwarza niska temperatura sprzyjająca przejściu bakterii w stan „niehodowalności" VBNC (viable but non-culturable) [18].

W innym doświadczeniu, zastosowanie cytometrii przepływowej dowiodło, że szczep *E. coli* O157 (nie produkujący toksyn Stx) nie tylko był zdolny do namnażania w podłożach ubogich w organiczne źródła węgla, ale wykazywał większą konkurencyjność w stosunku do oligotroficznej mikroflory autochtonicznej wyizolowanej z wody do picia (bieżącej i butelkowanej) [92].

Najliczniejsze przypadki infekcji wywołanych u ludzi pałeczkami *E. coli* O157 dotyczą zachorowań żołądkowo-jelitowych spowodowanych spożyciem żywności – najczęściej nieodpowiednio przetworzonego termicznie mięsa wołowego, niepasteryzowanego mleka i jego przetworów, warzyw i owoców. Ze względu na wysoką tolerancję *E. coli* O157:H7 na niskie pH oraz wysuszenie, bakterie te stanowią zagrożenie w żywności uważanej dotąd za bezpieczną, np. suszonej lub liofilizowanej [47]. Uprawy nawożone niewystarczająco długo składowanymi nawozami naturalnymi są zagrożeniem dla zdrowia ludzi. Stwierdzono, że w oborniku bakterie *E. coli* O157 mogą przeżywać kilkanaście miesięcy [60].

3. Patogeneza

Chorobotwórczość pałeczek *E. coli* O157 jest determinowana przez produkty genów w większości zgrupowanych na wyspach patogenności PAI (pathogenicity

island, wyspy patogenności) zlokalizowanych w chromosomie i na plazmidach [36].

Do najważniejszych czynników patogenności należy toksyna Shiga (Stx, Shiga toxin lub SLT, Shiga-like toxin) kodowana przez allele genu *stx*. W przeciwieństwie do genów *stx Shigella dysenteriae*, które zajmują w genomie stabilną pozycję w pobliżu sekwencji pozostałych po genomach fagowych, (w piśmiennictwie anglojęzycznym – remnant prophages), warianty genów s*tx* szczepów STEC są zlokalizowane w obrębie kompletnych genomów fagów lambdoidalnych w większości należących do rodziny *Podoviridae*. Artykuł przeglądowy wyjaśniający mechanizmy genetyczne ekspresji genów toksyn Shiga i fagów lambdoidalnych w enterokrwotocznych szczepach *E. coli* opublikowali Łoś i Węgrzyn (2011) [44]. Zidentyfikowano dwa główne typy takich profagów: kodujące *stx1* np. fag H-19B, podobne do genów *stx S. dysenteriae* typu 1 (99% podobieństwa na poziomie DNA) oraz kodujące *stx2*, o mniejszym podobieństwie (tylko 56% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej) np. fag 933W. W szczepach STEC *E. coli* O157:H7 wyizolowanych z przypadków zakażeń o ciężkim przebiegu stwierdzano nadekspresję genu *stx2* [68]. Ta bardziej toksyczna forma toksyny jest wytwarzana w wielu wariantach Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, i Stx2g w przeciwieństwie do homogennego białka Stx1 [97, 100].

Ekspresja *stx1* i *stx2* jest sprzężona z transkrypcją genów późnych cyklu litycznego i może być indukowana niskim poziomem związków żelaza. Ma to istotne konsekwencje, gdyż zdolność produkcji toksyn Stx może być przekazywana między szczepami w następstwie indukcji cyklu litycznego w odpowiedzi typu SOS uruchomianej po działaniu niektórych chemioterapeutyków (trimetoprim, 4-chinolony). Stosowanie tych leków w terapii biegunek u ludzi i zwierząt może powodować rozprzestrzenianie się szczepów STEC w środowisku [74, 82].

Toksyny Stx należą do toksyn typu AB5 [56]. Aktywność N-glikozydazowa podjednostki A toksyny powoduje usuwanie adenin z 28S rRNA podjednostki 60S rybosomu i zatrzymanie biosyntezy białka w wyniku interferencji z czynnikiem elongacyjnym EEF1 w komórkach wytwarzających receptory glikosfingolipidowe GbO3Cer/CD77 oraz w mniejszym stopniu GbO4Cer np. w komórkach śródbłonka [6, 26]. Ponadto, pod wpływem działania toksyny Shiga na szlaki transdukcji sygnału może być indukowana apoptoza [46] lub hamowana infekcja limfocytów B przez wirusa BLV (Bovine Leukemia Virus, wirus białaczki bydlęcej), co może znaleźć zastosowanie w terapiach antynowotworowych [25]. Najnowsze metody detekcji toksyn Shiga opisano w publikacji Clotilde i wsp. [19].

Ważnym czynnikiem patogenności szczepów EHEC w tym STEC są adhezyny odpowiedzialne za przyleganie bakterii i powstawanie zmian typu A-E (Attaching-Effacing, przyleganie i ścieranie) oraz systemy ich transportu kodowane w locus LEE. W różnych serotypach locus LEE jest wbudowany w loci kodujące różne tRNA np. *selC* tRNA selenocysteiny w O157:H7 i O127:H7, *pheU* tRNA fenyloalaniny w serotypach O111 i O126 lub *pheV* inny gen tRNA fenyloalaniny. W skład systemu sekrecji T3SS wchodzą: białka chaperonowe, białka translokatorowe (składniki kompleksu translokacyjnego); EspA, EspD, EspB i białka efektorowe wprowadzane do cytoplazmy komórki gospodarza; Map, EspF, EspG, EspH, EspZ oraz receptor intyminy Tir (Translocated Intimin Receptor) [53]. Czynniki regulatorowe (Ler, GrlR i GrlA) determinujące ekspresję genów locus LEE są kodowane przez geny położone w tym locus oraz położone w innych loci (PchA, PchB, PchC i LrhA) [3, 36]. Większość tych białek działa wielotorowo, jak np. LrhA, które wpływa pozytywnie na ekspresję genów hemolizyny *ehxCABD,* a negatywnie na ekspresję genów rzęskowych H [31].

Najważniejszym białkiem adhezyjnym transportowanym do błony zewnętrznej przez system T3SS jest intymina (EaeA) [10]. Zaobserwowano zależność typu kolonizacji nabłonka jelitowego od odmiany intymny (α, β, γ lub δ), różniącej się sekwencją aminokwasową C-końca. W szczepach serogrupy O157 dominuje intymina typu γ. Określenie wariantów genów wirulencji oraz identyfikacja serotypu może ułatwić przewidywanie stopnia chorobotwórczości szczepów [65, 83]. Fenotyp A-E charakteryzuje niezwykle stabilna adhezja bakterii do śluzówki jelitowej, zanikanie mikrokosmków rąbka szczoteczkowego oraz rearanżacja cytoszkieletu enterocytów przybierających kształt przypominajacy piedestał (pedestal). Wyizolowano szczepy STEC pozbawione locus LEE i dające obraz zmian nabłonka jelitowego, jak szczepy O157 LEE dodatnie. Okazało się, że w szczepach LEE ujemnych (posiadających plazmid wirulencji pO113) za zmiany histopatologiczne odpowiada nowa toksyna (toksyna subAB), której działanie zabójcze na komórki polega na degradacji chaperonu (BiP/GRP78) reticulum endoplazmatycznego. Analiza alleli plazmidowych i genów chromosomalnych potwierdziła niezależną (równoległą) ewolucję szczepów STEC [55].

Czynnikiem wyróżniającym szczepy EHEC jest białko efektorowe TccP (Tir cytoskeleton coupling protein), które po translokacji do cytoplazmy komórki docelowej wiąże się i aktywuje białko zespołu Wiskott-Aldrich'a (N-WASP), a to z kolei aktywuje kompleks Arp 2/3 (actin-related protein 2/3 complex) inicjujący lokalną polimeryzację włókien aktyny. W przeciwieństwie do szczepów EPEC, w których reszty tyrozyny receptora Tir ulegają fosforylacji, białko Tir szczepów EHEC O157 nie jest fosforylowane i wiąże się do białka TccP w miejsce Nck, białka adaptorowego komórki

gospodarza. Gen *tccP* znajduje się w genomie faga lizogennego CP-933U/Sp14 (TccP). Typowe izolaty EHEC O157:H7 mają pseudogen *tccP* kodowany przez profaga CP-933 M/Sp4 (*tccP2*). W odróżnieniu od nich atypowe (*gus*-ujemne, fermentujące sorbitol, SF) szczepy EHEC O157 mają obydwa warianty genu, *tccP* i *tccP2* [58].

3.1. Objawy kliniczne zakażenia *E. coli* EHEC

Objawy kliniczne zakażeń wywoływanych przez EHEC, w tym *E. coli* O157, zależą od cech osobniczych oraz czynników bakteryjnych i manifestują się w postaci łagodnych do krwotocznych biegunek przechodzących w krwotoczne zapalenie okrężnicy (HC, Hemorrhagic Colitis), bądź groźnych dla życia zespołów: hemolityczno-mocznicowego (HUS, Hemolytic-Uremic Syndrome) i małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP, thrombotic thrompocytopenic purpura). Bezpośrednią przyczyną ogólnonarządowych zmian chorobowych HC i HUS są toksyny Shiga [38]. Zespół HUS jest definiowany jako niewydolność nerek i towarzyszące jej objawy; trombocytopenia i anemia hemolityczna. Do krwawych biegunek, przy których istnieje ryzyko komplikacji pozajelitowych dochodzi w około 70–90% przypadków. Decydującą rolę w rozwoju objawów odgrywa powinowactwo toksyn Stx do komórek nabłonków, które zależy nie tylko od wariantu toksyny, ale w znacznym stopniu od oddziaływania receptorów GbO3Cer (globotriaozyl ceramidu) i GbO4Cer (globotetraozyl ceramidu) z innymi składnikami błon, głównie fosfatydylocholiną i cholesterolem [26].

Szczepy *E. coli* O157 powodujące biegunki charakteryzują się niską dawką zakaźną, która wynosi około 10 do 100 komórek bakterii. W leczeniu infekcji nie należy stosować antybiotyków, które interferują z biosyntezą ściany komórkowej bakterii i powoduje ich lizę, gdyż może to uwalniać dodatkowe ilości toksyn Stx i zwiększać ryzyko wystąpienia zespołu HUS. Podjęto próbę zastosowania w terapii HUS preparatu eculizumab (Soliris®, Alexion, Inc.) zawierającego przeciwciała monoklonalne, wiążące się z białkiem dopełniacza C5, inicjujacego proces niszczenia erytrocytów [81].

4. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach

Dwie grupy szczepów *E. coli* O157 izolowane od chorych z zespołem HUS; niefermentujące sorbitolu (nSF) O157:H7 i fermentujące sorbitol (SF) O157 H^- mają różne plazmidy wirulencji. Szczepy należące do pierwszej grupy posiadają plazmid pO157 o masie ~60,5 MDa (92 kpz), do drugiej mają plazmid pSFO157 o masie ~79,7 MDa (121 kpz) [14, 88, 93]. Plazmid wirulencji pO157 jest wykrywany w niemal wszystkich izolatach klinicznych STEC *eae*-dodatnich i zawiera ponad 100 ORF (Open Reading Frames, otwartych ramek odczytu) w tym: *katP* – katalaza/peroksydaza KatP (niezależna od katalaz KatG i KatE kodowanych chromosomalnie); *toxB* – białko podobne do toksyny B *Clostridium difficile* o właściwościach adhezyny lub wzmacniające ekspresję adhezyn; *etpC-etpO* – system sekrecyjny 2 typu; *stcE* – inhibitor fosfolipazy C1; *espP* – kodujący zewnątrzkomórkową proteazę serynową oraz operon *ehxCABD* kontrolujący syntezę enterohemolizyny Ehx, homologicznej do α-hemolizyny (Hly) szczepów *E. coli* innych niż STEC i powodującej typ β hemolizy. Hemolizyna Ehx poza zdolnością do tworzenia por w błonie erytrocytów wzmacnia działanie toksyn Shiga a jej synteza jest kontrolowana przez aktywatory Ler, GlrA i LrhA zlokalizowane w locus LEE [29, 34, 41].

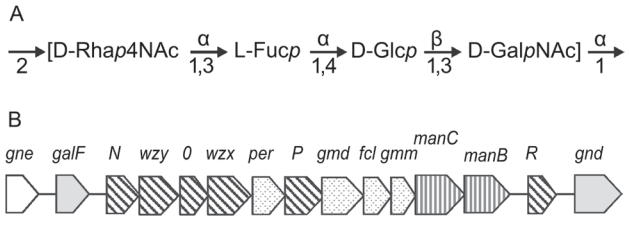
Funkcjonowanie genów jednego z operonów plazmidu pO157; *ecf* (*E. coli* Attaching and Effacing [*eae*] Gene-positive Conserved Fragments) jest regulowane temperaturą i wpływa na ekspresję genów białek związanych ze składnikami powierzchniowymi bakterii. Geny *ecf1* i *ecf2* kodują odpowiednio; deacetylazę polisacharydu i białko WabB – transferazę α-1,7-N-acetyloglukozaminy w LPS. Białko Ecf4 produkt homologu chromosomalnego genu *lpxM* koduje dodatkową kopię mirystoylo transferazy przyłączającej kwas mirystynowy (14:0) do lipidu A. Analiza efektów mutacji w tym genie wskazuje, że produkt *ecf2* jest wymagany do przeżywania bakterii w skrajnie różnych środowiskach tj. przewodzie pokarmowym i w środowisku wodnym, co wiąże się z odpowiednią modyfikacją lipidu A oraz lipidów błonowych. Obniżenie temperatury do 24°C powodowało, że spadała ilość kwasów nasyconych (12:0, 14:0 i cyklopropanowego 17:0) a rosła ilość kwasu oktadecenowego (18:1) w lipidach błonowych [98].

Różnica między plazmidami pO157 i pSFO157 polega na braku genów *katP*, *espP* i homologu genu *toxB* w plazmidzie pSFO157. Większość genów obecnych tylko w pSFO157 znajduje się na fragmencie plazmidu F zawierającym geny warunkujące transfer na drodze koniugacji oraz klaster genów *sfp* dla fimbrii Sfp [14].

Szczepy SF O157:H^- nie produkują hemolizyny mimo, że mają operon *hly*. Porównanie sekwencji nukleotydowych chromosomowych i obu plazmidów potwierdza, że szczepy SF O157:H^- i szczepy nSF O157:H7 wywodzą się od wspólnego przodka, w którym plazmid pSFO157 był prekursorem plazmidu pO157 [88].

5. Antygen O; struktura, biosynteza, znaczenie w chorobotwórczości i jako markera w diagnostyce

Antygeny O swoiste są składnikami lipopolisacharydów (LPS) i jednymi z ważniejszych markerów wykorzystywanych w diagnostyce szczepów STEC. Ich



Rys. 1. Sekwencja cukrów biologicznej powtarzającej się jednostki antygenu O157 *E. coli* **A)** i organizacja genów operonu biosyntezy antygenu O zlokalizowanego między genami metabolizmu podstawowego *galF* (pirofosforylaza UDP-glukozy) i *gnd* (dehydrogenaza 6-fosfoglukonianu) **B)** opracowane na podstawie [1, 63, 73, 91].

Objaśnienia; α-Rha*p*4NAc lub Per; 4-acetamido-4,6-dideoksy-α-D-*manno*piranoza, (perozamina), α-L-Fuc*p*; α-L-fukoza (6-deoksy-α-L-*galakto*piranoza), β-D-Glc*p*; β-D-*gluko*piranoza; α-D-Gal*p*NAc; α-D-N-acetylo*galato*piranozamina.

Produkty genów (*wbpN*, *wbpO*, i *wbpP*), oznaczonych literami: N, O, P pełnią funkcję glikozylotransferaz, funkcje pozostałych genów opisano w tekście.

identyfikację wykonuje się na podstawie reakcji serologicznych lub analizy genów biosyntezy [48]. Są one składową LPS eksponowaną na powierzchni komórki bakteryjnej i rozpoznawaną przez czynniki układu immunologicznego oraz bakteriofagi. Pierwszorzędową funkcją anygenów O jest ochrona komórki bakteryjnej przed składnikami dopełniacza i innymi białkami obronnymi, jak BPI (bactericidal permeability-increasing protein) lub peptydy obronne. Swoistość antygenu O jest związana z adaptacją do środowiska a jego zmienność z mechanizmami unikania odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [64]. Określanie serotypów jest stosowane w ustalaniu źródła epidemii i chorobotwórczości szczepu. Polisacharyd O swoisty *E. coli* O157:H7 jest zbudowany z powtarzających się tetrasacharydowych jednostek. Sekwencja cukrów antygenu O157 i organizacja genów jego biosyntezy została pokazana na rysunku 1.

Występowanie wspólnych determinantów antygenowych powoduje, że serologiczne metody detekcji antygenu O157 np. odczyn lateksowy, mogą dawać reakcje pozytywne ze szczepami innymi niż *E. coli*. Identyczna struktura antygenu O, jak w LPS *E. coli* O157 (Rys. 1) występuje w rodzajach: *Salmonella*: *S. enterica* O30 (grupa N) i *Citrobacter*: *C. freundii* F90, *C. sedlakii*. Elementy strukturalne wspólne z antygenem O157 mają łańcuchy O w LPS *E. coli* O111, *S. enterica* O35 oraz *E. coli* O55 i *S. enterica* O50, a także LPS *E. hermannii, Brucella abortus* i *Vibrio cholerae* O1 Inaba [2, 72, 91].

Przykładem występowania reakcji krzyżowych mimo różnic w budowie antygenów O jest reakcja przeciwciał monoklonalnych anty O157 a LPS ze szczepu NRCC 6052 *C. freundii*, którego trójcukrowa podjednostka jest zbudowana z dwu reszt D-ramnozy i jednej cząsteczki D-glukozy. W tym przypadku wystąpienie reakcji mimo braku 2-podstawionej perozaminy wchodzącej w skład wspólnego epitopu można wytłumaczyć mimikrą antygenową [54, 91]. Epitop zawierajacy N-acylowaną (formylo pochodną) perozaminę występuje ponadto w LPS *Pseudomonas maltophilia* 555, *Yersinia entercolitica* O9 i *Brucella melitensis* [94]. Prowadzone są badania w celu zastosowania szczepów niepatogennych syntetyzujących antygeny identyczne lub zbliżone do struktury O157 jako żywe szczepionki [5].

Należy zaznaczyć, że część reakcji krzyżowych może być wynikiem obecności w surowicach przeciwciał skierowanych przeciw rdzeniowej części LPS, ponieważ we wszystkich szczepach *E. coli* O157:H7 i O157H$^-$ występuje chemotyp R3 rdzenia LPS, obecny także w niektórych szczepach *S. flexneri* i *S. dysenteriae* [16].

Operon (*wb*) rfb* kontrolujący biosyntezę antygenu O *E. coli* O157 ma wielkość 14 kpz i zawiera 12 genów transkrybowanych w tym samym kierunku, kontrolujących syntezę prekursorów cukrów w tym: guanozynodifosforanu-perozaminy (GDP-D-Per) i guanozynodifosforanu-fukozy (GDP-L-Fuc), odpowiednio geny *manB*, *manC*, *gmd*, *per* i *fcl* (Rys. 1). W operonach biosyntezy antygenów O *E. coli* i *S. enterica* zawierających gen *gnd* zawsze występuje gen *gmm* (*wbdQ*), którego produkt mannozylohydrolaza GDP-mannozy katalizuje hydrolizę mannozy z GDP-mannozy lub glukozy z GDP-glukozy i reguluje poziom GDP-cukrów. Kolejne geny kodują specyficzne glikozylotransferazy przenoszące reszty cukrowe na undekaprenylowy nośnik lipidowy Und-P (Undecaprenyl Phosphate) oraz flipazę (*wzx*), enzym przenoszący podjednostki oligocukrowe związane wiązaniem pirofosforanowym z Und-P-P na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej i polimerazę (*wzy*) łączącą powtarzające się podjednostki [73]. Na końcu 3' operonu *rfb* znajduje się gen *wbdR* oznaczony R na rys. 1, kodujący produkt o aktywności N-acetylotransferazy konwertującej GDP-D-Per do GDP-D-Per4NAc. Jego lokalizacja w pobliżu miejsc sprzyjających rekombinacji (powtórzenia Hinc) i polimorficzność genu *gnd* flankującego operon *rfb* są potwierdzeniem, że geny tego operonu zostały nabyte w drodze poziomego transferu. Zaproponowano hipotezę, powstania enterokrwotocznych szczepów *E. coli* O157, według której jedną z istotnych zmian był transfer genów antygenu O157 do genomu *E. coli* O55. Na podstawie organizacji operonu *rfb* i sekwencji nukleotydowej genów flankujących ten operon w szczepach *E. coli* O55 i O157 stwierdzono, że jedno z miejsc rekombinacji jest zlokalizowane w genie *galF* a drugie między genami *his* i *amn* oddalonym o ok. 35 kpz [94].

Delecja w którymkolwiek z operonów biosyntezy LPS daje fenotyp szorstki LPS, pozbawiony antygenu O [70, 72].

Analiza sekwencji genów kodujących nukleotydowe prekursory cukrów podjednostek O antygenu wskazuje, że pochodzą od wspólnego przodka lecz trudno jest wyjaśnić znacznie większe zróżnicowanie wśród genów

kodujących glikozyklotransferazy. Przypuszczalnie obie grupy genów wywodzą się z dwu klastrów występujących u wspólnego przodka charakteryzującego się niską zawartością G+C [72, 86].

Porównawcza analiza sekwencji par odpowiednich genów operonu *rfb* i genów rdzeniowych (housekeeping) w *S. enterica* i *E. coli* dowodzi, że ewolucja tych pierwszych, następowała znacznie szybciej m.in. na skutek selektywnego działania środowiska [42, 72]. Obecnie obserwowane zróżnicowanie antygenów O jest wynikiem rekombinacji między blisko spokrewnionymi szczepami, np. *E. coli* O157:H7 i *E. coli* O55:H7 [86]. Porównanie sekwencji klastrów kodujących syntezę antygenów O *E. coli* O118 i *E. coli* O151 wykazało, że te serotypy różnią się tylko dwoma (na 13 283) nukleotydami, co wskazuje na ich klonalność. Prowadzone są dalsze badania w celu wyjaśnienia podstaw molekularnych zróżnicowania strukturalnego i immunologicznego antygenów somatycznych szczepów EHEC [43].

Zróżnicowanie genomów enterokrwotocznych *E. coli* określone przy pomocy techniki ALP (ALP, Amplicon Length Polymorphism) szczepów izolowanych ze środowiska i referencyjnych ATCC 35218 (serotyp O niekreślony), ATCC 25922 (serotyp O6), ATCC 35150 (serotyp O niekreślony) potwierdza, że rearanżacje genomu są spowodowane poziomym transferem genów bądź utratą plazmidu/(ów) [67].

Wyjściowym substratem w biosyntezie perozaminy jest fruktozo-6-fosforanu. Ostatni etap syntezy przebiega z udziałem aminotransferazy (syntetazy) RfbE (Per), przekształcającej GDP-4-keto-6-deoksymannnozę do GDP-D-perozaminy [2]. Wysoki procent podobieństwa (54% na poziomie sekwencji aminokwasowej) genu $rfbE_{O157:H7}$ (syntetaza D-perozaminy) i *rfbE Vibrio cholerae* wskazuje, że gen *rfbE* w szczepach *E. coli* O157:H7 został nabyty od gatunków innych niż *E. coli* [8]. Produkt genu *rfbE* ulega ekspresji w szczepach *E. coli* O157, które nie wytwarzają toksyn i mają antygeny rzęskowe inne niż H7. Natomiast szczepy *E. coli* O157:H7, wytwarzające toksyny są blisko spokrewnione z serotypem *E. coli* O55:H7. Dlatego w wątpliwych przypadkach wyniki testów serologicznych należy potwierdzać identyfikacją produktu genu $rfbE_{O157:H7}$ [72].

Innym markerem genetycznym locus *rfb*, który poza genem $rfbE_{O157:H7}$ może być wykorzystany w diagnostyce szczepów O157 jest gen epimerazy *gne*. Składanie podjednostek antygenu O *E. coli* O157 nie rozpoczyna się od reakcji katalizowanej przez inicjującą transferazę WecA, która przenosi GalNAc-P z UDP-GalNAc (difosfourydynogalaktozamina) z utworzeniem GalNAc-P-P-Und (nośnik galaktozaminylo-difosfo-undekaprenylowy, C55) lecz odbywa się w innym szlaku. Szlak ten rozpoczyna się od przeprowadzanej przez białko WecA syntezy Und-P-P-GlcNAc, który zostaje przekształcony do GalNAc-P-P-Und przez swoistą epimerazę, kodowaną przez gen *gne1* (*Z3206*). Homologia na poziomie sekwencji aminokwasowej epimeraz różniących się funkcją dowodzi, że enzym z *E. coli* O157 tworzy klaster z genami *gne* tych bakterii, w których cukrem inicjującym biologicznej powtarzającej się jednostki jest GalNAc, np. większość serotypów *Y. pseudotuberculosis*. Dla genu o funkcji Und-P-P-GlcNAc C4 epimerazy zaproponowano nazwę *gnu*. Rozważane jest wykorzystanie genu *gnu* lub jego produktu jako potencjalne miejsce docelowe dla leków blokujących biosyntezę antygenów O szczepów, takich jak serogrupa O157, w których GalNac jest cukrem redukującym podjednostki [21, 71].

Analiza filogenetyczna szczepów *E. coli* O157 pochodzących z różnych środowisk wskazuje, że cechy determinujące chorobotwórczość są związane z określonym serotypem [8] oraz ze środowiskiem. W przypadku serotypu O157, który powszechnie występuje w przewodzie pokarmowym bydła, owiec, jeleni, żyraf i innych zwierząt chorobotwórczość dotyczy prawie wyłącznie ludzi. Inne przykłady to szczepy należące do serotypów O2 i O78, chorobotwórcze dla ptactwa ale nie dla ludzi, których markerami wirulencji są plazmidowe i chromosomalne allele genu *iss* (Increased Serum Survival) oraz gen *tsh* (Temperature-sensitive Hemagglutinin) kodujący temperaturowrażliwą hemaglutyninę, a także szczepy należące do serogrupy O147, izolowane wyłącznie od świń, w których geny wirulencji (*fedA)* kodują fimbrie F18 [24, 75].

Badania czynników wirulencji ujawniły, że szczep dzikiego typu O157 wykazywał znacznie słabszą adherencję do komórek HeLa i komórek nabłonka jelitowego w porównaniu do mutanta w genie $rfbE_{EcO157:H7}$ [8]. W przypadku mutanta *rfbE E. coli* O157:H7 obniżona była natomiast przeżywalność w jelitach myszy i bydła [79].

Uzyskano dowody wskazujące na związek metabolizmu D-sorbitolu z biosyntezą LPS w *E. coli* K-12 i nie jest wykluczone, że różnica zdolności fermentacji tego alkoholu cukrowego ma związek z ekspresją antygenów O157 LPS [51].

W ostatnim czasie w badaniach efektów biologicznych wykorzystywane są bezkręgowce ze względu na problemy etyczne i koszt badań na zwierzętach gnotobiotycznych. Mimo braku mechanizmów odporności adaptacyjnej mają one analogiczny do kręgowców system odporności wrodzonej, w którym podstawową rolę pełnią białka odpornościowe [40]. Owady produkują białka podobne do cytokin, które aktywują ekspresję białek i peptydów działających przeciw bakteriom, grzybom, pasożytom i wirusom [87].

Udział antygenu O157 w wirulencji został w sposób jednoznaczny udokumentowany na modelu nicienia, *Caenorhabditis elegans*. Mutanty delecyjne (*ΔperA*), niezdolne do syntezy perozaminy a tym samym antygenu O nie kolonizowały jelit i nie zabijały *C. elegans.*

W podobny sposób zachowywały się szczepy pozbawione plazmidu wirulencji pO157 [99]. Na modelu larw jedwabnika morwowego oraz na myszach wykazano, że aktywność letalna mutantów delecyjnych w genie *rfbE* lub w *waaL*, (kodującym ligazę antygenu O, przyłączającą łańcuch O do rdzenia połączonego z lipidem A) jest znacznie zredukowana. Ponadto, szczepy szorstkie okazały się bardziej wrażliwe na morycynę – defenzynę hemolimfy jedwabnika oraz na normalną surowicę kregowca (świni). Rekombinanty *in trans* miały fenotyp jak szczep wyjściowy. Model jedwabnika morwowego ma tę przewagę nad modelem nicienia, że może być hodowany i zakażany przez EHEC O157:H7 w temperaturze 37°C, właściwej dla ssaków [52].

Mutant *E. coli* O157 w genach *galETKM* kodujących syntezę N-acetylo-D-galaktozaminy, niezdolny do syntezy galaktozy i niemal całkowicie pozbawiony łańcucha O swoistego, nie kolonizował nabłonka jelitowego królika i był wrażliwy na białko BPI [30].

Znaczący spadek przeżywalności w układzie moczowym myszy wykazywały mutanty w genie *wecA* [4] i genie *waaL* uropatogennych szczepów *E. coli* [9].

Bezpośredni udział LPS szczepów EHEC wyizolowanych od dzieci z zespołem HUS udowodniono badając aktywację płytek *via* kompleks TLR4 i CD62. Sądzi się, że ta droga aktywacji odpowiada za niszczenie płytek w tym zespole [84].

Składniki powierzchniowe chorobotwórczych wariantów *E. coli* pełnią ważne funkcje także w interakcji z roślinami. Badano korelacje występujące między strukturami rozpoznawanymi jako markery bakterii patogennych PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) takimi jak, curli, rzęski, LPS i egzopolisacharydy a systemową (SAR; Systemic Acquired Resistance) i indukowaną (ISR; Induced Systemic Resistance) odpornością roślin w związku z preferencyjną kolonizacją tkanek owoców i warzyw przez chorobotwórcze patotypy *E. coli*, w szczególności serotyp O157. Ze strony rośliny w odpowiedzi uczestniczą receptory PRRs (Pattern Recognition Receptors), których rozpoznanie inicjuje pierwszorzędową reakcję obronną, jak odkładanie kalozy, produkcja reaktywnych form tlenu i białek obronnych powodujących hamowanie kolonizacji tkanki roślinnej. Wobec patogenów zdolnych do sekrecji białek efektorowych, rośliny wytworzyły drugorzędową odpowiedź obronną (SDR, Secondary Defense Responses), włącznie z aktywacją białek odpornościowych (RPs; Resistance Proteins) hamujących efektory i włączających odpowiedź obronną z udziałem białek RP.

Mutanty delecyjne w genach rzęsek, curli oraz w genie *waaI* (kodującym białko hyperadherencji) oraz mutanty syntetyzujące skróconą formę antygenu O LPS kolonizowały rośliny bardziej efektywnie, a znacznie słabiej przeżywały na roślinach, co było związane z ich obniżoną zdolnością indukcji ekspresji genów białek PR. Otrzymane wyniki potwierdzają pierwszorzędną rolę struktur rozpoznawanych przez receptory organizmu gospodarza w zdolności bakterii do przeżywania i kolonizacji tkanek zwierzęcych i roślinnych [76].

6. Antygeny H serotypu O157

Innym markerem wykorzystywanym w identyfikacji szczepów O157 jest polimorfizm genu *fliC* kodującego białko strukturalne rzęsek. Do tego celu stosowana jest technika RFLP-PCR (Restriction Fragments Length Polymorphism, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) i sekwencjonowanie produktów zwłaszcza, że dość często antygeny H nie ulegają ekspresji w warunkach *in vitro.* Zróżnicowanie genu dotyczy części wewnętrznej między konserwatywnymi sekwencjami C i N końców flageliny. Badano sekwencje genu $fliC_{H7}$ w szczepach O157:H7 i O157:H$^-$. Szczepy izolowane z kału bydła, świń i owiec chorych na biegunkę reprezentowały tzw. atypowy serotyp antygenu H. DNA części szczepów nie dawała produktu ze starterami *fliC* a ich rzęski były kodowane prawdopodobnie przez inne geny flagelarne np. *flnA*, *flkA* i *flmA*. Pozostała część szczepów miała inne, dotąd nieopisane geny rzęskowe [23].

W surowicy dorosłych osobników bydła przed szczepieniem bakteriami *E. coli* O157:H7 zidentyfikowano przeciwciała przeciw: LPS O157, intyminie, Tir, białkom EspA i EspB (*E. coli*-secreted proteins). Po szczepieniu rósł poziom tylko dwu: anty-EspB i anty-LPS [12]. Zaobserwowano względnie szybki spadek poziomu przeciwciał anty-*E. coli* O157; 10–11 tygodni dla przeciwciał IgG i 4 tygodnie dla przeciwciał klasy IgA, co ma znaczenie w czułości detekcji, podatności na powtórne zakażenie oraz produkcji szczepionek [45].

Ekspresja genów regulatorowych rzęsek (geny *flhDC*) i położonych poniżej genów związanych z wirulencją; adhezja i system T3SS jest kontrolowana przez białko regulatorowe Lrp (Leucine-responsive Regulatory Protein) w odpowiedzi na podwyższony poziom krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (głównie kwasu masłowego) występujących w jelitach [89].

7. Identyfikacja *E. coli* O157

Enterokrwotoczne *E. coli* O157 wykazują typowe cechy fizjologiczne i biochemiczne komensalnych *E. coli* z trzema wyjątkami, wykorzystywanymi w ich identyfikacji. Większość szczepów serotypu O157:H7 w przeciwieństwie do komensalnych szczepów *E. coli* nie rośnie wcale lub rośnie bardzo słabo w temperaturze 44,5°C, przy czym optymalna temperatura wzrostu *E. coli* O157 wynosi 36 ± 2°C a minimalna 8–10°C. Dwie pozostałe cechy odróżniające *E. coli* O157 od szczepów

komensalnych to brak wytwarzania β-glukuronidazy kodowanej przez gen *uidA* (*gusA*) oraz brak zdolności fermentacji D-sorbitolu (D-glucitolu) w ciągu doby. Bakterie te tolerują niskie pH; mogą przeżyć do 2 miesięcy w temperaturze 4°C w żywności o pH 4,5 [17].

Identyfikacja szczepów *E. coli* O157:H7 metodą hodowlaną polega na wysiewaniu badanego materiału na podłoże z D-sorbitolem – SMAC (sorbitol Mac-Conkey). Selektywność i czułość tej metody można zwiększyć stosując czynniki selekcyjne: cefeksim i telluryt potasu (agar SMAC-CT), preinkubacja w ciągu 2 godz. w pH 2,0 w bulionie EEB (Enterohemorrhagic *E. coli* Enrichment Broth) czy separacja immunomagnetyczna z pomocą kulek paramagnetycznych pokrytych przeciwciałami monoklonalnymi anty-*E. coli* O157. Metodą, która daje powtarzalne wyniki, kompatybilne z uzyskanymi sposobem wzbogaconej selekcji i dające się stosować w badaniach przesiewowych jest PCR z sondą fluorogenną najczęściej dla genu *eaeA* [57]. W celu potwierdzenia identyfikacji izolatów niefermentujących sorbitolu przeprowadza się reakcję Real Time PCR ze starterami dla genów eae_{O157}, $rfbE_{O157}$ i *fliC* [78].

Obok elektroforezy pulsacyjnej (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis) jedną z metod różnicowania blisko spokrewnionych szczepów jest niedawno opracowana technika analizy polimorfizmu wielkości amplikonu (ALP), oparta na zastosowaniu precyzyjnie wybranych starterów w oparciu o tzw. wskaźnik genomowy ("genetic index") ustalany dla kompletnie zsekwencjonowanych szczepów. W przypadku *E. coli* O157 do ustalenia indeksu wybrano genomy dwu referencyjnych szczepów O157: O157:H7 EDL933 i O157:H7B Sakai oraz odnośny szczep laboratoryjny *E. coli* K-12 MG1655 [67].

Jednym z problemów różnicowania szczepów *E. coli* O157:H7 jest ich bliskie pokrewieństwo ze szczepami *E. coli* O157:NM, (NM, Non-motile) nie wykazującymi ruchu, fermentującymi sorbitol i wytwarzającymi β-glukuronidazę. Są one izolowane prawie wyłącznie od dzieci (ok. 20% przypadków zespołu HUS) i nie są wykrywane na podłożu (SMAC). Markerem wykorzystywanym do ich identyfikacji jest klaster genów *sfp,* kodujący fimbrie Sfp, obecne wyłącznie w szczepach *E. coli* O157 fermentujących sorbitol (SF) [96]. Szczepy fermentujące sorbitol O157:NM są szczególnym zagrożeniem ze względu na wysoką częstość nabywania genu *stx2* w wyniku lizogenizacji fagami (np. φ297) ulegającymi integracji w genie *yecE* („hot spot") [50].

Szczepy O157:NM są bliżej spokrewnione z O157:H7 aniżeli szczepy O157 wykazujące ruch i wytwarzające antygeny flagelarne inne niż H7. Dodatkowymi cechami szczepów *E. coli* O157 z antygenami rzęskowymi innymi niż H7 jest polimorfizm dotyczący ponad 20 enzymów, a także brak toksyn Stx1 i Stx2 oraz intymny.

8. Epidemie EHEC *E. coli* przenoszące się drogą wodną

W ostatnich latach przypadki zakażeń EHEC często mają charakter epidemii. Centrum Kontroli Chorób i Prewencji (CDC) podaje liczbę 75 000 przypadków rocznie w Europie. Najczęstszym źródłem zakażeń jest żywność; w USA stanowią one 66% przypadków. Około 12% to infekcje związane ze spożyciem wody pitnej [18] lub jako efekt przypadkowego połknięcia wody w trakcie kąpieli w jeziorach lub basenach [13].

Dane literaturowe potwierdzają rosnącą liczbę przypadków zachorowań, wywoływanych przez *E. coli* O157, przenoszących się drogą wodną (Tab. I). Źródłem zakażenia jednej z najwcześniej odnotowanych epidemii (na przełomie 1989/1990 roku) w USA (Missouri) była niedezynfekowana woda przeznaczona do spożycia [85]. Kolejne epidemie, miały miejsce w USA (Wyoming) źródłem zakażenia była woda do picia z ujęć powierzchniowych [61]. W roku 1999 w Nowym Jorku źródłem zakażenia była woda do picia z ujęć podziemnych [11] oraz podczas jednej z największych epidemii w roku 2000 w Kanadzie (Walkerton) kiedy zachorowało aż 2300 osób [32]. Pierwszą epidemię, której źródłem była woda z kąpielisk odnotowano w USA (Oregon) w roku 1991 [39].

Tabela I
Epidemie *E. coli* O157:H7 przenoszące się drogą wodną

Miejsce i rok	Liczba zachorowań	Źródło	Piśmiennictwo
Cabool, Missouri, USA, 1989/1990	243	woda do picia	[85]
Portland, Oregon, USA, 1991	21	jezioro	[39]
Szkocja, Wielka Brytania, 1993	6	basen	[13]
Alavus, Finlandia, 1997	14	jezioro	[62]
Alpine, Wyoming, USA, 1998	157	woda do picia	[61]
Nowy Jork, USA, 1999	775	woda do picia	[11]
Walkerton, Ontario, Kanada, 2000	2300	woda do picia	[32]
Kornwalia, Wielka Brytania, 2004	7	plaża	[33]

W Europie infekcje spowodowane enterokrwotoczną *E. coli* O157 są rzadziej rejestrowane. W corocznym raporcie Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) stwierdza się, że liczba przypadków zakażeń Shigatoksycznymi szczepami *E. coli* jest na czwartym miejscu po zakażeniu *Campylobacter*, *Salmonella* i *Yersinia*. W 24 państwach Unii Europejskiej (z wyjątkiem Czech, Grecji oraz Portugalii) oraz w krajach spoza UE: Norwegii, Szwajcarii, Islandii – wykazano ponad 3500 przypadków zakażeń ludzi szczepami EHEC/STEC, najwięcej w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Holandii i Irlandii. Szeroko opisywaną w mediach epidemię odnotowano w 2011 w Niemczech, w której czynnikiem etiologicznym był szczep *E. coli* O104:H4 wykazujący cechy *E. coli* EHEC i EAEC (Enteroaggregative *E. coli*). Zachorowało wówczas ponad 4 tys. osób. Źródłem epidemii były nasiona kozieradki [90].

9. Zapobieganie

Ważnym działaniem prewencyjnym jest eliminacja chorobotwórczych bakterii *E. coli* O157 z przewodu pokarmowego zwierząt nosicieli. Dodatek do pasz np. siarczanu neomycyny lub nizyny w połączeniu z sorbinianem sodu lub z polimleczanem powoduje zmniejszenie wydzielania kałowego *E. coli* O157:H7 [15, 37].

Udowodniono, że podanie bakterii probiotycznych do hodowli komórkowych nabłonka jelitowego linii HEp-2 i T84 hamuje adhezję oraz zmiany cytoszkieletu indukowane przez szczepy *E. coli* O157:H7 i O127:H6 [80].

Zastosowanie jako szczepionki mutantów *E. coli* O157 w genach *hha* (białko regulujące ekspresję hemolizyny) i *sepB* (ATP-aza kontrolująca ekspresję LLE-kodowanych białek) powodowało wyraźną redukcję kolonizacji jelit bydła i wydzielania z odchodami szczepu dzikiego typu [77].

Podstawową rolę w zapobieganiu epidemiom odgrywa nadzór sanitarno-epidemiologiczny wody do picia i celów rekreacyjnych. Ze względu na istotne zagrożenie zdrowia i życia ludzi w przypadku zakażeń STEC ustanowiono dyrektywą 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego nakazującą wprowadzenie działań monitoringowych Shigatoksycznych szczepów *E. coli.* Ustawa o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz.U. 2008 nr 234) określa zgłaszanie każdego przypadku wykrycia Shigatoksycznych pałeczek *E. coli* O157 w materiale klinicznym. Jakość wody w kąpieliskach i przeznaczonej do spożycia jest w Polsce systematycznie kontrolowana zgodnie z harmonogramem pobierania próbek (dla kąpielisk zgodnie z zapisami ustawy – Prawo wodne Dz. U. z 2005 r. Nr 239).

10. Podsumowanie

Liczba publikacji na temat chorobotwórczości i epidemii wywoływanych przez enterokrwotoczne, Shigatoksyczne szczepy *E. coli* (STEC) z dominującym serotypem O157:H7 świadczy o rosnącym znaczeniu tych patogenów. W Polsce notuje się stosunkowo małą liczbę epidemii spowodowanych przez *E. coli* O157. Dane eksperymentalne potwierdzają, że bakterie *E. coli* O157 mają zdolność przeżywania w środowiskach ubogich w organiczne źródła węgla i w niskiej temperaturze nawet do kilku miesięcy. Infekcje spowodowane przez serotyp O157:H7 mogą być przyczyną zachorowań związanych z układem pokarmowym (perforacja i krwawienia z okrężnicy) i chorób pozajelitowych, jak zespół hemolityczno-mocznicowy – HUS.

Większość czynników determinujących wirulencję szczepów STEC jest kodowana przez geny zlokalizowane w wyspach patogenności na chromosomie (locus LEE) i na plazmidach wirulencji (plazmid pO157). Najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za zmiany histopatologiczne w jelitach i układzie moczowym jest toksyna Shiga i jej warianty kodowane przez geny fagowe. Pozostałe czynniki są kodowane przez locus LEE a ich ekspresja, podobnie jak genów toksyn może być regulowana przez czynniki zewnętrzne. Udokumentowano regulację ekspresji genów operonu *ecf* na plazmidzie pO157 przez temperaturę, która wpływa na pojawianie się określonych białek związanych z innymi składnikami powierzchniowymi bakterii, co ma związek z adaptacją do różnych środowisk.

Określenie serotypu *E. coli* jest jednym z najważniejszych kryteriów w badaniach epidemiologicznych. Analiza genetyczna operonu *rfb* biosyntezy antygenu somatycznego i immunochemiczna LPS szczepów serogrup O157 i nie-O157 ujawniła zróżnicowanie na poziomie nukleotydowym i strukturalnym. Sekwencjonowanie genu *rfbE* kodującego syntetazę perozaminy, cukru wchodzącego w skład determinanty antygenowej wskazuje na nabycie tego genu w drodze poziomego transferu z bakterii innych niż *E. coli*. Podobieństwo sekwencji aminokwasowych epimerazy Gnu obecnej w szczepach zawierających jako cukier redukujący N-acetylogalaktozaminę, jak LPS *E. coli* O157 wskazuje na różne drogi ewolucji szlaków biosyntezy antygenów O szczepów STEC. Wyjaśnienie związku między czynnikami wirulencji a ekspresją określonego antygenu somatycznego wymaga dalszych badań. Porównanie struktury antygenów O i korelacji z ekspresją antygenów H w połączeniu z analizą genetyczną przybliży wyjaśnienie mechanizmów dopasowania struktur bakterii do gospodarza i środowiska. Wyniki analizy sekwencji genów rdzeniowych i nabytych w drodze poziomego transferu w szczepach patotypu EHEC wskazują na wielość dróg ewolucji tych patogenów.

Piśmiennictwo

1. Albermann C., Beuttler H.: Identification of the GDP-N-acetyl-D-perosamine producing enzymes from *Escherichia coli* O157:H7. *FEBS Letters*, **582**, 479–484 (2008)
2. Albermann C., Piepersberg W.: Expression and identification of the RfbE protein from *Vibrio cholerae* O1 and its use for the enzymatic synthesis of GDP-D-perosamine. *Glycobiol.* **11**, 655–661 (2001)
3. Barba J., Bustamante V.H., Flores-Valdez M.A., Deng W., Finlay B.B., Puente J.L.: A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* **187**, 7918–7930 (2005)
4. Bengoechea J.A., Pinta E., Salminen T., Oertelt C., Holst O., Radziejewska-Lebrecht J., Piotrowska-Seget Z., Venho R., Skurnik M.: Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O-antigen polymerase) of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J. Bacteriol.* **184**, 4277–4287 (2002)
5. Bettelheim K.A., Evangelidis H., Pearce J.L., Sowers E., Strockbine N.A.: Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* 0157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 760–761 (1993)
6. Betz J., Bielaszewska M., Thies A., Humpf H-U., Dreisewerd K., Karch H., Kim K.S., Friedrich A.W., Müthing J.: Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *J. Lipid Res.* **52**, 618–634 (2011)
7. Bielaszewska M., Schmidt H., Liesegang A., Prager R, Rabsch W, Tschäpe H, Cízek A, Janda J, Bláhová K, Karch H: Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H$^-$ strains and a source of human diseases. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3470–3473 (2000)
8. Bilge S.S., Vary, J.C. Jr., Dowell S.F., Tarr P.I.: Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.* **64**, 4795–4801 (1996)
9. Billips B.K., Schaeffer A.J., Klumpp D.J.: Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder. *Infect. Immun.* **76**, 3891–3900 (2008)
10. Blanco M., Schumacher S., Tasara T., Zweifel C., Blanco J.E.**,** Dahbi G., Blanco J., Stephan R.: Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene. *BMC Microbiol.* **5**, 23 doi:10.1186/1471-2180-5-23 (2005)
11. Bopp D.J., Limberger R.J. i wsp. : Detection, isolation and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 174–180 (2003)
12. Bretschneider G., Berberov E.M., and Moxley R.A.: Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **118**, 229–238 (2007)
13. Brewster D.H., Brown M.I., Robertson D., Houghton G.L., Bimson J., Sharp J.C.M.: An outbreak of *Escherichia coli* 0157 associated with a children's paddling pool. *Epidenmiol. Infect.* **112**, 441–447 (1994).
14. Brunder W., Karch H., Schmidt H.: Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H$^-$strain 3072/96. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 467–474 (2006)
15. Callaway T.R., Andersen R.C., Edrington T.S, Genovese J.K., Bischoff M.K.,.Poole L.T., Jung S.Y., Harvey B.R., Nisbet J.D.: What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J. Anim. Sci.* **82** (E. suppl.), E 93–99 (2004)
16. Carol G. Currie, Ian R. Poxton: The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**, 57–62 (1999)
17. Carter M.Q., Brandl M.T., Louie J.W., Kyle J.L., Carychao D.K., Cooley M.B., Parker C.T., Bates A.H., Mandrell R.E.: Distinct acid resistance and survival fitness displayed by curli variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3685–3695 (2011)
18. Chauret C.: Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence*, **2**, 593–601 (2011)
19. Clotilde L.M., Bernard C. 4th, Salvador A., Lin A., Lauzon C.R, Muldoon M., Xu Y., Lindpaintner K., Carter J.M: A 7-plex microbead-based immunoassay for serotyping Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Meth.* **92,** 226–230 (2013)
20. Cornick N.A., Booher S.L., Casey T.A., Moon H.W.: Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4926–4934 (2000)
21. Cunneen M.M., Liu B., Wang L., Reeves P.R.: Biosynthesis of UDP-GlcNAc, UndPP-GlcNAc and UDP-GlcNAcA involves three easily distinguished 4-epimerase enzymes, Gne, Gnu and GnaB. *PLoS ONE,* **8**, e67646. doi:10.1371/journal.pone.0067646 (2013)
22. Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A., Sikorska I., Boszczyk-Maleszak H., M. Horoch M.: Survival of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in water and in bottom-shore sediments. *Polish J. Environ. Studies*, **14**, 423–430 (2005)
23. de Moura C., Tiba M.R., da Silva M.J., Leite D.S.: Identification of new flagellin-encoding *fliC* genes in *Escherichia coli* isolated from domestic animals using RFLP-PCR and sequencing methods. *Pesq. Vet. Bras.* **33**, 417–422 (2013)
24. DebRoy C., Roberts E.: Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**, 597–600 (2006)
25. Fere W. A., Hovde C.J.: Antiviral activity of Shiga toxin 1: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect. Immun.* **68,** 4462–4469 (2000)
26. Gallegos K.M., Conrady D.G., Karve S.S., Gunasekera T.S., Herr A.B., Weiss A.A.: Shiga toxin binding to glycolipids and glycans. *PLoS ONE,* **7**, 1–10 (2012)
27. Garcia A., Fox J.G., Besler T.E.: Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a one health perspective. *ILAR J.* **51**, 221–232 (2010)
28. Gurtler J.B., Douds D.D. Jr., Dirks B.P., Quinlan J.J., Nicholson A.M., Phillips J.G., Niemira B.A.: *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 survival in soil and translocation into leeks (*Allium porrum*) as influenced by an arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*). *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1813–1820 (2013)
29. Herrera-Luna C., Klein D., Lapan G., Revilla-Fernandez S., Haschek B., Sommerfeld-Stur I., Moest K., Baumgartner W.: Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Veterinarni Medicina,* **54**, 1–11 (2009)
30. Ho T.D., Waldor M.K.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *gal* mutants are sensitive to bacteriophage P1 and defective in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **75**, 1661–1666 (2007)
31. Honda N, Iyoda S, Yamamoto S, Terajima J., Watanabe H.: LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol. Microbiol.* **74**, 1398–1411 (2009)
32. Hrudey S.E., Payment P., Huck P.M., Gillham R.W., Hrudey E.J.: A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* **47**, 7–14 (2003)

33. Ihekweazu C., Barlow M., Roberts S., Christensen H., Guttridge B., Lewis D., Paynter S.: Outbreak of *E. coli* O157 infection in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches. *Eurosurveillance*, **11,** 128–130 (2006)
34. Iyoda S., Honda N., Saitoh T., Shimuta K., Terajima J., Watanabe H., Makoto Ohnishi M.: Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **79**, 4628–4637 (2011)
35. Jenkins M.B., Fisher D.S., Endale D.M., Adams P.: Comparative die – off of *Escherichia coli* O157:H7 and fecal indicator bacteria in pond water. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 1853–1858 (2011)
36. Jerse AE, Gicquelais K.G., Kaper J.B.: Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**, 3869–3875, (1991)
37. Jin T., Zhang H., Boud G.: Incorporation of preservatives in polylactic acid films for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and extending microbiological shelf life of strawberry puree. *J. Food Protect.* **73**, 812–818 . (2010)
38. Karmali M.A.: Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **26**, 117–122 (2004)
39. Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C., Hedberg K., Oxman G.L., Barrett T.J., Pfaller M.A., Fleming D.W.: A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Eng. J. Med.* **331**, 579–584 (1994)
40. Lehrer R.I., Ganz T.: Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 96–102 (2002)
41. Lim J.Y., Sheng H., Seo S.H., Park Y.H., Hovde C.J.: Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 plasmid O157 deletion mutant and its survival and persistence in cattle. *Appl. Environ. Microbiol*. **73**, 2037–2047 (2007)
42. Liu B., Perepelov A.V., Li D., Senchenkova S.N. Han Y., Shashkov A.S., Feng L., Knirel Y.A., Wang L.: Structure of the O-antigen of *Salmonella* O66 and the genetic basis for similarity and differences between the closely related O-antigens of *Escherichia coli* O166 and *Salmonella* O66. *Microbiol.* **156**, 1642–1649 (2010)
43. Liu Y., Fratamico P., DebRoy C., Bumbaugh A.C. Allen J.W.: DNA sequencing and identification of serogroup-specific genes in the *Escherichia coli* O118 O antigen gene cluster and demonstration of antigenic diversity but only minor variation in DNA sequence of the O antigen clusters of *E. coli* O118 and O151. *Foodborne Pathog. Dis.* **5**, 449–457 (2008)
44. Łoś J.M., Węgrzyn G.: Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* EHEC i bakteriofagi kodujące toksyny Shiga. *Post. Mikrobiol.* **50**, 175–190 (2011)
45. Ludwig K., Bitzan M., Bobrowski C., Müller-Wiefel D.E.: *Escherichia coli* O157 fails to induce a long-lasting lipopolysaccharide-specific, measurable humoral immune response in children with hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **186**, 566–569 (2002)
46. Mangeney M., Lingwood C.A., Taga S., Caillou B., Tursz T., Wiels J.: Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Res.* **53,** 5314–5319 (1993)
47. Marcela A., Prado V.: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* **3**, 105–115 (2003)
48. Maurer J.J., Schmidt D., Petrosko P., Sanchez S., Bolton L., Lee M.D.: Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol*. **65**, 2954–2960 (1999)
49. McGee P., Bolton D.J., Sheridan J.J., Earley B., Kelly G., Leonard N: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 706 (2002)
50. Mellmann A., Lu S., Karch H., Xu J-G., Harmsen D., Schmidt M.A., Bielaszewska M.: Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl. Environ. Microbiol*. **74**, 67–72 (2008)
51. Meredith T.C., Woodartd R.W.: Identification of GutQ from *Escherichia coli* as a D-arabinose 5-phosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **187**, 6936–6942 (2005)
52. Miyashita A., Iyoda S., Ishii K., Hamamoto H., Sekimizu K., Kaito C.: Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.* **333**, 59–68 (2012)
53. Munera D., Crepin V. F., Marches O., and Gad F. N-terminal type III secretion signal of enteropathogenic *Escherichia coli* translocator proteins. *J. Bacteriol.* **192**, 3534–3539 (2010)
54. Navarro A., Eslava C., de la Torre G.G., León L.A., Licona D., León L., Zarco L.A., Cravioto A.: Common epitopes in LPS of different *Enterobacteriaceae* are associated with an immune response against *Escherichia coli* O157 in bovine serum samples. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1447–1454 (2007)
55. Newton H.J., Hartland E.L. i wsp.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg. Infect. Dis*. **15**, 372–380 (2009)
56. O'Brien A.D., Tesh V.L., Donohue-Rolfe A., Jackson M.P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A.A., Keusch G.T.: Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **180**, 65–94 (1992)
57. Oberst R.D., Hays M.P., Bohra L.K., Phebus R.K., Sargeant J.M.: Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces using a polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease (TaqMan^{R}) detection assay after secondary enrichment. *J. Vet. Diagn. Invest*. **15**, 543–552 (2003)
58. Ogura Y., Frankel G. i wsp.: TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. *Infect. Immun*. **75**, 604–612 (2007)
59. Ogura Y., Hayashi T. i wsp.: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17939–17944 (2009)
60. Oliveira M., Vinas I., Usall J., Anguera M., Abadias M.: Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 133–140 (2012)
61. Olsen S.J., Miller G., Breuer T., Kennedy M., Higgins C., Walford J., McKee G., Fox K., Bibb W., Mead P.: A Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg. Infect. Dis*. **8**, 370–375 (2002)
62. Paunio M., Pebody R., Keskimaki M., Kokki M., Ruutu P., Oinonen S., Voutari V., Siitonen A. , Lathi E., Leinkki P.: Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 *Epidemiol. Infect*. **122**, 1–5 (1999)
63. Perry M.B., MacLean L., Griffith D.W.: Structure of the O-chain polysaccharide of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide of *Escherichia coli* 0:157:H7. *Biochem. Cell Biol*. **64**, 21–28 (1986)
64. Pupo E., Lindner B., Brade H. Schromm A.B.: Intact rough- and smooth-form lipopolysaccharides from *Escherichia coli* separated by preparative gel electrophoresis exhibit differential biologic activity in human macrophages. *FEBS J.* **280,** 1095–1111 (2013)
65. Ramachandran V., Brett K., Hornitzky M.A., Dowton M., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P.: Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J. Clin. Mirobiol*. **41**, 5022–5032 (2003)
66. Reid S.D., Herbelin C.J., Bumbaugh A.C., Selander R.K., Whittam T.S.: Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, **406**, 64–67 (2000)
67. Rice W.C.: Application of Amplicon Length Polymorphism to differentiate amongst closely related strains of bacteria. *Curr.*

Res Technol. Edu Topics Appl Microbio Microbial Biotechnol. A. Mendes-Villas Ed. 1509–1516 (2010)
68. Rooks D.J., Libberton B., Woodward M.J., Heather E., Allison H.A., McCarthy A.J.: Development and application of a method for the purification of free shigatoxigenic bacteriophage from environmental samples. *J. Microbiol. Meth*. **91**, 240–245 (2012)
69. Rothrock M.J., Frantz J.M., Burnett S.: Effect of volumetric water content and clover (*Trifolium incarnatum*) on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a soil matrix. *Curr. Microbiol.* **65**, 272–283 (2012)
70. Rump L.V., Feng P.C.H., Fischer M., Monday S.R.: Genetic analysis for the lack of expression of the O157 antigen in an O rough:H7 *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **76,** 945–947 (2010)
71. Rush J.S., Alaimo C., Robbiani R., Wacker M., Waechter C.J.. A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenol to GalNAc-P-P-undecaprenol in *Escherichia coli* O157. *J. Biol. Chem.* **285**, 1671–1680 (2010)
72. Samuel G., Hogbin J-P., Wang L., Reeves P.R.: Relationships of the *Escherichia coli* O157, O111, and O55 O-Antigen gene clusters with those of *Salmonella enterica* and *Citrobacter freundii*, which express identical O antigens. *J. Bacteriol.* **186**, 6536–6543 (2004)
73. Samuel G., Reeves P.: Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr. Res.* **338**, 2503–2519 (2003)
74. Sato T., Shimizu T., Watarai M., Kobayashi M., Kano S., Hamabata T., Takeda Y., Yamasaki S.: Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J. Bacteriol.* **185**, 3966–3971 (2003)
75. Schierack P., Steinrück H., Kleta S., Vahjen. W.: Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6680–6686 (2006)
76. Seo S., Matthews K.R.: Influence of the plant defense response to *Escherichia coli* O157:H7 cell surface structures on survival of that enteric pathogen on plant surfaces. *Appl. Environ. Microbiol*. **78**, 5882–5889 (2012)
77. Sharma V.K., Dean-Nystrom E.A., Casey T.A.: Evaluation of *hha* and *hha sepB* mutant strains of *Escherichia coli* O157:H7 as bacterins for reducing *E. coli* O157:H7 shedding in cattle. *Vaccine,* **29**, 5078–5086 (2011)
78. Sharma V.K.: Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Cell. Probes,* **20**, 298–306 (2006)
79. Sheng H., Lim J.Y., Watkins M.K., Minnich S.A., Hovde C.J.: Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen deletion mutant and effect of the deletion on bacterial persistence in the mouse intestine and colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Appl. Environ. Microbiol*. **74**, 5015–5022 (2008)
80. Sherman P.M., Johnson-Henry K.C., Yeung H.P.,. Ngo P.S.C., Goulet J., Tompkins T.A. :Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect. Immun.* **73**, 5183–5188 (2005)
81. Simon K., Janocha J.: Epidemia EHEC (*Escherichia coli* O104:H4) w Europie w 2011 roku – problemy kliniczne i terapeutyczne. *Przegl. Epidemiol.* **66**, 73–77 (2012)
82. Smith D.L., Wareing B.M., Fogg P.C.M., Riley L.M., Spencer M., Cox M.J., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E.: Multilocus characterization scheme for Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 8032–8040 (2007)
83. Sobieszczańska B.M., Gryko R.: Typy adhezji szczepów *Escherichia coli* izolowanych z przypadków biegunek. *Przegl. Epidemiol.* **55**, 287–297 (2001)
84. Ståhl A., Svensson M., Mörgelin M., Svanborg C., Tarr P.I., Mooney J.C., Watkins S.L., Johnson R., Karpman D.: Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood*, **108**, 167–176 (2006)
85. Swerdlow D.L., Wells J.G. i wsp.: A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* **117**, 812–819 (1992)
86. Tarr P.I., Schoening L.M., Yea Y-L., Ward T.R., Jelacic S., Whittam T.S.: Acquisition of the *rfb-gnd* cluster in evolution of *Escherichia coli* O55 and O157. *J. Bacteriol.* **182**, 6183–6191 (2000)
87. Tauszig S., Jouanguy E., Hoffmann J.A., Imler J.L.: Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10520–10525 (2000)
88. Timothy J. Johnson T.J., Nolan L.K.: Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 750–774 (2009)
89. Tobe T., Nakanishi N., Sugimoto N.: Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **79**, 1016–1024 (2011)
90. Truszczyński M., Pejsak Z.: Epidemia wywołana przez werotoksyczny serotyp O104:H4 *Escherichia coli* za pośrednictwem żywności pochodzenia roślinnego. *Życie Wet*. **86**, 680–682 (2011)
91. Vinogradov E., Conlan J.W., Perry M.B.: Serological cross--reaction between the lipopolysaccharide O-polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O157:H7 and strains of *Citrobacter freundii* and *Citrobacter sedlakii FEMS Microbiol. Letters*, **190,** 157–161(1998)
92. Vital M., Hammes F., Egli T.: Competition of *Escherichia coli* O157 with drinking water bacterial community at low nutrient concentrations. *Water Res*. **46**, 6279–6290 (2012)
93. Wang G., Clark C.G., Frank G., Rodgers F.G.: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*. **40**, 3613–3619 (2002)
94. Wang L., Huskic S., Cisterne A., Rothemund D., Reeves P.R.: The O-antigen gene cluster of *Escherichia coli* O55:H7 and identification of a new UDP-GlcNAc C4 epimerase gene. *J. Bacteriol*. **184**, 2620–2625 (2002)
95. Weiner M.: Shigatoksyczne enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* – nowe czy dobrze znane zagrożenie? *Życie Wet.* **86**, 507–514 (2011)
96. Werber D., Bielaszewska M., Frank C., Stark K., Karch H.: Watch out for the even eviler cousin – sorbitol – fermenting *E. coli* O157. *The Lancet*, **377**, 298–299 (2011)
97. Wieczorek K., Posse B., Osek J., Tatarczak M.: Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet. Microbiol.* **110**, 77–85 (2005)
98. Yoon J.W., Lim J.Y., Park Y.H., Hovde C.J.: Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7 (pO157) *ecf* operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infect. Immun.* **73**, 2367–2378 (2005)
99. Youn M., Lee K-M., Kim S.H., Lim J., Yoon J.W., Park S.: *Escherichia coli* O157:H7 LPS O-side chains and pO157 are required for killing *Caenorhabditis elegans Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436,** 388–393 (2013)
100. Zhang W., Bielaszewska M., Kuczius T., Karch H.: Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx_{1c}) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1441–1446 (2002)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 65–74
http://www.pm.microbiology.pl

BAKTERIOFAGI I DRAPIEŻNIKI BAKTERII JAKO CZYNNIKI LIMITUJĄCE LICZBĘ BAKTERII W ŚRODOWISKU

Anna Wierzbicka-Woś[1]*, Wiesław Deptuła[1]

[1] Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w lipcu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Bakteriofagi a bakterie w środowisku. 3. Bakterie drapieżne z grupy BALO a bakterie w środowisku. 4. Pierwotniaki a bakterie w środowisku. 5. Drapieżniki bakterii a biofilm. 6. Mechanizmy obronne bakterii oraz ich interakcje z drapieżnikami. 7. Praktyczne wykorzystanie drapieżników bakterii. 8. Podsumowanie

Bacteriophages and bacterial predators as agents limiting the amount of bacteria in the environment

Abstract: Bacterial predators, such as *Bdellovibrio* and *Bdellovibrio* like organisms (BALOs), protozoa and bacteriophages, are the major cause of bacterial mortality. Howeverthe correlations between these microorganisms enable their coexistance in the same ecological niche. This review presents the interactions between bacterial prey and their predators, and bacteriophages. In addition, it describes bacterial adaptations helping bacteria to prevent the attack. Taking into account current problems with increasing antibiotic resistance of pathogenic microorganisms, this observations can lead us to the discovery of novel antimicrobial compounds, which are common in nature, and could be used in the future against animal and human pathogens. Moreover, these microorganisms might be also a potentialsource of novel biocatalysts, which could be applied in biotechnological processes.

1. Introduction. 2. Bacteriophages and bacteria in the environment. 3. Bacterial predators from BALO and bacteria in the environment. 4. Protozoa and bacteria in the environment. 5. Bacterial predators and biofilm. 6. Defense mechanisms of bacteria and their interactions with predators. 7. Practical use of bacterial predators. 8. Summary

Słowa kluczowe: bakteriofagi, *Bdellovibrio* spp., biofilm, drapieżniki bakterii, pierwotniaki
Key words: bacteriophages, *Bdellovibrio* spp., biofilm, bacterial predators, protozoa

1. Wprowadzenie

Wśród zależności kooperacyjnych między organizmami, w tym mikroorganizmami, wyróżnia się m.in. neutralizm, komensalizm, współzawodnictwo, antagonizm, syntropizm oraz drapieżnictwo i pasożytnictwo. Interakcje między różnymi gatunkami mikroorganizmów promują silny wzrost i/lub dominację specyficznych ich grup, jednocześnie stanowiąc ważny element łączący różne grupy organizmów ze względu na możliwość ich współwystępowania na tym samym obszarze, dzięki czemu mogą koegzystować w danym środowisku. Ma to wpływ na różnorodność organizmów na danym obszarze oraz sprzyja obiegowi pierwiastków w przyrodzie [4, 19, 25]. W przedstawionej pracy przybliżono odziaływanie bakteriofagów, bakterii drapieżnych z grupy BALO obejmującej bakterie *Bdellovibrio* i organizmy do nich podobne (*Bdellovibrio* and like organisms) oraz pierwotniaków na populacje bakterii w środowisku, które wpływając pośrednio lub bezpośrednio na siebie nawzajem, w znacznym stopniu przyczyniają się do kontrolowania populacji bakterii w środowisku [7, 19, 39, 41, 50, 51]. Poznając te relacje przybliżamy się do poznania mechanizmów regulujących liczebność bakterii, w tym patogennych, co jest m.in. istotne w dobie walki z mikroorganizmami opornymi na stosowane obecnie antybiotyki i chemioterapeutyki.

Mikroorganizmy drapieżne wraz z bakteriami będącymi celem ich ataku, odgrywają w środowisku bardzo ważną rolę w tzw. pętli mikrobiologicznej, która stanowi zespół procesów odpowiedzialnych za transfer i udostępnianie rozpuszczonej w wodzie materii organicznej (*dissolved organic matter* – DOM) różnym mikro- i makroorganizmom heterotroficznym, tworzącym sieci troficzne w danym ekosystemie. Bakterie poprzez asymilację i biokonwersję DOM tworzą upostaciowaną tzw. cząsteczkową materię organiczną (*particulate organic matter* POM), która z kolei może być wykorzystana przez organizmy na innych poziomach troficznych, w tym m.in. bakterie z grupy BALO czy pierwotniaki [4, 25, 26, 33, 57]. Naturalna złożoność populacji mikroorganizmów charakteryzuje się ogromnym zróżnicowaniem, zarówno pod względem filogenetycznym, ale również pod względem ich stanu fizjologicznego i przystosowań fenotypowych komórek [26]. Z badań wynika, że największą śmiertelność bakterii w środowisku obserwuje się na skutek żerowania pierwotniaków, które są znacznie większe od swojej ofiary, dzięki czemu wykorzystują głównie mechanizm endocytozy umożliwiający pochłanianie w całości komórki bakteryjnej

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

[19, 25, 26, 27]. Jednakże wykorzystanie tego zjawiska wśród mikroorganizmów jest ograniczone wielkością ofiary, która musi być mniejsza od drapieżnika [5, 51]. Również bakteriofagi oraz bakterie drapieżne z grupy BALO są zaliczane do bardzo skutecznych czynników biologicznych limitującymi ilość bakterii w środowisku, choć mechanizm ich ataku jest odmienny ze względu na to, że są one mniejsze od komórki ofiary. Stąd w pierwszym etapie zachodzi przyleganie do powierzchni bakterii, a następnie wniknięcie czynnika infekującego do jej wnętrza, przy czym czas od wniknięcia do śmierci komórki bakteryjnej może być różny [11, 26, 27].

2. Bakteriofagi a bakterie w środowisku

Bakteriofagi (fagi) występują we wszystkich środowiskach. Szacuje się, że ich populacja wynosi ok. 10^{31} i stanowi najbardziej zróżnicowaną grupę jednostek biologicznych na świecie, przez co w bardzo istotny sposób wpływają i warunkują liczebność bakterii w różnych ekosystemach [31, 50, 57]. W środowisku wodnym ilość bakteriofagów waha się między 10^4 a 10^8 ml^{-1}, czyli występują 3–10 razy liczniej od bakterii [59]. Fagi atakując bakterie wykorzystują swoiste receptory na powierzchni komórki docelowej, wykazując specyficzność w stosunku do gospodarza. Przyłączenie się faga do komórki bakteryjnej przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap – dyfuzyjny transport faga – jest odwracalny i zależy od stężenia cząstek fagowych, temperatury otoczenia oraz od ilości komórek bakteryjnych w środowisku. Drugim etapem jest związanie się faga ze specyficznym receptorem na powierzchni komórki ofiary i enzymatyczne uszkodzenie ściany komórkowej, a następnie wprowadzenie do jej wnętrza materiału genetycznego faga i jest to proces nieodwracalny [57, 59]. Mimo, że bakteriofagi w większości przypadków wykazują specyficzność w stosunku do gatunku, a nawet szczepu gospodarza, to opisano również fagi o szerokim spektrum gospodarza np. wśród cyjanofagów infekujących morskie *Synechococcus* spp. [26]. Jednocześnie bakteriofagi są niekiedy rozpatrywane dwojako jako pasożyty lub drapieżniki [7, 11, 25, 26, 57], w zależności od strategii wykorzystywanej przez nie do ich replikacji. U bakteriofagów opisane zostały strategie tj. lizogenna, pseudolizogenna, chroniczna oraz lityczna. Genomy bakteriofagów będących w trakcie cyklu lizogennego pozostają w komórce gospodarza w formie utajonej – w postaci profaga – replikując razem z gospodarzem, aż do momentu przejścia w cykl lityczny, który może zostać zaindukowany różnymi czynnikami środowiskowymi, np. zmianą temperatury czy promieniowaniem UV [26, 57, 59, 60]. Jednocześnie geny profaga wbudowane w genom komórki gospodarza mogą wpływać na jego fenotyp w procesie tzw. konwersji lizogennej, przez co nadają komórce bakteryjnej nowych cech [2]. W stanie chronicznym cząstki fagowe są tworzone i uwalniane w sposób ciągły z zainfekowanej komórki gospodarza, nie prowadząc do jego lizy. W przypadku stanu pseudolizogennego materiał genetyczny bakteriofaga występuje w komórce niezintegrowany z genomem gospodarza, a jednocześnie w wyniku niekorzystnych warunków wzrostu bakterii, nie ma systemu utrzymywania swojego genomu w komórce bakteryjnej. Wykazano, że duża część bakteriofagów w populacji bakterii ma charakter lizogenny i stąd są one opisywane jako „pasożyty", ze względu na swoje uzależnienie od aktywnego aparatu metabolicznego gospodarza oraz występowanie z nim w formie zintegrowanej [2, 26, 60]. W cyklu litycznym, mimo konieczności wykorzystania maszynerii metabolicznej komórki atakowanej, metabolizm gospodarza jest przekierowywany na produkcję potomnych cząstek bakteriofagowych i cykl faga kończy się uwolnieniem ich ze zlizowanej w wyniku działalności enzymów fagowych komórki bakteryjnej. Dlatego też charakter tej relacji, określany jest niekiedy jako drapieżnictwo [7, 26, 57]. Fagi są więc czynnikami atakującymi biernie, choć swoiście. Co więcej liza komórek bakteryjnych wynikająca z aktywności faga jest drugim (po aktywności pierwotniaków) najważniejszym czynnikiem powodującym śmiertelność wśród bakterii [26, 59]. Stąd uważa się, że bakteriofagi mają duży wpływ na skład populacji bakterii, na produkcję DOM i obieg związków odżywczych pochodzenia bakteryjnego. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż śmiertelność bakterii w środowisku wodnym wywołana fagami zmienia się sezonowo (ze zmianą temperatury otoczenia i nasłonecznienia) oraz wraz z głębokością, na której występują [26, 57]. Badania w tym zakresie dotyczące innych środowisk są ograniczone, jednak duże ilości wirusów odnotowanych w osadach oraz glebach sugerują ich zasadniczą rolę w regulacji liczebności bakterii również w tych środowiskach [6, 26, 57]. Przyjmuje się, że mimo opisanej dużej ilości fagów wykazujących duże zróżnicowanie, nadal ogromna ich część nie została „odkryta" ze względu na to, że większość mikroorganizmów środowiskowych jest niehodowalna, w tym gospodarze fagów. Jednocześnie analiza różnorodności wirusów bakteryjnych w oparciu o sam materiał genetyczny jest trudna, z uwagi na brak wspólnych markerów genetycznych dla wszystkich bakteriofagów [50, 57].

3. Bakterie drapieżne z grupy BALO a bakterie w środowisku

Bakterie z grupy BALO zostały opisane po raz pierwszy w latach 60 i są one najlepiej scharakteryzowaną grupą bakterii drapieżnych, choć obecnie opi-

sanych jest już wiele innych grup organizmów prokariotycznych, prowadzących także drapieżny tryb życia [26]. Są one bardzo rozpowszechnione w wielu środowiskach, również ekstremalnych, oraz bardzo zróżnicowane pod względem filogenetycznym. Mikroorganizmy te początkowo zaliczane były do jednej rodziny *Bdellovibrionaceae*, jednakże dzięki zastosowaniu do identyfikacji nowoczesnych metod biologii molekularnej, opisano inne grupy, co przyczyniło się do ich reklasyfikacji [27]. Początkowo do grupy tych mikroorganizmów BALO zaliczano bakterie należące do czterech rodzajów to jest *Bdellovibrio*, *Bacterovorax*, *Micavibrio* oraz *Vampirovibrio*, które zaklasyfikowano do rodziny *Bdellovibrionaceae*, klasy δ-proteobacteria [18]. Analizy ostatnich lat wskazują jednak na ich większe zróżnicowanie [15, 16, 56] . Na chwilę obecną do klasy δ-proteobacteria zalicza się rodzaj *Bdellovibrio* i *Vampirovibrio* z rodziny *Bdellovibrionaceae* oraz rodzaj *Bacteriovorax* i nowo opisany rodzaj *Peredibacter* z rodziny *Bacteriovoracacea*, zaś do klasy α-proteobacteria należy rodzaj *Micavibrio*, który jest najbardziej spokrewniony z rzędem *Rhodospirialles* [14, 15, 56]. Dodać należy, że rodzaj *Vampirovibrio,* jako jedyny z rodziny *Bdellovibrionaceae,* żeruje nie na bakteriach, a na eukariotycznych komórkach alg z rodzaju *Chlorella* [18].

Bakterie z grupy BALO izolowane były z wielu środowisk m.in. wód powierzchniowych, ścieków, osadów morskich i oceanicznych, z gleby, ale także z przewodów pokarmowych zwierząt i człowieka. Szacuje się że, liczba bakterii z grupy BALO w środowisku wodnym waha się miedzy 10^1 a 10^4 pfu/ml, przy czym w wodach powierzchniowych może być ich do 10^6 pfu/ml, natomiast w 1g gleby ilość BALO waha się średnio między 10^2 a 10^4 pfu [58]. Wykazano nadto, że w środowisku wodnym największe ilości bakterii z grupy BALO występują w biofilmach tworzących się na powierzchni obiektów oraz zwierząt występujących w tym środowisku, choć także w warstwach powierzchniowych wody, jednak ich ilość zależy w dużej mierze od ilości bakterii występujących tam. Bakterie z grupy BALO odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu składu bakteryjnych populacji w biofilmie. Dane te zostały przedstawione na podstawie eksperymentów w laboratorium w oparciu o hodowalne szczepy referencyjne, jednakże nie wyklucza się, że ilość BALO w naturalnych ekosystemach może być dużo większa [14, 21, 23, 28, 58].

Bakterie z grupy BALO to małe, bardzo ruchliwe Gram-ujemne bakterie o kształcie pałeczek lub przecinków, które obligatoryjnie żerują na innych Gram-ujemnych bakteriach, a spektrum ich ofiar obejmuje zarówno bakterie niepatogenne, jak i patogenne dla ludzi, zwierząt i roślin [14]. Są one wyposażone w wici i rzęski, umożliwiające im szybki ukierunkowany ruch w stronę ofiary oraz przyleganie do niej [5, 40, 48]. Bakterie z rodzaju *Bdellovibrio* wykorzystują wić w celu przemieszczania się w kierunku ofiary, zaś pile w celu przylegania i przedostania się do wnętrza atakowanej komórki. Bakterie te podczas przemieszczania się na powierzchni biofilmu i na podłożach stałych oraz podczas wydostawania się ze zlizowanej komórki ofiary, wykazują ruch ślizgowy [4, 36, 37, 40]. Po ich przyłączeniu się do ściany komórkowej bakterii i przedostaniu się do jej wnętrza, przeprowadzają atak i wyłączają metabolizm ofiary, w wyniku czego zaatakowane komórki giną w ciągu 15 minut [4]. W zależności od zagęszczenia komórek ofiary oraz rodzaju środowiska, cykl życiowy BALO może trwać 3–4 h [23]. Jednocześnie, w odróżnieniu od bakteriofagów, bakterie te są zdolne do żerowania na komórkach bakteryjnych będących w różnym stadium rozwojowym, również martwych, przy czym cykl rozwojowy drapieżnika w tym przypadku jest wydłużony [55]. Bakterie drapieżne z grupy BALO mogą występować w różnych fenotypach: wewnątrz komórki atakowanej (*fenotyp periplazmatyczny* – rozwijający się między błoną zewnętrzną a wewnętrzną bakterii Gram-ujemnej, *fenotyp cytoplazmatyczny* – rozwijający się w cytoplazmie ofiary) lub na jej powierzchni (*fenotyp epibiotyczy* – wzrastający się na powierzchni komórki ofiary) [4, 17]. Najczęściej mikroorganizmy te charakteryzują się podwójnym cyklem życiowym, na który składa się faza życia poza komórką ofiary, tzw. faza ataku oraz faza ich wewnątrzperiplazmatycznego wzrostu, mająca miejsce w periplazmie bakterii zaatakowanej, gdzie formowana jest struktura zwana bdelloplastem. Bakterie te po wniknięciu do komórki ofiary uruchamiają mechanizmy prowadzące do „rozłożenia" zawartości swojej ofiary, w celu pozyskania związków odżywczych niezbędnych do swojego wzrostu i rozmnażania [23, 37, 41]. Wykazano także, w oparciu o analizy genetyczne, możliwy udział bakterii z rodzaju *Bdellovibrio* w horyzontalnym transferze genów [46]. Często spotykaną strategią jest również bezpośrednie przyłączenie się bakterii drapieżnej do zewnętrznej ściany komórkowej ofiary, a następnie degradacja komórki gospodarza i asymilacja uzyskanych składników odżywczych poprzez specjalistyczne struktury, jak się dzieje w przypadku np. *Vampirococcus* spp., czy wytwarzanie czynników litycznych, co zarejestrowano w przypadku *Ensifer* spp. [26]. W obrębie prokariotycznych mikroorganizmów drapieżnych mogą być wykorzystywane również inne strategie polowania, przy których nie jest wymagany bezpośredni ich kontakt z ofiarą. Na przykład specyficzna dla bakterii z rodzaju *Myxococcus* i *Lysobacteria* tzw. strategia stadna (*wolfpack strategy*), polegająca na produkcji przez drapieżnika zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, powodujących uszkodzenie komórek bakteryjnych znajdujących się w bezpośrednim ich otoczeniu, bez konieczności wnikania do wnętrza ofiary [5, 26].

4. Pierwotniaki a bakterie w środowisku

Badania wykazują, że żerowanie pierwotniaków w środowisku ma bardzo istotny wpływ na kształtowanie liczebności bakterii i składu ich populacji, a także na obieg materii organicznej w danym ekosystemie [2, 26, 33, 34, 51, 53]. Interakcje między pierwotniakami a bakteriami w różnych środowiskach są bardzo podobne, przy czym środowisko gleby jest tym, w którym dyfuzja i przemieszczanie się mikroorganizmów są bardziej ograniczone w porównaniu ze środowiskiem wodnym, co sprawia, że występowanie pierwotniaków ogranicza się do filmów wodnych i porów wypełnionych wodą, zaś mikropory występujące w macierzy glebowej mogą być nawet schronieniem dla bakterii przed tymi drapieżnikami [51].

Do pierwotniaków odżywiających się innymi mikroorganizmami, w tym bakteriami, należą orzęski, wiciowce i ameby, przy czym największą grupę bakteriożerców stanowią pierwotniaki heterotroficzne lub miksotroficzne tj. heterotroficzne nanowiciowce (*heterotrphic nanoflagellata*, HNF) i mikrowiciowce, a w mniejszym stopniu orzęski oraz ameby [26, 33, 34, 51, 53]. Średnia ilość komórek HNF w środowisku wodnym waha się między 10^2 a 10^5 ml^{-1}, mikrowiciowców ok. 10^2 ml^{-1}, natomiast ilość bakteriożernych orzęsków wynosi od 1 do 10^3 ml^{-1}, przy czym ilość tych pierwotniaków zależy od ilości bakterii, stanu eutroficznego środowiska, a także od ilości drapieżników żerujących na pierwotniakach [26, 33, 53]. Jednocześnie liczebność eliminowanych przez pierwotniaki bakterii w środowisku wodnym w ciągu godziny wynosi od 10^1 do 10^5 ml^{-1}, choć ilość ta związana jest z warunkami środowiska, dlatego też żerowanie pierwotniaków w okresie zimowym (ze względu na spadek ich liczebności i aktywności) ma dużo mniejsze znaczeniu w regulacji liczebności bakterii [19, 33, 34].

Pod względem odżywiania wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy wykorzystywane przez komórki pierwotniaków do pobierania związków odżywczych: wchłanianie proste, pinocytozę oraz fagocytozę [30, 53]. Wchłanianie proste umożliwia pobieranie ze środowiska wody oraz prostych związków np. aminokwasów, bezpośrednio przez błonę komórkową. Pinocytoza u pierwotniaków ma miejsce w określonych miejscach na błonie komórkowej, gdzie tworzą się wpuklenia, a następnie powstają pęcherzyki zawierające wielkocząsteczkowe związki, które są rozkładane po dołączeniu lizosomów. Ostatnim i najbardziej złożonym mechanizmem pobierania pokarmu przez pierwotniaki jest fagocytoza, która umożliwia pobieranie całych komórek małych mikroorganizmów. Podczas tego procesu pokarm zostaje wchłonięty w ściśle określonym miejscu na powierzchni komórki, czyli w tzw. cytostomie. Po utworzeniu wodniczki pokarmowej dołączane są do niej lizosomy i zawartość jej jest trawiona, przy czym niestrawione resztki usuwane są na zewnątrz komórki w ściśle określonym miejscu – tzw. cytopyge. W przypadku ameb i niektórych wiciowców wodniczka pokarmowa powstaje poprzez otoczenie pożeranego mikroorganizmu lub cząstki za pomocą tzw. pseudopodiów w dowolnym miejscu komórki [26, 30, 53]. Niektóre pierwotniaki polują na mniejsze mikroorganizmy za pomocą tzw. ekstrusomów, które umożliwiają im chwytanie i unieruchomienie ofiary, a następnie wysysanie jej zawartości. Z kolei młode orzęski przyczepiają się do powierzchni stałych, tracąc swoje rzęski i w tej formie odżywiają się również poprzez czułki przypominające ekstrusomy [47, 53]. Generalnie pierwotniaki żerują na mikroorganizmach mniejszych (komórki o objętości <0,1 μm^{-3}) lub podłużnych [43]. Zazwyczaj preferowaną przez nie wielkość komórki, którą pochłaniają, bakterie osiągają tuż przed podziałem i to one są najefektywniej eliminowane ze środowiska przez pierwotniaki. Ponadto drapieżniki te wykazują dużo większą preferencję konsumpcji bakterii aktywnych metabolicznie w stosunku do form martwych lub „uśpionych", przez co regulują one zarówno liczbę bakterii występujących w środowisku, jak i stosunek liczby komórek aktywnych metabolicznie do liczby komórek nieaktywnych oraz ilość komórek małych i dużych, ale także obecność różnych morfotypów w populacji bakterii mniejszych [33].

5. Drapieżniki bakterii a biofilm

Mikroorganizmy w środowisku naturalnym mogą występować w postaci wolnej jako tzw. plankton, choć często wykazują tendencję do adsorpcji na granicy faz ciało stałe – ciecz, ciecz – gaz czy ciecz – ciecz. Tworząc skupiska w postaci biofilmu mogą one przylegać zarówno do stałych powierzchni abiotycznych lub biotycznych – komórek innych organizmów. Biofilm jest tworem wielokomórkowym, przy czym mikroorganizmy wchodzące w jego skład mogą należeć do jednej, bądź wielu różnych grup systematycznych – bakterii, archeonów, grzybów czy pierwotniaków, i mogą to być zarówno organizmy niechorobotwórcze, jak i patogenne [13, 32, 45]. Biofilm tworzy swojego rodzaju wysoce zorganizowany układ biologiczny, w którym mikroorganizmy tworzą skoordynowaną dynamiczną strukturę, a ich komórki komunikują się ze sobą i kooperują w procesie rozkładu substancji oraz pozyskiwania energii. Zdolność kolonizacji powierzchni stałych mikroorganizmy zawdzięczają właściwościom adhezyjnym, natomiast cały biofilm stabilizowany jest dzięki polimerycznym substancjom wchodzącym w skład ściany komórkowej lub wydzielanym pozakomórkowo, jako tzw. EPS (*extracellular*

polymeric substances). Jednocześnie komórki drobnoustrojów wchodzących w skład biofilmu wykazują specjalizację do pełnienia różnych funkcji oraz wykazują inne cechy niż te same komórki występujące w postaci wolnej. Konsorcja komórek mikroorganizmów zgrupowane w biofilm są dzięki temu chronione przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, w tym przed drapieżnikami, ale również forma taka stwarza zdecydowanie łatwiejszy dostęp do związków odżywczych. Ponadto prawidłowe funkcjonowanie biofilmu jest możliwe między innymi dzięki zjawisku *quorum sensing*. Mechanizm ten oparty jest na produkcji cząstek sygnalnych przez komórki występujące w biofilmie i ich swobodnej dyfuzji do innych komórek w jego obrębie, które dzięki odpowiednim receptorom są w stanie reagować na dany bodziec. Sposób, w jaki mikroorganizmy grupują się i funkcjonują w postaci biofilmu, może więc przypominać prymitywny organizm, jednak to zapewnia im często możliwość funkcjonowania w warunkach, w których jako pojedyncze komórki nie miałyby możliwości przeżyć [13, 32]. W środowisku biofilm jest powszechny i co więcej, bierze aktywny udział w wielu procesach mikrobiologicznych tj. samooczyszczanie się wód powierzchniowych, podziemnych czy gruntowych, dzięki obecności wielu mikroorganizmów zapewniających prawidłowe procesy rozkładu. Z drugiej jednak strony mikroorganizmy tworzące biofilm mogą być także źródłem rozprzestrzeniania się patogenów, a także strat w gospodarce, poprzez kolonizację powierzchni roboczych i urządzeń medycznych oraz przemysłowych, a nawet produktów spożywczych. Mikroorganizmy chorobotwórcze zdolne do tworzenia biofilmu są często przyczyną groźnych chorób ludzi, zwierząt oraz roślin i takie skupiska drobnoustrojów w postaci biofilmów są bardziej oporne na działanie związków przeciwdrobnoustrojowych czy czynników fizykochemicznych, co sprawia, że walka z nimi jest dużo trudniejsza [32, 45].

Badania wykazały, że *Bdellovibrio bacteriovorus* również wpływa na tworzenie biofilmu bakterii, jako że jego obecność nie tylko istotnie wpływa na jego formowanie, ale fizycznie zaburza strukturę biofilmu i przesuwa równowagę populacji mikroorganizmów z formy osiadłej, prowadząc do uwolnienia pojedynczych komórek do środowiska. Wykazano również zdolność wnikania tych drapieżników w głąb biofilmu i niszczenia bakterii w nim występujących, co odróżnia bakterie z grupy BALO od bakteriofagów czy pierwotniaków. Bakterie te są zdolne do produkcji i wydzielania olbrzymiej ilości enzymów hydrolitycznych, w tym proteolitycznych i nukleolitycznych, wykorzystywanych do wydajnego niszczenia struktur komórkowych ofiary. Ze względu na to, że bakterie te żywią się bakteriami Gram-ujemnymi, oddziałując na biofilm w znacznym stopniu wpływają na skład całej populacji mikroorganizmów tworzących tę strukturę, choć mogą również doprowadzić do jego całkowitego niszczenia [17, 44, 45]. Co więcej bakterie z grupy BALO są w stanie żywić się martwymi i nieaktywnymi komórkami bakterii, co sprawia, że bakterie uśpione w biofilmie, są nadal celem ataku, mimo iż mogą być niewrażliwe na infekcje fagowe czy antybiotyki, których efekt działania zależny jest od możliwości wzrostu i rozmnażania się komórki bakteryjnej [17, 45].

6. Mechanizmy obronne bakterii oraz ich interakcje z drapieżnikami

Jak wykazano, komórki bakteryjne nie są całkowicie bezbronne w walce z drapieżnikami, jako że powszechne jest pojawianie się w środowisku mutantów bakteryjnych opornych na obecne w środowisku drapieżniki, a nadto bakterie wykształciły różne mechanizmy umożliwiające im uniknięcie ataku [26, 41]. W warunkach naturalnych konsorcja bakterii tworzące biofilm z jednej strony mają ułatwiony dostęp do substancji odżywczych oraz są chronione przed niekorzystnymi warunkami zewnętrznymi, w tym przed działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych, a także struktura ta chroni je przed atakami drapieżników [32, 42, 45, 57]. W przypadku obrony bakterii przed fagami i bakteriami z grupy BALO, głównie wykorzystywany jest mechanizm „maskowania", polegający na zmienności cząsteczek LPS oraz białek na powierzchni ściany komórkowej bakterii, co zapobiega ich rozpoznaniu przez drapieżniki [5, 7, 20].

W przypadku fagów przyjmuje się, że obrona bakterii przed nimi obejmuje cztery mechanizmy, a mianowicie: (1) blokowanie przylegania faga do powierzchni komórki poprzez zmiany w eksponowanych na powierzchni receptorach i tworzenie biofilmu, (2) blokowanie wprowadzania materiału genetycznego faga do komórki poprzez zmiany w budowie ściany i nabycie oporności na lizyny fagowe, (3) występowanie systemu restrykcji-modyfikacji, który degraduje materiał faga po wniknięciu do komórki gospodarza oraz (4) infekcja poronna polegająca na samobójczej śmierci komórki uniemożliwiając w ten sposób replikację faga [3, 57]. Znany jest również system CRISPR-Cas, który w komórkach bakteryjnych pełni rolę swojego rodzaju „adaptacyjnego układu odpornościowego komórek prokariotycznych" na poziomie kwasów nukleinowych. W jego skład wchodzą sekwencje CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) oraz geny kodujące enzymy z grupy Cas, położone w pobliżu CRISPR (*CRIPSR associated sequences*). Enzymy z grupy Cas odpowiedzialne są za mechanizm regulacji oporności i dzięki nim podczas infekcji fagowej obce DNA jest trawione, a następnie

uzyskane fragmenty wbudowane są do sekwencji CRISPR, jako nowe sekwencje łącznikowe. System ten funkcjonuje analogicznie do systemu interferencyjnego RNA w komórkach organizmów eukariotycznych, przez co wprowadzone do genomu bakterii sekwencje DNA fagowego nadają im trwałą oporność na koleją infekcję tym fagiem [3, 24].

Wykazano, że bakteriofagi i bakterie z grupy BALO występujące w tym samym środowisku, mogą atakować bakterie z tego samego gatunku, a nawet te same komórki (koinfekcja) [11, 54]. Nie ma jednak dowodów na to, jakoby wnikanie jednego z tych dwóch czynników warunkowane było obecnością drugiego. Hipotetyczny przebieg koinfekcji przedstawiono w oparciu o znajomość cyklu życiowego bakterii z grupy BALO oraz stwierdzoną obecność cząstek fagowowych występujących w bdelloplaście. Przypuszcza się, że w pierwszej kolejności komórka bakteryjna jest atakowana przez bakteriofaga, który zaczyna replikować i tworzyć potomne cząstki fagowe wykorzystując aparat metaboliczny gospodarza, przy czym obecność tego faga w komórce bakteryjnej nie wyklucza jej z puli komórek, które mogą zostać zaatakowane przez bakterie z grupy BALO. Kiedy do komórki bakteryjnej wnika komórka BALO, dochodzi do wyłączenia metabolizmu komórki atakowanej, a następnie drapieżnik pożywia się jej zawartością. Stan taki powoduje ograniczenie, a nawet zatrzymanie replikacji faga w zainfekowanej komórce, przy czym bakteria z grupy BALO może kontynuować wzrost i rozmnażanie, nie będąc wrażliwa na obecnego w bakterii faga, co kończy się lizą komórki ofiary i uwolnieniem zarówno komórek BALO, ale także powstałych cząstek fagowych. Dodać należy, że fagi wydajniej replikują w komórkach bakteryjnych będących w fazie szybkiego wzrostu, natomiast bakterie z grupy BALO lepiej rosną na hodowli bakteryjnej w fazie stacjonarnej [11, 54]. Stwierdzono również, że wzrost liczby komórek BALO wzrasta z liczbą komórek bakterii [26], przy czym podczas rywalizacji o pożywienie, bakterie z grupy BALO mają przewagę w stosunku do komórek ofiary, która ma ograniczony dostęp do związków odżywczych i rośnie wolniej. W przypadku koinfekcji bakterii przez faga i komórkę BALO stan ten może być korzystny dla obu stron, ale ma też swoje konsekwencje. Bdelloplasty, powstałe po wniknięciu drapieżnika z grupy BALO do komórki bakteryjnej, stanowią ochronę przed niekorzystnymi warunkami zarówno dla bakterii z grupy BALO, jak i dla faga, choć drapieżcy rywalizują o tego samego gospodarza. Taką rywalizację można by określić jako „konkurencyjny sojusz" [11]. Jednocześnie wykazano, że bakterie z grupy BALO tj. *Bdellovibrio bacteriovorus* [1, 22, 29] są wrażliwe na pewną grupę bakteriofagów (bdellofagów), przy czym niektóre bdellofagi są w stanie namnażać się jedynie w tzw. układzie potrójnym (*three-membered system*) składającym się z faga, bakterii drapieżnej i jej ofiary [29, 49]. Bdellofagi te przyłączają się do ściany komórkowej swojego gospodarza, przy czym po wprowadzeniu swojego materiału genetycznego do jego wnętrza, komórka *Bdellovibrio* spp. traci zdolność ruchu, co sprawia, że po kilku minutach od infekcji uniemożliwione jest jej przyłączanie do swojej ofiary. Jednocześnie zauważono, że po wniknięciu bdellofaga do komórki *Bdellovibrio* spp. przyłączonej już do swojej ofiary, nadal może dochodzić do penetracji komórki drapieżnej. Wykazano [29], że bdellofagi przyłączają się do powierzchni bakterii drapieżnej w momencie jej wnikania do zaatakowanej komórki, a po wprowadzeniu swojego materiału genetycznego puste kapsydy są usuwane podczas przenikania *Bdellovibrio* spp. przez ścianę komórkową bakterii. Po wniknięciu do wnętrza zainfekowana komórka *Bdellovibrio* spp. nie wydłuża się i nie dzieli tak, jak komórka niezainfekowana bdellofagiem, przy czym w obu przypadkach komórka ofiary w efekcie końcowym jest lizowana, co pozwala na uwolnienie nowopowstałych cząstek bdellofaga.

Rozważając zależność między bakteriami a bakteriofagami warto zauważyć, że niekiedy wchodzą one w korelacje oparte na lizogenii, odnosząc tym samym obopólne korzyści. Wykazano, że infekcje fagowe mogą wzmagać metabolizm komórki bakteryjnej, jej oporność, rozprzestrzenianie się, co może kształtować w pozytywnym aspekcie proces ewolucji [50]. Bakteriofagi integrując się z genomem gospodarza mogą nie tylko rozprzestrzeniać się, ale także nabywać nowych cech genetycznych, przez co uczestniczą w horyzontalnym transferze genów, niosąc niekiedy korzystne geny dla komórki bakteryjnej, a to z kolei w dużym stopniu może wpływać na zmienność i tym samym różnorodność bakterii [2, 7, 39, 50]. Wiele bakteriofagów niesie geny kodujące enterotoksyny, które w zależności od typu faga mogą być produkowane podczas cyklu lizogennego, litycznego po indukcji profaga lub w obu przypadkach [2]. Stan taki powoduje, że bakterie wykorzystując profagi jako broń przeciwko żerującym na nich pierwotniakom, stanowią nową formę obrony przed drapieżnikami [2, 7, 39]. Mechanizm ten został opisany na przykładzie komórek *Escherichia coli* i *Corynebacterium diphtheriae*, produkujących odpowiednio toksynę Shiga (Stx) i toksynę błoniczą (Dtx), które kodowane są przez geny występujące w genomie profaga. Podczas ataku na bakterie, drapieżne pierwotniaki z rodzaju *Tetrahymena* wydzielają nadtlenek wodoru uszkadzający komórki bakteryjne, jednocześnie powodując indukcję profaga w komórkach bakteryjnych będących w otoczeniu drapieżnika. W przypadku pierwotniaków z rodzaju *Tetrahymena* obie toksyny tj. Stx i Dtx, po uwolnieniu do środowiska są zdolne do wiązania się z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórki drapieżnika, a wnikając do jego wnętrza prowadzą do

śmierci, tym samym chroniąc pozostałą część populacji zaatakowanych bakterii [2, 39, 35]. Jednak, co ciekawe, w przypadku pierwotniaków z rodzaju *Acanthamoeba*, na powierzchni ich komórek nie wykryto receptorów dla toksyn Stx i Dtx. Toksyny te powodują śmierć drapieżnika wyłącznie po pochłonięciu przez niego bakterii niosących geny tych toksyn, co powoduje, że bakterie te zachowują się jak „koń trojański", niszcząc drapieżnika od wewnątrz. Dzięki takiej strategii możliwe jest wykorzystanie profaga do walki z drapieżnymi pierwotniakami nawet, jeżeli nie są one wrażliwe na obecność produkowanych przez bakterie toksyn w środowisku. Co więcej, badania wykazały, że pochłonięte bakterie niezdolne do produkcji toksyn są w stanie przeżyć wewnątrz *Acanthamoeba*, co z kolei sugeruje, że pierwotniak ten może również pełnić rolę ochronną dla bakterii, a jednocześnie być ich wektorem [2, 39].

W przypadku pierwotniaków, jednym z wykorzystywanych mechanizmów obrony przez komórki bakterii przed ich atakiem jest formowanie struktur wielokomórkowych i biofilmu, bądź zmiany morfologii komórki poprzez jej zwiększanie, co w znacznym stopniu utrudnia pochłonięcie ofiary [4, 5, 7, 20, 33, 43, 51]. Dlatego też gatunki bakterii wykazujące tzw. polimorfizm komórkowy, czyli genetyczne możliwości tworzenia ekstremalnie dużych lub małych komórek, są lepiej przystosowane do środowisk, w których obserwuje się silną presję pokarmową ze strony pierwotniaków [33]. Innym sposobem ochrony bakterii przed drapieżnymi pierwotniakami jest tendencja do zwiększania ruchliwości komórki potencjalnej ofiary w połączeniu ze zmniejszeniem jej rozmiarów, co także utrudnia jej schwytanie. Obserwuje się także uwalnianie toksyn przez zaatakowane komórki bakteryjne, co powoduje lizę komórki pierwotniaka i uwolnienie jej zawartości, w rezultacie stanowiąc dodatkowe źródło związków odżywczych dla bakterii [4, 5, 7, 20, 43, 51]. Wykazano również, że niektóre bakterie wytwarzają związki barwne takie jak wiolaceina, która znacznie obniża liczbę pierwotniaków żerujących na populacji tych bakterii. Produkowana wiolaceina indukuje u pierwotniaków proces podobny do apoptozy występującej w komórkach organizmów wielokomórkowych, co potwierdzono na liniach komórek ssaczych, w których związek ten aktywował apoptozę badanych komórek, co może mieć w przyszłości duże znaczenie terapeutyczne [43].

7. Praktyczne wykorzystanie drapieżników bakterii

Drapieżne bakterie, które żerują na innych bakteriach oraz produkują związki przeciwbakteryjne mogą być doskonałym źródłem nowych antybiotyków [8, 10, 12]. Badania nad możliwością wykorzystania bakterii z grupy BALO wskazują na ich wysoki potencjał w walce z mikroorganizmami patogennymi (w tym antybiotykoopornymi) dla ludzi oraz zwierząt. Wykazano, że opracowywanie nowych strategii do walki z patogenami z wykorzystaniem bakterii drapieżnych, analogicznie jak stosowanie bakteriofagów, może być naturalną bronią przeciwko tym mikroorganizmom. Ponadto, podobnie jak fagi, bakterie z grupy BALO nie mają negatywnego wpływu na komórki eukariotyczne [9, 12, 17, 21, 23, 38, 44, 57]. Badania prowadzone nad wpływem *Bdellovibrio bacteriovorus* na infekcję oka wywołaną przez *Shigella flexneri* u królika wykazały, że bakterie drapieżne są w stanie w znacznym stopniu ograniczyć, a nawet cofnąć zakażenie wywołane tym patogenem. Również analizując odchody zwierząt domowych wykazano zależność między ich stanem zdrowia a ilością izolowanych bakterii z grupy BALO. Wykazano, że w próbach pochodzących od zwierząt z infekcjami jelitowymi lub płucnymi występuje znacznie niższa ilość bakterii drapieżnych, co wskazuje na istotny wpływ tych bakterii na „kondycję" przewodu pokarmowego oraz ich znaczenie w kontroli patogennych enterobakterii tj. *Pseudomonas* spp., *Pasteurella* spp. czy *Campylobacter* spp. [52, 58]. Ponadto dowiedziono, że mikroorganizmy z grupy BALO żerują również na bakteriach patogennych dla człowieka. Badania wykazały, że *Bdellovibrio bacteriovorus* atakuje bakterie patogenne z rodzajów *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Listonella* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Spirillum* spp., *Vibrio* spp.czy *Yersinia* spp. [17]. Słabszą stroną wykorzystania bakterii z grupy BALO jest fakt, że nie wykazują one zdolności atakowania i żerowania na bakteriach Gram-dodatnich, które stanowią dużą grupę bakterii patogennych dla człowieka. Jednak udowodniono [44], że bakterie z grupy BALO wydzielając zewnątrzkomórkowe enzymy tj. proteazy/peptydazy i inne hydrolazy niezbędne w procesie niszczenia makromolekuł swojej ofiary, są jednocześnie zdolne do hamowania formowania się biofilmu bakterii Gram-dodatnich takich jak *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Co więcej, wydzielane enzymy mogą obniżać również wirulencję patogennych bakterii *S. aureus* czy *Listeria monocytogenes* [44] poprzez hydrolizę białek występujących na ich powierzchni, będących czynnikami wirulencji. Inne badania prowadzone w kierunku wykorzystania bakterii drapieżnych sprawiają, że rozważa się również opcję zastosowania ich nie tylko jako alternatywę dla antybiotyków, ale również jako ewentualne probiotyki, które mogłyby chronić makroorganizm m.in. przed mikroorganizmami patogennymi [17, 45]. Jednocześnie warte zastanowienia się jest stosowanie podejścia dwubiegunowego, gdzie bakterie

z grupy BALO mogłyby być stosowane w połączeniu np. z antybiotykami, związkami chemicznymi, czynnikami fizycznymi, a nawet innymi drapieżnikami bakterii, głównie w celu zwiększenia wydajności usuwania biofilmów, czy zwalczania patogenów [45]. Wykazano także, że bakterie drapieżne np. *Bdellovibrio bacteriovorus* mogłyby znaleźć zastosowanie przy kontrolowaniu i usuwaniu biofilmów występujących w środowisku, dzięki czemu mogłyby być z powodzeniem wykorzystane przy niwelowaniu niepożądanych bakterii z naturalnych zbiorników wodnych, zbiorników do hodowli ryb, a nawet ścieków [17, 44, 45, 58, 59]. Zakłada się, że dzięki mikroorganizmom drapieżnym oraz bakteriofagom możemy w znacznym stopniu usprawnić niektóre procesy technologiczne oraz ograniczyć ilość patogennych bakterii, które mogą zagrażać człowiekowi, zwierzętom czy roślinom [25].

8. Podsumowanie

Reasumując można stwierdzić, że drapieżnictwo wśród mikroorganizmów, mimo iż jest stosunkowo słabo poznane, to nie ma wątpliwości, że ma znaczący wpływ na mikroorganizmy występujące w środowisku [5, 7, 11]. Obecnie coraz więcej bakterii patogennych jest opornych na stosowane antybiotyki, co wiąże się z koniecznością poszukiwania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych i metod walki z tymi mikroorganizmami, a także poszukiwania alternatywy dla antybiotyków i chemioterapeutyków. Stąd uważa się, że bardzo ważnym elementem w tej walce jest natura, jako źródło nowych leków i związków przeciwdrobnoustrojowych. Przykładem mogą być drapieżniki bakterii, które żerują na nich oraz naturalnie produkują związki przeciwbakteryjne, a więc mogą być doskonałym źródłem nowych antybiotyków [8, 10]. Co więcej, ze względu na różny zakres atakowanych komórek bakteryjnych, rodzaj usuwanych bakterii przez drapieżniki może być bardzo specyficzny lub polegający na ograniczeniu ogólnej ich liczby. Stosując bakteriofagi i wykorzystując ich wysoką specyficzność w stosunku do gospodarza, można eliminować bakterie należące do konkretnej grupy taksonomicznej. Bakterie drapieżne z kolei atakują przede wszystkim bakterie Gram-ujemne niekoniecznie należące do tej samej grupy systematycznej. Wykorzystanie pierwotniaków natomiast prowadzi do usuwania ogólnej liczby bakterii w środowisku. Również o wyborze drapieżnika mogą decydować warunki środowiska oraz stadium rozwojowe eliminowanych bakterii [25].

Badania nad możliwością wykorzystania bakterii z grupy BALO wskazują na ich wysoki potencjał w walce z patogenami u zwierząt, a w przyszłości również u ludzi [9]. Dlatego też sugeruje się opracowywanie nowych strategii przeciwdrobnoustojowych, wykorzystujących do walki z patogenami, w tym antybiotykoopornymi, bakterii drapieżnych oraz bakteriofagów będących naturalną bronią przeciwko tym mikroorganizmom, a jednocześnie nieuszkadzających komórek eukariotycznych [12]. Stąd zakłada się, że wiedza o zależnościach między organizmami w środowisku naturalnym może być nieocenionym źródłem zarówno informacji na temat ich koegzystencji, jak również źródłem mikroorganizmów i związków przez nie produkowanych, które mogłyby w przyszłości być wykorzystane w walce z drobnoustrojami zarówno patogennymi, jak i zakażającymi hodowle mikroorganizmów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych. Ponadto ważnym elementem może być także pozyskiwanie enzymów i biokatalizatorów dla biotechnologii pochodzących z mikroorganizmów drapieżnych, bakteriofagów czy pierwotniaków [17, 41]. Zauważyć należy, że coraz częściej podejmowane są próby wykorzystania drapieżników bakterii w różnych gałęziach przemysłu, poczynając od wspomnianej alternatywy dla antybiotyków, przez utrzymanie czystości hodowli przemysłowych, do oczyszczania zbiorników wodnych oraz ścieków [9, 17, 23, 59]. Duży udział drapieżników bakterii w regulacji liczby i składu populacji mikroorganizmów może mieć istotne znaczenie już teraz w ochronie środowiska, w tym przy oczyszczaniu ścieków [19, 25, 59]. Stąd badania prowadzone w tym kierunku wydają się mieć ogromny potencjał zarówno poznawczy, jak i biotechnologiczny.

Piśmiennictwo

1. Althauser M., Samsonoff W.A., Anderson C., Conti S.F.: Isolation and preliminary characterization of bacteriophages for Bdellovibrio bacteriovorus. *J. Virol.* **10**, 516–523 (1972)
2. Arnold J.W., Koudelka G.B.: The Trojan horse of the microbiological arms race: phage-encoded toxins as a defence against eukaryotic predators. *Environ. Microbiol.* **16**, 454–466 (2014)
3. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007)
4. Barton L.L., Northup D.E.: Microbial ecology. Wydanie pierwsze. Wyd. John Wiley & Sons Inc., New Jersey 2011, s. 159–182
5. Berleman J.E., Kirby J.R.: Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 942–957 (2009)
6. Brockhurst M.A., Fenton A., Roulston B., Rainey P.B.: The impact of phages on interspecific competition in experimental populations of bacteria. *BMC Ecology*, **6**, 19 (2006)
7. Brüssow H.: Bacteria between protists and phages: from antipredation strategies to the evolution of pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **65**, 583–589 (2007)
8. Cain C.C., Lee D., Waldo R.H., Henry A.T., Casida Jr. E.J., Wani M.C., Wall M.E., Oberlies N.H., Frankinham J.O.: Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a nonobligate bacterial predator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2113–2117 (2003)

9. Cao H., He S., Wang H., Hou S., Lu L., Yang X.: *Bdellovibrios*, potential control bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Microbiol.* **154**, 413–418 (2012)
10. Casida Jr. L.E.: Minireview: Nonobligate bacterial predation of bacteria in soil. *Microb. Ecol.* **15**, 1–8 (1988)
11. Chen H., Williams H.N. Sharing of prey: Coinfection of a bacterium by a virus and a prokaryotic predator. *mBio,* **3**, e00051–12 (2012)
12. Dashiff A., Junka R.A., Kibera M., Kadouri D.E.: Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 431–444 (2010)
13. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847–867 (2000)
14. Davidov Y., Friedjung A., Jurkevitch E.: Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms. *Environ. Microbiol.* **8**, 1667–1673 (2006)
15. Davidov Y., Huchon D., Koval S.F., Jurkevitch E.: A new α-proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environ. Microbiol*. **8**, 2179–2188 (2006)
16. Davidov Y., Jurkevitch E.: Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Pedibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **54**, 1439–1452 (2004)
17. Dwidar M., Monnappa A.J., Mitchell R.J.: The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Reports,* **45**, 71–78 (2012)
18. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T.: Bergey's manual of systematic bacteriology. The Proteobacteria. Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Wyd. II. Springer, New York, 2005, s.1040–1058
19. González J.M., Iriberri J., Barcina I. Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 998–1004 (1992)
20. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to the infectious diseases. *Nature Rev.* **2**, 95–108 (2004)
21. Harini K., Ajila V., Hegde S.: *Bdellovibrio bacteriovorus*: A future antimicrobial agent? *J. Indian Soc. Periodontol.* **17**, 823–825 (2013)
22. Hashimoto T., Diedrich D.L., Conti S.F.: Isolation of bacteriophage for *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Virol.* **5**, 97–98 (1970)
23. Iebba V., Santangelo F., Nicoletti M., Gagliardi A., De Biase R.V., Cucchiara S., Nencioni L., Conte M.P., Schippa S.: Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One,* **8**, e61608 (2013)
24. Jaworski A. i Dobrowolska A.: System interferencyjnego RNA bakterii (CRIPSR-Cas) i jego rola w obronie przed infekcją fagową. *Post. Mikrobiol.* **48**, 23–30 (2009)
25. Johnke J., Cohen Y., de Leeuw M., Kushmaro A., Jurkievitch E., Chatzinotas A.: Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **27**, 185–190 (2014)
26. Jürgens K. Predation on bacteria and bacterial resistance mechanisms: comparative aspects among different predator groups in aquatic systems. (w) Predatory prokaryotes. Biology, Ecology and Evolution. Microbiology Monographs, red. Jurkevitch E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, 4, s. 57–92
27. Jurkevitch E., Davidov Y. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. (w) Predatory prokaryotes. Biology, Ecology and Evolution. Microbiology Monographs, red. Jurkevitch E., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, 4, s. 11–56
28. Jurkevitch E., Ramati B.: Design and uses of *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 265–271 (2000)
29. Kessel M., Varon M.: Development of Bdellophage VL-1 in parasitic and saprofitic Bdellovibrios. *J. Virol.* **12**, 1522–1533 (1973)
30. Kilarski W. Strukturalne podstawy biologii komórki. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2007, s. 160–171
31. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.: Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. 9th report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press 2012
32. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochr. Środow*. **33**, 3–14 (2011)
33. Koton-Czarnecka M., Chróst R.: Konsumpcja bakterii przez pierwotniaki w ekosystemach wodnych. *Post. Mikrobiol.* **40**, 219–240 (2001)
34. Koton-Czarnecka M., Chróst R.J.: Measurement of protozoa grazing on bacteria by means of [^{3}H-tymidine]-labeled natural assemblages of lake bacteria. *Pol. J. Environ. Studies*, **11**, 385–393 (2002)
35. Lainhart W., Stolfa G., Koudelka G.B.: Shiga toxin as a bacterial defence against a eukaryotic predator, *Ttrahymena thermophile*. *J. Bacteriol.* **191**, 5116–5122 (2009)
36. Lambert C., Fenton A.K., Hobley L., Sockett R.E.: Predatory *Bdellovibrio* bacteria use gliding motility to scout for prey on surfaces. *J. Bacteriol.* **193**, 3139–3141 (2011)
37. Lambert C., Morehouse K.A., Chang C.-Y., Sockett R.E.: *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 639–644 (2006)
38. Li H., Liu C., Chen L., Zhang X., Cai J.: Biological characterization of two marine Bdellovibrio-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 36–43 (2011)
39. Łoś J., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–8 (2013)
40. Mahmud K.K., Koval S.F.: Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*. *Microbiol.* **156**, 1040–1051 (2010)
41. Markelova N.Y., Gariev I.A.: Predatory bacteria *Bdellovibrio*: survival strategy. *Process Biochem*. **40**, 1089–1094 (2005)
42. Markelowa N.Y.: Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol. *Int. J. Hyg. Environ. Health,* **313**, 428–431 (2010)
43. Matz C., Webb J.S., Schupp P.J., Phang S.Y., Penesyan A., Egan S., Steinberg P., Kjelleberg S. Marine biofilm bacteria evade predation by targeted chemical defence. *PLoS One*, **3**, e2744 (2008)
44. Monnappa A.K., Dwidar M., Seo J.K., Hur J.H., Mitchell R.J.: *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. *Sci. Rep.* **4**, 3811 (2014)
45. Núñez M.E., Martin M.O., Chan P.H., Spain E.M.: Predation, death and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B,* **42**, 263–271 (2005)
46. Pan A., Chanda I., Chakrabarti J.: Analysis of the genome and proteome composition of *Bdellovibrio bacteriovorus*: indication for recent prey-derived horizontal gene transfer. *Genomics,* **98**, 213–222 (2011)
47. Paul E.A., Clark F.E. Mikrobiologia i biochemia gleb. Wyd. UMCS, Lublin 2000, s. 116–120
48. Rendulic S., Jagtap P., Rosinus A., Eppinger M., Baar C., Lanz C., Keller H., Lambert C., Evans K.J., Goesmann A., Meyer F.,

Sockett R.E., Schuster S.C.: A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, **30**, 689–692 (2004)
49. Roberts R.C., Keefer M.A., Ranu R.S.: Characterization of *Bdellovibrio bacteriovorus* bacteriophage MAC-1. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3065–3070 (1987)
50. Rohwer F., Thurber R.V.: Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, **459**, 207–212 (2009)
51. Rønn R., McCaig A.E., Griffiths B.S., Prosser J.I.: Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6094–6105 (2002)
52. Schwudke D., Strauch E., Krueger M., Appel B. Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *System Appl. Microbiol.* **24**, 385–394 (2001)
53. Sigee D.C. Freshwater Microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. Wyd. John Wiley & Sons Inc., Chichester 2005, s. 401–423
54. Varon M., Levisohn R.: Three-membered parasitic system: a bacteriophage, *Bdellovibrio bacteriovorus*, and *Escherichia coli*. *J. Virol.* **9**, 519–525 (1972)
55. Varon M., Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. *J. Bacteriol.* **95**, 744–753 (1968)
56. Wang Z., Kadouri D.E., Wu M.: Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13. *BMC Genomics*, **12**, 453 (2011)
57. Weinbauer M.G.: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 127–181 (2004)
58. Williams H.N., Pineiro S. Ecology of the predatory Bdellovibrio and like organisms. (w) Predatory prokaryotes. Biology, Ecology and Evolution. Microbiology Monographs, red. Jurkevitch E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, s. 213–248
59. Withey S., Cartmell E., Avery L.M., Stephenson T.: Bacteriophages – potential for application in wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* **339**, 1–18 (2005)
60. Wommack K.E., Colwell R.R.: Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 69–114 (2000)

POST. MIKROBIOL.,
2015, 54, 1, 75–82
http://www.pm.microbiology.pl

ZASTOSOWANIE TECHNIKI REAL-TIME PCR W WIRUSOLOGII

Sylwia Rynans[1], Szymon Walter de Walthoffen[1], Tomasz Dzieciątkowski[1]*, Grażyna Młynarczyk[1]

[1] Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpynęło w czrwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Sposoby detekcji wykorzystywane w real-time PCR. 3. Zalety i wady techniki real-time PCR. 4. Zastosowanie real-time PCR w diagnostyce wirusologicznej. 5. Wykorzystanie real-time PCR w wirusologicznych badaniach naukowych. 6. Podsumowanie

Application of real-time PCR in virology

Abstract: Real-time PCR is based on the revolutionary technique of polymerase chain reaction, which allows amplifying DNA more than a billion-fold. This method is used to monitor the progress of a PCR reaction in real time, and permits the detection of the number of amplicons generated during each amplification cycle. The described technique is now easy to perform, has high sensitivity and specificity, and provides the scope for automation. Within the field of microbiology, the application of real-time PCR has a significant impact upon virology. This review presents the background, advantages and limitations, as well as common applications of real-time PCR in virology, including biomedical research and laboratory diagnostics.

1. Introduction. 2. Detection formats in real-time PCR technique. 3. Advantages and limitation of the method. 4. Real-time PCR in molecular diagnostics of viral diseases. 5. Use of real-time PCR in biomedical research. 6. Summary

Słowa kluczowe: real-time PCR, wirusologiczna diagnostyka molekularna, badania naukowe
Key words: real-time PCR, molecular diagnostics in virology, biomedical research

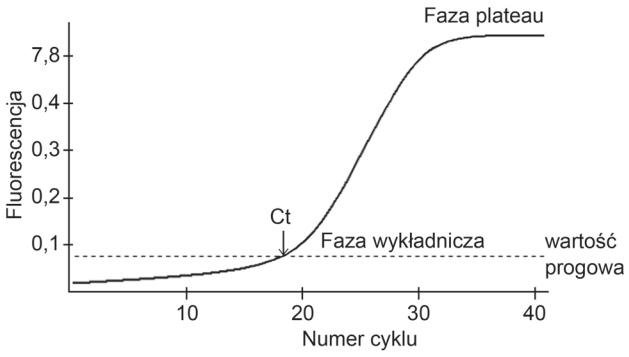
1. Wstęp

Łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction; PCR) pozwala na amplifikację oraz detekcję określonego fragmentu kwasu nukleinowego, co znalazło zastosowanie w wielu dziedzinach nauki. Technika ta została opracowana w latach 80. XX wieku przez Kary'ego Mullisa [29], który w 1993 r. otrzymał za jej odkrycie Nagrodę Nobla. W roku 1992 Higuchi i wsp. stworzyli system pozwalający na wykrywanie produktów w czasie ich akumulacji, gdzie do mieszaniny reakcyjnej dodano bromek etydyny, który interkalował między powielone fragmenty dwuniciowego DNA. Próbki naświetlane były promieniowaniem UV, a poziom otrzymanej fluorescencji wykrywano po każdym cyklu reakcji za pomocą kamery CCD połączonej z komputerem [15]. W ten sposób po raz pierwszy przeprowadzono PCR z analizą w czasie rzeczywistym (real-time PCR; qPCR). Real-time PCR pozwala na szybkie wykrywanie oraz powielanie kwasów nukleinowych, a także obserwację przebiegu reakcji w czasie jej trwania. Technika ta w oparciu o dane krzywej wzorcowej fluorescencji, pozwala także na oznaczenie liczby kopii wirusa w mieszaninie na początku reakcji (ilościowy real-time PCR) [47]. Możliwość przeprowadzenia oznaczeń ilościowych znalazła szerokie zastosowanie w naukach przyrodniczych, w tym także w wirusologii. Dzięki temu qPCR jest cennym narzędziem diagnostycznym dającym możliwość przewidywania stanu zakażenia, identyfikację różnych etapów wirusowego zakażenia czy monitorowanie skuteczności zastosowanej terapii przeciwwirusowej [24, 27, 37, 46].

2. Sposoby detekcji wykorzystywane w real-time PCR

Analiza przyrostu produktu w czasie rzeczywistym możliwa jest dzięki zastosowaniu odpowiednich barwników lub sond fluorescencyjnych. Aparat, w którym przeprowadzana jest reakcja mierzy zmiany we fluorescencji badanej próbki podczas każdego cyklu amplifikacji. Emisja sygnału fluorescencji jest proporcjonalna do ilości produktu powstałego w każdym cyklu reakcji, a tym samym do ilości matrycy. Na początkową ilość DNA wskazuje pierwszy znaczący wzrost emisji fluorescencji przekraczający zdefiniowany próg (threshold cycle; *Ct*). Im większa wyjściowa liczba kopii amplifikowanego DNA, tym niższa wartość progowa cyklu [45, 47].

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel: 22 599 17 74; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl



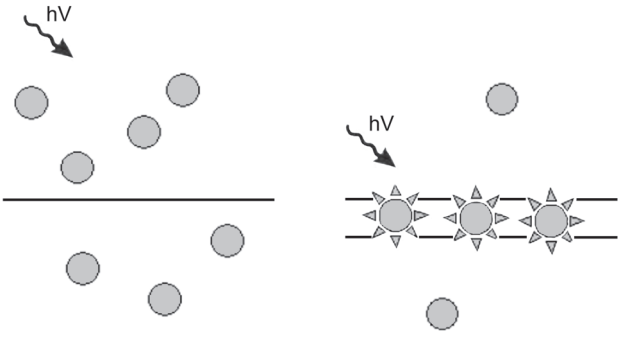
Ryc. 1. Wzrost fluorescencji próbki podczas amplifikacji w czasie rzeczywistym (obserwacje własne)

W powszechnym użyciu są zarówno swoiste sondy oraz nieswoiste barwniki fluorescencyjne. Do tych ostatnich należą związki, które po wniknięciu między dwuniciowe fragmenty DNA emitują fluorescencję. Początkowo stosowany barwnik nieswoisty – bromek etydyny – został zastąpiony przez bezpieczniejszą w użyciu pierwszą generację barwników takich, jak: jodek propidyny, SYBR Green I® czy też BEBO, z których najczęściej wykorzystywany jest wciąż SYBR Green I®. Barwnikami nieswoistymi drugiej generacji są fluorochromy umożliwiające analizę krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (high resolution melting; HRM), do których należą związki znane pod handlowymi nazwami EvaGreen®, ResoLight, LC Green® czy SYTO 9. W przeciwieństwie do wcześniejszych barwników niespecyficznych, związki te wysycają niemal w 100% dsDNA bez wpływu na efektywność amplifikacji, a co za tym idzie umożliwiają wykrycie nawet pojedynczo nukleotydowych mutacji w obrębie amplifikowanej sekwencji [41, 47].

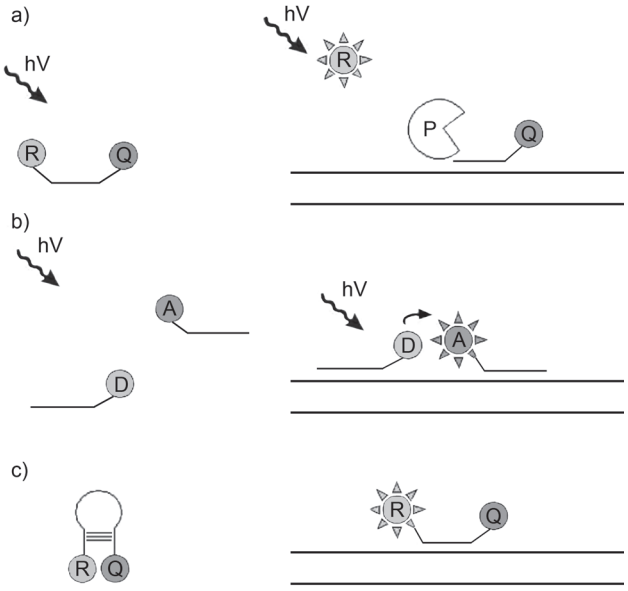
Test real-time PCR z użyciem barwników nieswoistych jest tani i łatwy do modyfikacji z konwencjonalnej techniki PCR, zaś wynik reakcji nie jest uzależniony od sekwencji kwasu nukleinowego, natomiast w zależności od długości amplifikowanego produktu otrzymuje się mniej lub bardziej intensywny sygnał fluorescencji [46]. Wadą opisywanych związków, zwłaszcza pierwszej generacji, jest jednak możliwość wnikania między produkty niespecyficzne lub dimery starterów, w wyniku czego możliwe jest uzyskanie wyników fałszywie dodatnich, zwłaszcza przy małych ilościach matrycowego DNA [2, 10]. Po zakończeniu reakcji z użyciem barwników nieswoistych należy przeprowadzić analizę krzywej topnienia produktu reakcji. Podczas tej analizy próbki są podgrzewane przy jednoczesnym pomiarze fluorescencji. Gwałtowny spadek fluorescencji następuje przy denaturacji dwuniciowego DNA, a temperatura topnienia jest uwarunkowana długością kwasu nukleinowego oraz zawartością par zasad. Sekwencje niespecyficzne będą ulegały denaturacji w innej temperaturze niż docelowy produkt reakcji. Zważywszy na niską specyficzność, ten wariant real-time PCR nie powinien być wykorzystywany w rutynowej diagnostyce chorób zakaźnych [10, 25].

Sondy swoiste są wyznakowanymi fluorescencyjnie oligonukleotydami komplementarnymi do amplifikowanych fragmentów DNA, wobec czego emisja fluorescenji możliwa jest wyłącznie w obecności swoistej matrycy [47]. Dostępne są różne rodzaje sond oligonukleotydowych, w zależności od użytego systemu ich znakowania. Najczęściej stosowane sondy hydrolizujące typu TaqMan® wyznakowane są na końcu 5' fluorochromem (reporterem; R), natomiast na końcu 3' wygaszaczem (quencher; Q). Bliska obecność wygaszacza w natywnej formie sondy pochałania energię fluorescencji barwnika reporterowego. Jeżeli w mieszaninie reakcyjnej znajduje się swoisty produkt PCR, następuje hybrydyzacja sondy do komplementarnej nici DNA. Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez zmodyfikowaną polimerazę Taq o własnościach 5'-egzonukleazy, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powoduje emisję fluorescencji, której natężenie mierzone jest po każdym cyklu reakcji [10, 26, 47].

Sondy hybrydyzujące (HybProbes®) stanowią układ dwóch oligonukleotydów komplementranych do tej samej nici DNA. Sondy te hybrydyzują w bliskiej odległości od siebie, gdyż dzieli je około 10 nukleotydów [26, 47]. Pierwsza z sond znakowana jest na końcu 3' fluoresceiną (FITC), zaś druga na końcu 5' jednym z barwników z serii LightCycler Red. Sondy te są tak zaprojektowane, by podczas etapu wydłużania wiązały się z produktem PCR w niewielkiej odległości od siebie, dzięki czemu po wzbudzeniu FITC na końcu 3' pierwszej sondy energia fluorescencji jest przekazywana na fluorochrom końca 5' drugiej sondy. Zjawisko to, określane jako transfer energii fluorescencji (FRET), powoduje wzbudzenie barwnika LightCycler Red i emisję światła o innej długości fali, która następnie jest wykrywana przez detektor termocyklera. Sondy typu HybProbes® pozwalają na wyznaczenie krzywej topnienia amplifikowanego produktu i określenie jego



Ryc. 2. Schemat działania barwników nieswoistych [wg 26, 45 – zmienione]
hV – promieniowanie UV



Ryc. 3. Schemat działania swoistych sond fluorescencyjnycj a) hydrolizujących, b) hybrydyzujących, c) sond o kształcie szpilki do włosów [wg 25, 26, 45 – zmienione]
A – akceptor, D – donor, hV – światło, Q – wygaszacz, P – polimeraza, R – reporter

temperatury topnienia, jednak ze względu na kłopotliwy proces optymalizacji warunków reakcji oraz ograniczenia patentowe są stosunkowo rzadko wykorzystywane w testach komercyjnych [10, 26, 47].

Sondy o kształcie szpilki do włosów (Molecular Beacons®) posiadają odpowiednio wyznakowane reporterem i wygaszaczem komplementarne do siebie końce 3' i 5', a komplementarny do produktu PCR fragment środkowy tworzy jednoniciową pętlę. W obecności swoistej matrycy sonda ulega hybrydyzacji do fragmentu docelowego, co powoduje jej linearyzację oraz rozdzielenie cząsteczek reportera i wygaszacza w wyniku czego po wzbudzeniu obserwuje się emisję fluorescencji [26, 47].

Sondami specyficznymi są także rzadziej używany układ starterów/sond typu SCORPIONS™, kwasy peptydonukleinowe (Peptide Nucleic Acid; PNA) czy też zmodyfikowane sondy typu TaqMan wiążące się z mniejszą bruzdą DNA (Minor Groove Binding; MGB) [46, 47].

3. Zalety i wady techniki real-time PCR

Choć istnieją inne metody biologii molekularnej umożliwiające przeprowadzenie oznaczeń ilościowych, większość z nich posiada pewne ograniczenia. Są one czasochłonne i pracochłonne, wykazują też niedostateczną czułość, wymagają użycia radioaktywnych izotopów lub są wrażliwe kontaminację produktu. Przykładami takich technik są hybrydyzacja typu Northern czy też Southern, PCR-hybrydyzacja-ELISA (PCR-ELHA), hybrydyzacja *in situ* oraz systemy wykorzystujące klasyczny PCR z rozdziałem DNA w żelu agarozowym [18, 45]. Metoda teal-time PCR ma nad nimi przewagę z różnych powodów; przede wszystkim umożliwia przeprowadzenie analizy ilościowej kwasów nukleinowych w bardzo szerokim zakresie – minimum 7–8 jednostek logarytmicznych, co przedkłada się na wysoką czułość, pozwalającą na wykrycie nawet kilkunastu kopii badanej sekwencji. Dzięki temu możliwa jest też analiza próbek o niewielkiej objętości. Przeprowadzenie reakcji w systemie zamkniętym utrudnia kontaminację produktu, co minimalizuje ryzyko otrzymania wyników fałszywie pozytywnych. Szybkość oraz powtarzalność metody są jej kolejnymi zaletami. Wszystko to sprawia, że real-time PCR jest metodą coraz cześciej wykorzystywaną zarówno w rutynowej diagnostyce, jak i badaniach naukowych. [22, 25]

Real-time PCR posiada jednak pewne ograniczenia: jej przebieg może być zakłócony obecnością inhibitorów w materiale klinicznym [40]. Przy ocenie ekspresji genów bardzo ważna jest jakość wykorzystanej matrycy. Nieprawidłowa izolacja wpływa na jakość RNA, co warunkuje wiarygodność uzyskanych wyników. Bardzo ważny jest też dobór odpowiedniego enzymu do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji, gdyż jakość otrzymanego cDNA będzie ważna dla prawidłowej oceny ekspresji [6]. Najważniejszym ograniczeniem są jednak błędy ludzkie przy projektowaniu metody. Wybór odpowiednich sekwencji sondy i starterów, dobór warunków reakcji oraz określenie jej specyficzności powinny być powtórzone wielokrotnie oraz zwalidowane. Nieprawidłowości na którymkolwiek etapie projektowania testu mogą powodować otrzymanie zafałszowanych wyników [45].

4. Zastosowanie real-time PCR w diagnostyce wirusologicznej

Przez wiele lat diagnostyka wirusologiczna była utrudniona ze względu na koszty, pracochłonność oraz brak umiejętności personelu w prowadzeniu hodowli

Tabela I
Zalety i ograniczenia techniki real-time PCR [wg 25, 26, 36, 45, 47]

Zalety	Ograniczenia
Szeroki zakres oznaczanych stężeń Wysoka czułość Precyzyjność Powtarzalność Minimalne ryzyko kontaminacji Wysoka przepustowość Szybkość	Eksponencjalny przyrost ilości produktu Możliwość nakładania się widm emisji Ryzyko zahamowania reakcji przez inhibitory PCR Błędy przy zaprojektowaniu metody

komórkowych, których wykorzystanie było „złotym standardem" w wykrywaniu zakażeń wirusowych. Hodowle komórkowe charakteryzowały się stosunkowo niską czułością; dodatkowo izolacja niektórych wirusów nie była, lub też wciąż nie jest, możliwa. Wykorzystywane do dzisiaj badania serologiczne, wykrywające wirusowe antygeny czy też swoiste przeciwciała w klasach IgM i IgG, są nieprzydatne we wczesnej fazie choroby oraz w detekcji zakażeń u osób z zaburzeniami odporności. Dlatego też wprowadzenie metod biologii molekularnej, w tym real-time PCR, przyczyniło się do znacznej poprawy diagnostyki wirusologicznej [36].

Technika real-time PCR jest często wykorzystywana do diagnostyki wirusowych zakażeń układu oddechowego, ośrdkowego układu nerwowego, zakażeń przenoszonych drogą krwi czy też zakazeń u osób poddanych immunosupresji [9]. Przy wielu zakażeniach wirusowych należy przeprowadzić oznaczenia ilościowe, które pozwalają na monitorowanie przebiegu zakażenia oraz skuteczności wdrożonej terapii przeciwwirusowej [14, 16, 19].

Badanie poziomu wiremii przy zakażeniu ludzkim wirusem niedoboru odporości (human immunodeficiency virus; HIV) jest ważnym elementem kontrolującym przebieg terapii. Wzrost wiremii w trakcie stosowania leków antyretrowirusowych może świadczyć o nabyciu oporności HIV na dany lek oraz progresji zakażenia, natomiast przy skutecznym działaniu leków wiremia jest zazwyczaj niewykrywalna [28]. Według rekomendacji Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS, po rozpoczęciu leczenia antyretrowirusowego, badanie HIV RNA powinno być wykonane po 2–8 tygodniach, po 3 miesiącach, a następnie raz na 3–6 miesięcy. Uzyskanie wiremii poniżej 400 kopii/ml po 3 miesiącach, oraz < 50 kopii/ml po 6 miesiącach leczenia uznawane jest za osiągnięcie supresji wirusologicznej. Pojawienie się wykrywalnej wiremii HIV w trakcie trwania leczenia jest wskazaniem do przeprowadzenia badania lekooporności oraz zmiany terapii antyretrowirusowej [16].

Terapię wirusowego zapalenia wątroby typu B można rozpocząć m.in. jeżeli poziom DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus; HBV) wynosi powyżej 2 000 IU/ml dla osób HBe(–) i powyżej 20 000 IU/mL dla osób HBe(+) [19]. W trakcie trwania terapii wymagane jest także monitorowanie jej skuteczności poprzez oznaczenia ilościowe HBV DNA. Jeżeli po 12 tygodniach od rozpoczęcia leczenia nie dojdzie do zmniejszenia wiremii o minimum 2 log10 względem wartości wyjściowej należy przerwać podawanie leków. Jeżeli nastąpi spadek poziomu wiremii terapia jest kontynuowana, a oznaczenie HBV DNA należy przeprowadzić również w 24 i 48 tygodniu jej trwania. Obniżenie wartości HBV DNA poniżej 2 000 IU/ml bezpośrednio po zakończeniu terapii można uznać za dobrą prognozę, zważywszy na prawdopodobne odległe skutki leczenia interferonem. Ostatecznie skuteczność terapii uznaje się przy osiągnięciu wartości HBV DNA poniżej progu wykrywalności w surowicy (< 15 IU/ml) [19]. Technika multiplex real-time PCR wykorzystywana jest również do genotypowania HBV [36].

Przy wirusowym zapaleniu wątroby typu C (WZW C) oznaczenia ilościowe poziomu RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus, HCV) pozwalają na identyfikację pacjentów wymagających leczenia, monitorowanie jego przebiegu oraz dokumentacje niepowodzeń terapii [3, 14]. Technika real-time PCR pozwala także na genotypowanie HCV, które należy wykonać obowiązkowo przed rozpoczęciem terapii [13]. Oznaczenie ilościowe należy wykonać koniecznie w 12 tygodniu terapii zakażeń genotypem 1, 4, 5 oraz 6. Brak wykrycia RNA HCV w 12 tygodniu leczenia daje 75% szansy na uzyskanie trwałej odpowiedzi immunologicznej, natomiast jeżeli nie stwierdza się spadku wiremii o minimum 2 $\log_{10}$ względem wartości wyjściowej należy wówczas przerwać leczenie. W dal-

Tabela II
Zastosowanie real-time PCR w diagnostyce zakażeń wirusowych [wg 3, 9, 10, 22, 36, 37, 46]

Układ/narządy docelowe	Materiał kliniczny	Czynnik etiologiczny
Ośrodkowy układ nerwowy	Płyn mózgowo-rdzeniowy	CMV, EBV, enterowirusy, HHV-6, HHV-7, HSV, HTLV, wirus wścieklizny
Górne i dolne drogi oddechowe	Wymaz z nosa lub gardła, popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, aspirat tchawiczy	wirusy grypy, PIV, RSV, HAdV
Spojówki	Wymaz z rogówki lub worka spojówkowego	HSV, HAdV
Zmiany na narządach płciowych	Wymaz ze zmian bezpośrednich	HSV, HPV
Zmiany pęcherzykowe na skórze	Płyn z pęcherzyków	HSV, VZV
Zapalenie wątroby	Surowica krwi	HBV, HCV
Zakażenia u osób poddanych immunosupresji	Surowica krwi	BKV, CMV, HAdV, HIV, HTLV, HHV-6

szych tygodniach terapii możliwe jest przeprowadzenie oznaczeń ilościowych, jak i jakościowych [11, 14].

Oznaczanie poziomu wiremii jest także powszechnym standardem w monitorowaniu zakażeń wirusem cytomegalii (cytomegalovirus; CMV), zwłaszcza u pacjentów poddanych przeszczepieniu macierzystych komórek krwiotwórczych (haematpoietic stem cell transplantation; HSCT). CMV jest jedną z głównych przychyn zachorowań oraz zgonów u osób poddanych immunosupresji, w tym biorców HSCT [24]. W monitorowaniu reaktywacji tego wirusa przez wiele lat jako „złoty standard" stosowano ozaczenie antygenu wczesnego CMV – fosfoproteiny pp65 (produkt genu *UL83* CMV). Ze względu na pewe ograniczenia tej metody, od kilku lat z powodzeniem wykorzystywana jest w tym celu technika real-time PCR [12, 24]. Według Zaleceń Europejskiej Grupy Przeszczepiania Komórek Hematopoetycznych (European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation; EBMT) u biorców komórek krwiotwórczych zalecane jest monitorowanie DNAemii dwa razy w tygodniu, co najmniej do setnego dnia po zabiegu przeszczepienia [40]. Wykrycie DNA CMV w surowicy pacjenta oraz obserwowanie narastania wiremii umożliwia zastosowanie terapii wyprzedzającej przed pojawieniem się objawów klinicznych zakażenia. Oznaczenia ilościowe umożliwiają także ocenę skuteczności zastosowanej terapii przeciwwirusowej [8, 35].

Technika real-time PCR znalazła również zastosowanie w wykrywaniu oraz genotypowaniu wirusa brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus; HPV). Ze względu na wagę problemu dostępnych jest obecnie wiele testów komercyjnych pozwalających na detekcję oraz różnicowanie poszczególnych typów HPV [1]. Wykrycie wysokoonkogennych typów wirusa umożliwia wczesną identyfikację ryzyka rozwoju raka szyjki macicy lub też nowotworów głowy i szyi oraz wczesne podjęcie leczenia rozpoznanych zmian [21, 31].

4. Wykorzystanie real-time PCR w wirusologicznych badaniach naukowych

W badaniach naukowych technika real-time PCR wykorzystywana jest do wykrywania i oznaczania ilości genomów wirusów, nie objętych rutynowymi procedurami diagnostycznymi, badania ekspresji wirusowych genów czy też do wykrywania mutacji punktowych w obrębie genomu wirusów.

Ponieważ większość firm skupia się przede wszystkim na projektowaniu zestawów wykrywających najpopularniejsze patogeny wirusowe, jest wciąż duża grupa wirusów w odniesieniu do których brak jest na rynku stosownych testów diagnostycznych. Istnieje wówczas możliwość zaprojektowania, optymalizacji czy też walidacji własnej metody opartej na technice real-time PCR, wykrywającej sekwencję genetyczną konkretnego wirusa. Przykładem może być badanie obecności i poziomu wiremii ludzkich adenowirusów (HAdV) u pacjentów z zaburzeniami odporności [4, 33]. Choć kliniczne znaczenie zakażeń HAdV wśród osób poddanych immunosupresji zostało wielokrotnie opisane, procedury monitorowania DNA adenowirusów nie zostały dotychczas ujęte w schemat postępowania potransplantacyjnego [34]. Wykorzystanie techniki qPCR umożliwia poznanie zmian liczby kopii wirusa na mililitr materiału badanego w czasie trwania potencjalnego leczenia, na podstawie czego można wnioskować o skuteczności zastosowanej terapii [33, 44]. Biorąc pod uwagę ilościowy wynik badania łatwiej jest podjąć decyzję o zmniejszeniu dawek leków przeciwwirusowych przy pojawieniu się skutków ubocznych lub o zmianie leczenia na skuteczniejsze [27, 44].

Podobna zależność istnieje także w przypadku prowadzenia molekularnego nadzoru epidemiologicznego nad wirusami grypy, których duża zmienność sprawia, że opracowywanie nowych reakcji PCR z nowymi zestawami starterów i sond pozostaje stale aktualną potrzebą [37, 39]. Większość dostępnych testów komercyjnych skupia się jedynie na rozróżnianiu typów wirusa A i B, ewentualnie włączeniu do tego schematu wykrywania wyłącznie jednego podtypu wirusa, zwykle A(H5N1) lub A(H1N1)pdm09 [30, 38]. Z epidemiologicznego punktu widzenia niezbędne jest również wykrywanie pozostałych wariantów wirusa grypy krążących w populacji na danym terenie, przy czym testy opracowane samodzielnie w laboratoriach referencyjnych mogą mieć zastosowanie zarówno do bezpośredniego badania próbek klinicznych, jak i do wstępnej identyfikacji izolowanych szczepów wirusa grypy [17, 39].

Analizę ekspresji genu za pomocą metody real-time PCR można przeprowadzić na dwa sposoby. Sposób bezwzględny pozwala okreslić poczatkową ilość matrycy np. liczbę kopii badanego genu w komórce. Amplifikacja matrycy uzyskanej w trakcie odwrotnej transkrypcji pozwala określić ilość cDNA w badanej próbie. Jeżeli jednak badamy zmianę ekspresji w obecności różnych czynników lub wprowadzonych genów należy przeprowadzić analizę względną, której wynik porównywany jest do próby kontrolnej [6]. Docelowy gen zostaje powielany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej cDNA oraz gen referencyjny (tzw. „*housekeeping gene*"), którgo poziom ekspresji jest stały we wszystkich komórkach. Najczęściej wykorzystywanymi genami referencyjnymi są ulegające konstytutywnej ekspresji geny metabolizmu podstawowego m.in. gen dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego, gen β-aktyny, gen β2-mikroglobuliny oraz geny 18S i 28S rybosomalnego RNA [7]. Otrzymany wynik, podawany jako procent zmiany eksresji badanego genu w danej próbce w stosunku do przyjętej 100% ekspresji genu referencyjnego

w próbce kontrolnej, pokazuje pewien obraz rzeczywistego poziomu transkrypcji w komórce. W wirusologii, analiza ekspresji genów jest wykorzystywana do badania patogenezy zakażeń wirusowych oraz odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie [45].

Real-time PCR pozwala także na analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism; SNP). Do wykrywania pojedynczych zmian wykorzystuje się analizę HRM, która polega na monitorowaniu zachowania wcześniej zamplifikowanych fragmentów DNA w trakacie denaturacji. Porównanie profili topnienia poszczególnych fragmentów kwasów nukleinowych pozwala na selekcję fragmentów wykazujących różnice w przebiegu denaturacji, co odzwierciedla zmiany w sekwencji DNA [32, 41]. Technika HRM wykorzystywana jest do badania zmienności genetycznej m.in. wirusów grypy czy też HIV [5, 20]. Wirusy grypy wykazują znaczną zmienność genetyczną na skutek zmian atygenowych. W następstwie mutacji punktowych okreslanych jako przesunięcie (dryf antygenowy) lub reasortacji genetycznej (skok antygenowy) powstają nowe warianty antygenowe. Powoduje to utrudnienia w diagnostyce oraz jest przyczyną powstania nowych, wysoce zakaźnych podtypów wirusa. Real-time PCR wykorzystujący technikę HRM pozwala na szybkie różnicowanie istniejących wirusów grypy oraz wykrywanie nowo pojawiających się wariantów klinicznych [23]. Wysoką zmienność genetyczną spowodowaną m.in. szybkim tempem replikacji oraz spontanicznymi i licznymi mutacjami punktowymi wykazuje także HIV. Zmiany w sekwencji genomu tego wirusa mogą powodować nieskuteczność stosowanej terapii antyretrowirusowej; sa też przyczyną ciągłych niepowodzeń w opracowaniu skutecznej szczepionki przeciwko HIV. Wykrywanie zmienności genetycznej HIV przy użyciu techniki HRM jest stosowane coraz częściej, zwłaszcza iż metoda ta jest tańsza niż sekwencjonowanie [42].

Przy korzystaniu z testów real-time PCR opracowywanych samodzielnie w laboratoriach należy jednak pamiętać, że zgodnie z załącznikiem II do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 12.01.2011 (Dz.U. nr 16 poz. 75), część wirusów należy do patogenów z wykazu A (HIV, HTLV, HBV, HCV) lub też wykazu B (CMV, wirus różyczki), a więc wszystkie testy stosowane do diagnostyki zakażeń nimi u człowieka muszą posiadać znak CE/IVD [48]. Obostrzenie to nie dotyczy oczywiście zestawów wykorzystywanych wyłącznie w celach naukowych.

5. Podsumowanie

Metoda qPCR umożliwia obserwację przebiegu reakcji w trakcie jej trwania oraz pozwala określić liczbę kopii DNA w próbce, co znalazło szerokie zastosowanie w wirusologii; zarówno w diagnostyce, jak i w badaniach naukowych. Real-time PCR pozwala nie tylko na wykrywanie wirusów, ale również oznaczenia poziomu wiremii w różnych materiałach klinicznych. Oznaczenie liczby kopii wirusa jest ważne przy monitorowaniu terpii zakażeń HIV, HBV, HCV czy też CMV, a obserwowany spadek wiremii świadczy o skuteczności wdrożonego leczenia. W badaniach naukowych real-time PCR wykorzystywany jest do analizy ekspresji genów oraz analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów. Użycie techniki qPCR połączonej z analizą HRM ze względu na swą czułość oraz niezbyt wysokie koszty jest coraz powszechniej stosowane do badania zmienności genetycznej m.in. wirusów grypy oraz HIV.

Piśmiennictwo

1. Abreu A.L., Souza R.P., Gimenes F., Consolaro M.E.: A review of methods for detect human papillomavirus infection. *Virol. J.* **9**, 262 (2012)
2. Chabros Ł., Przybylski M., Dzieciątkowski T., Łuczak M.: Modyfikacja i optymalizacja metod PCR do wykrywania regionu MIE ludzkiego herpeswirusa typu 5. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 79–86 (2008)
3. Chevaliez S.: Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 116–121 (2011)
4. Claas E.C., Schilham M.W., de Brouwer C.S., Hubacek P., Echavarria M., Lankester A.C., van Tol M.J., Kroes A.C.: Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1738–1744 (2005)
5. Cousins M.M., Ou S.S., Wawer M.J., Munshaw S., Swan D., Magaret C.A., Mullis C.E., Serwadda D., Porcella S.F., Gray R.H., Quinn T.C., Donnell D., Eshleman S.H., Redd A.D.: Comparison of a high-resolution melting assay to next-generation sequencing for analysis of HIV diversity. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3054–3059 (2010)
6. Deepak S., Kottapalli K., Rakwal R., Oros G., Rangappa K., Iwahashi H., Masuo Y., Agrawal G.: Real-time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*, **8**, 234–251 (2007)
7. Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A.: Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques,* **37**, 112–119 (2004)
8. Dzieciątkowski T., Przybylski M., Tomaszewska A., Rokicka M., Łuczak M.: Comparison of two methods used for monitoring low-copy cytomegalovirus infection in a patient with chronic myeloid leukemia after unrelated umbilical cord blood transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **55**, 199–203 (2007)
9. Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., Klapper P.E.: Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev*. **13**, 559–570 (2000)
10. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F.: Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev*. **19**, 165–256 (2006)
11. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçales F.L. Jr, Häussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J.: Peginterferon

alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med*. **347**, 975–982 (2002)
12. Gimeno C., Solano C., Latorre J.C., Hernández-Boluda J.C., Clari M.A., Remigia M.J., Furió S., Calabuig M., Tormo N., Navarro D.: Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3311–3318 (2008)
13. González V., Gomes-Fernandes M., Bascuñana E., Casanovas S., Saludes V., Jordana-Lluch E., Matas L., Ausina V., Martró E.: Accuracy of a commercially available assay for HCV genotyping and subtyping in the clinical practice. *J. Clin. Virol.* **58**, 249–253 (2013)
14. Halota W., Flisiak R., Boroń-Kaczmarska A., Juszczyk J., Cianciara J., Pawłowska M., Simon K., Małkowski P.: Standardy leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C. Rekomendacje Polskiej Grupy Ekspertów HCV, 2011 rok. *Przegl. Epidemiol.* **66**, 83–88 (2012)
15. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology,* **10**, 413–417 (1992)
16. Horban A., Podlasin R., Cholewińska G., Wsiercińska-Drapało A., Knysz B., Inglot M., Szymczak A.-red: Zalecenia Polskiego Towarzystawa Naukowego AIDS 2012: Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV. *Agencja Wydawnicza EkoPress,* Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, Warszawa–Wrocław, 2012, s. 59–60
17. Huber I., Campe H., Sebah D., Hartberger C., Konrad R., Bayer M., Busch U., Sing A.: A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. *Euro Surveill.* **16**, 19798 (2011)
18. Jungkind D.: Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction: our past, our present, our future. *J. Clin. Virol.* **20**, 1–6 (2001)
19. Juszczyk J., Boroń-Kaczmarska A., Cianciara J., Flisiak R., Gładysz A., Halota W., Kryczka W., Małkowski P., Pawłowska M., Simon K. Zalecenia terapeutyczne na rok 2013: Leczenie przeciwwirusowe przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 383–391 (2013)
20. Kalthoff D., Beer M., Hoffmann B.: High resolution melting analysis: rapid and precise characterisation of recombinant influenza A genomes. *Virol. J*. **10**, 284 (2013)
21. Kerr D.A., Pitman M.B., Sweeney B., Arpin R.N. 3rd, Wilbur D.C., Faquin W.C.: Performance of the Roche Cobas 4800 high-risk human papillomavirus test in cytologic preparations of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Cytopathol.* **122**, 167–174 (2014)
22. Klein D.: Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med*. **8**, 257–260 (2002)
23. Lin J.H., Tseng C.P., Chen Y.J., Lin C.Y., Chang S.S., Wu H.S., Cheng J.C.: Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis. *Clin. Microbiol.* **46**, 1090–1097 (2008)
24. Ljungman P., de la Camara R., Cordonnier C., Einsele H., Engelhard D., Reusser P., Styczynski J., Ward K.: Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* **42**, 227–240 (2008)
25. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. **30**, 1292–1305 (2002)
26. Mackay I.M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190–212 (2004)
27. Matthes-Martin S., Feuchtinger T., Shaw P.J., Engelhard D., Hirsch H.H., Cordonnier C., Ljungman P.: European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transplant Infect. Dis.* **14**, 555–563 (2012)
28. Miller W.C., Powers K.A., Smith M.K., Cohen M.S.: Community viral load as a measure for assessment of HIV treatment as prevention. *Lancet Infect. Dis.* **13,** 459–464 (2013)
29. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am*. **262**, 56–61, 64–65 (1990)
30. Novak-Weekley S.M., Marlowe E.M., Poulter M., Dwyer D., Speers D., Rawlinson W., Baleriola C., Robinson C.C.: Evaluation of the Cepheid Xpert Flu Assay for rapid identification and differentiation of influenza A, influenza A 2009 H1N1, and influenza B viruses. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1704–1710 (2012)
31. Preisler S., Rebolj M., Untermann A., Ejegod D.M., Lynge E., Rygaard C., Bonde J.: Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche Cobas HPV real-time PCR assay. *PLoS One,* **8**, 59765 (2013)
32. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T.: High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, **8**, 597–608 (2007)
33. Rynans S., Dzieciątkowski T., Basak G.W., Snarski E., Przybylski M., Wróblewska M., Jędrzejczak W.W., Młynarczyk G.: Human adenovirus infection in patients subjected to allogeneic haemopoietic stem cell transplantation – a three year single centre study. *Acta Virol.* **56**, 85–87 (2012)
34. Rynans S., Dzieciątkowski T., Młynarczyk G.: Zakażenia adenowirusami u osób z niedoborami odporności. *Post. Hig. Med. Dośw.* **67**, 964–972 (2013)
35. Sahin D.G., Gunduz E., Kasifoglu N., Akay O.M., Us T., Gulbas Z.: Cytomegalovirus DNAemia detected with real-time polymerase chain reaction in hematopoietic stem cell transplant patients. *Adv. Ther*. **30**, 784–91 (2013)
36. Speers D.J.: Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin. Biochem. Rev.* **27**, 39–51 (2006)
37. Stefańska I., Romanowska M., Brydak L.B.: Metody wykrywania wybranych wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego. *Postępy Hig. Med. Dośw*. **66**, 452–460 (2012)
38. Stefańska I., Dzieciątkowski T., Brydak L.B., Romanowska M.: Zastosowanie reakcji duplex real-time PCR do identyfikacji wirusów grypy podtypu A(H1)pdm09 i A(H3). *Med. Dośw. Mikrobiol.* **64**, 129–137 (2012)
39. Stefańska I., Dzieciątkowski T., Brydak L.B., Romanowska M.: Application of three duplex real-time PCR assays for simultaneous detection of human seasonal and avian influenza viruses. *Arch. Virol.* **158**, 1743–1753 (2013)
40. Tomblyn M., Chiller T., Einsele H., Gress R., Sepkowitz K., Storek J., Wingard J.R., Young J.A., Boeckh M.J.: Center for International Blood and Marrow Research; National Marrow Donor program; European Blood and Marrow Transplant Group; American Society of Blood and Marrow Transplantation; Canadian Blood and Marrow Transplant Group; Infectious Diseases Society of America; Society for Healthcare Epidemiology of America; Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada; Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **15**, 1143–1238 (2009)
41. Tong S.Y., Giffard P.M.: Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3418–3421 (2012)

42. Towler W.I., James M.M., Ray S.C., Wang L., Donnell D., Mwatha A., Guay L., Nakabiito C., Musoke P., Jackson J.B., Eshleman S.H.: Analysis of HIV diversity using a high-resolution melting assay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **26**, 913–918 (2010)
43. Trombley Hall A., McKay Zovanyi A., Christensen D.R., Koehler J.W., Devins Minogue T.: Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples. *PLoS One*, **8**, 73845 (2013)
44. Ulrych E.E., Dzieciątkowski T., Przybylski M., Zduńczyk D., Boguradzki P., Torosian T., Waszczuk-Gajda A., Rynans S., Wróblewska M., Jędrzejczak W.W., Młynarczyk G.: Disseminated adenovirus disease in immunocompromised patient successfully treated with oral ribavirin – a case report. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **59,** 473–477 (2011)
45. Valasek M.A., Repa J.J.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* **29**, 151–159 (2005)
46. Watzinger F., Ebner K., Lion T.: Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Aspects. Med.* **27**, 254–298 (2006)
47. Wilhelm J., Pingoud A.: Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem.* **4**, 1120–1128 (2003)
48. Internetowy System Aktów Prawnych 14.11.2014 (online) isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20110160075

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii nie drukowane w innych czasopismach, prace przeglądowe metodyczne oraz w dziale Nowości Wydawniczych recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły i ilustracje drukowane w ***Postępach Mikrobiologii*** nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu

1.1. Tekst

Prace należy przysyłać do Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL jako załącznik poczty elektronicznej. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5). Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, adresy autorów i afiliacje, telefony oraz e-mail z zaznaczeniem autora korespondencyjnego, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. Na oddzielnej stronie za stroną tytułową należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści.

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przygotowane wg. wyżej wymienionych wytycznych należy przesłać na adres Redaktora Działu. Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac napisanych po angielsku.

1.2. Ilustracje i tabele

Tabele i rysunki powinny być dostarczone jako osobne pliki. Maksymalne rozmiary rysunków i tabel planowanych w artykule w jednej szpalcie nie powinny przekraczać szerokości 82 mm, a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt – 169 mm. Dozwolona wysokość grafik wynosi 246,6 mm.

W manuskrypcie nie należy pozostawiać wolnych miejsc na tabele, rysunki i zdjęcia, a tylko w tekście zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np. tab. I, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załączyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą "objaśnienia w tekście". Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako dowolne pliki graficzne lub tekstowe, ale w wersji ostatecznej do druku powinny być dostarczone jako pliki TIFF albo EPS. Grafiki należy przesyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększania lub zmniejszania w Wydawnictwie. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje muszą pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi. Wydawca pobiera opłatę za wydruk kolorowych ilustracji. Pliki pochodzące z programu Microsoft Office (Power Point, Word) akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie rysunki (oprócz czarno białych z MS Office) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, blacK). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Redakcja nie akceptuje kolorowych ilustracji wykonanych w Microsoft Office ponieważ są one zapisane w systemie RGB.

Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rysunków. Każdy rysunek musi być dołączony jako osobny plik, a rysunki wielo panelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman Pl, Arial, Arial Pl oraz Symbol. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres sekretarza redakcji.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowaną literaturę (Piśmiennictwo) należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony manuskryptu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona, i rok wydania (w nawiasie), np.:

1. Adams G.M., Blumenthal R.M.: Gene *pvuIIW*: a possible modulator of PvuII endonuclease subunit association. *Gene*, **157**, 193–199 (1999)
2. Beld J., Woycechowsky K.J., Hilvert D.: Diselenides as universal oxidative folding catalysts of diverse proteins. *J. Biotechnol.* **150**, 481–489 (2010)

Lista stosowanych nazw i skrótów czasopism znajduje się w bazie Journal Title Abbreviations – Web of Science. W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10 (przytoczona poniżej praca jest dziełem 42 autorów), należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

1. Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **338**, 539–543 (1997)

Cytacje prac z czasopism ukazujących się tylko w sieci internetowej powinny zawierać następujące dane: liczba porządkowa,

nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona (lub jej odpowiednik), i rok wydania (w nawiasie). W przypadku, gdy wydawnictwo nie stosuje numeracji stron, należy podać numer DOI, np.:

1. Esberg A., Muller L.A., McCusker J.H.: Genomic structure of and genome-wide recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* S288C progenitor isolate EM93. *PloS one*, **6**, e25211 (2011)
2. Stachowiak R., Łyżniak M., Budziszewska B.K., Roeske K., Bielecki J., Hoser G., Kawiak J.: Cytotoxicity of bacterial metabolic products, including Listeriolysin O, on leukocyte targets. *J. Biomed. Biotechnol.* DOI:10.1155/2012/954375 (2012)

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora lub współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu stronę, np.:

1. Boulton R.B., Singleton V.L, Bisson L.F., Kunkee R.E. Principles and practices of winemaking. Chapman Hall, New York, 1996
2. Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E. Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) Microbial Adhesion and Invasion, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer, New York, 1992, s. 85–94

Powoływanie się w tekście na pozycje cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach np. [10]. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.4. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Preferowane jest cytowanie informacji pochodzących z prac oryginalnych wydawanych przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Redakcja będzie również uznawać cytacje informacji ze źródeł autoryzowanych przez uznane w środowisku autorytety z dziedziny nauk przyrodniczych. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania pliku. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco: autorzy (jeśli są znani), tytuł artykułu, strona, adres www, (data ostatniego sprawdzenia adresu) np.:

1. Poliomyelitis. World Health Organization, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en (06 marca 2014 roku)

2. Prawo autorskie

W polskim prawodawstwie autorskie prawo osobiste interesujące szczególnie autorów *Postępów Mikrobiologii* oraz autorskie prawo majątkowe reguluje Ustawa z dn. 4-tego lutego 1994 r. (Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.).

Autorskie prawo osobiste, zwane dalej w **Informacji dla Autorów** prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu – wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczania" utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów)
- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

Konieczność ochrony Autorskich praw osobistych innych Autorów przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii* **obliguje nas do przyjęcia następującej procedury:**

(a) Reprodukcja utworów wytworzonych przez innych Autorów w pracy własnej, przesłane do opublikowania w *P.M.* **tj**. cudzych rysunków lub tabel – pochodzących z oryginalnej, pierwotnej pracy innego Autora/twórcy – bądź cytowanie fragmentów cudzego tekstu, wymaga od Autorów *P.M.* wcześniejszego uzyskania przez nich pisemnej zgody od Autorów pierwotnej pracy lub Wydawnictwa (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Zgodę tę w formie oryginalnego zaświadczenia należy przysłać wraz z materiałami reprodukowanymi do Redakcji *P.M.*
   - Pod cytowanym rysunkiem należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy z której pochodzi rysunek oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.
   - Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rysunkach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych rysunkach mogą wynikać z chęci Autorów *P.M.* do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na dokonanie zmian w reprodukowanym rysunku wynika z możliwości ingerencji Autorów *P.M.* w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję *P.M.* manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskryptem Oświadczenia dotyczącego praw autorskich.

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii,* za instrukcją **ASM** – można znaleźć w **Instructions to Authors,** *J. Bacteriol.*

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ("Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars" (M.Y. Popoff i L.Le Minor, WHO Colla-

* Fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *P.M.* za zgodą Journals Departments ASM.)

borating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and "Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme" (A. C. McWhorter-Murlin and F. W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.)) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki tj. *S. enterica* i *S. bongori* – pierwszy z nich podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie posiadające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp**, **typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem (np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. sv**.** Typhimurium, bądź po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

3.2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Ww. określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp. *Genetics* **54** 61: 76, 1966.

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol^+); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol^-). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (Str^S).

(b) Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą (np. *ara, his, rps.*). Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p, t* oraz *o* (np. *lacZp, lacZt, lacZo;*. Bachman i Low; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56, 1980).

(c) Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie *plus* nad oznaczeniem genu np. ara^+, his^+, nie oznacza się natomiast zmutowaych alleli znakiem *minus*.

(d) Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawiania liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1, araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus , zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara*-23).

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami, jak *plus* dla typu dzikiego – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. $his_{E.coli}$ lub his_{K-12}. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; $glnA_1$ i $glnA_2$.

(g) Delecję oznacza się symbolem ‚Δ usytuowanym przed zdelecjonowanym genem lub regionem np. Δ *trpA432,* Δ *(aroP--aceE)419,* lub Δ *his(dhuA hisJ hisQ)1256.* Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – *F (ara-lac)1256*. Podobnie F *(araB*'-$lacZ^+$)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE)1.* Insercję genu *his E. coli* do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0kb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12*hisB*)4. Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F' 8(gal^+).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:
- nazwy miar i wag regulowanych przez *Systeme International dc Unites* (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.
- skróty nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP, ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD^+, NADH, NADPH, $NADP^+$, poly(A), poly(dT) itp.,
- nazwy powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej np. PCR, SDS-PAGE, nazwy ogólnie znanych linii komórkowych np. HeLa, J774
- nazwy jednostek biologicznych; PFU (jednostka formowania łysinek), CFU (jednostka formowania kolonii), MIC (minimalne stężenia hamujące wzrost), itp.

Zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Research* 2003, **31**: 1805–1812. Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ , n oraz p dla wartości 10^{-3}, 10^{-6}, 10^{-9} oraz 10^{-12}. Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza np. 37°C.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób $^{14}CO_2$, ^3H_2O, $H_2{}^{35}SO_4$. Taki sam sposób zapisu stosuje się gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np. ^{32}S-ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np. ^{14}C aminokwasy, ^{3}H-liganty itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [^{14}C] mocznik, L-[*metylo*-^{14}C] metionina, [g-^{32}P] ATP.

4. Proces recenzowania

Prace przysyłane do Redakcji w celu ich opublikowania w *Postępach Mikrobiologii* podlegają podwójnej ocenie tj. ich wartości merytorycznej (Recenzje) oraz poprawności pod względem redakcyjnym (układ pracy, język, załączniki ilustrujące tekst, oświadczenia autorów).

- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez jednego ze stałych Recenzentów *P.M.* (lista Recenzentów, patrz Rada

Redakcyjna jest również publikowana w każdym zeszycie *P.M.* oraz na stronie internetowej http:www.pm.microbiology.pl). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej *P.M.* Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub jego braku z innych ważnych przyczyn, Redaktor naczelny powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej.

- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego przygotowanych arkuszach
- Recenzenci nie otrzymują zapłaty od PTM za wykonaną pracę.
- Nazwiska Recenzentów z poza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane w każdym 4-tym zeszycie *P.M.* odpowiedniego roku.
- W przypadku ujemnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przeredagowania, Autor *P.M.* ma prawo odwołania się od tej sugestii do Redaktora naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent z poza Rady Redakcyjnej *P.M.*

5. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi manuskrypt pracy w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w pracy na dole strony tytułowej. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Za prace opublikowane w *Postępach Mikrobiologii* nie przewiduje się honorariów autorskich. Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów pobierane są opłaty za prace przyjmowane do druku w naszym piśmie. Przesłanie podpisanego zobowiązania do zapłaty za artykuł zakwalifikowany do wydania jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.

Pracę należy przesyłać na adres poczty elektronicznej Sekretarza naukowego Redakcji:

Dr Radosław Stachowiak
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przeglądowe przygotowane zgodnie z ogólną instrukcją dla Autorów oraz zasadami wymienionymi w informacjach dotyczących prac kierowanych do działu „PMiS" należy przesłać w wersji elektronicznej na adres Redaktora Działu:

Prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba
e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl

Przed wysłaniem pracy do Redakcji prosimy o sprawdzenie kompletności wysyłanych plików przy pomocy poniższej listy:

1. Strona tytułowa (ze streszczeniem)
2. Manuskrypt (opcjonalnie)
3. Rysunki
4. Opis do rysunków
5. Tabele

Wymagane dokumenty:

1. Deklaracja oryginalności pracy.
2. Oświadczenie dotyczące praw autorskich.
3. Oświadczenie dotyczące konfliktu interesów.
4. Zobowiązanie do zapłaty w przypadku przyjęcia pracy do druku.

INFORMACJE DOTYCZĄCE PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

W dziale zatytułowanym **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY** publikowane są artykuły przeglądowe o charakterze metodycznym, reprezentujące dowolną dziedzinę mikrobiologii. Redakcja Postępów Mikrobiologii (PM), w porozumieniu z Zarządem Głównym PTM ustaliła, iż drukowanych będzie rocznie nie więcej niż cztery artykuły tej kategorii.

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo, tel. 605 031 324, fax: (91) 311 31 86, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl)**

Prace metodyczne przeznaczone do druku podlegają ocenie dokonywanej przez stałych Recenzentów lub Ekspertów powoływanych każdorazowo przez Redaktora działu.

Lista stałych Recenzentów, patrz Zalecenia dla Autorów, pkt. 5.

Strona tytułowa każdego artykułu zaopatrzona będzie w informacje, iż praca należy do **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW** oraz każdorazowo podana będzie data otrzymania od Autorów manuskryptu jak i data zaakceptowania godo druku.

Zalecenia dla Autorów:

1. **Przesyłanie publikacji:**
   - Manuskrypt (w dwu egzemplarzach w formie papierowej oraz jednym egzemplarzu na nośniku elektronicznym wraz z rysunkami, tabelami itp.) proszę przesyłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
   - Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Autora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ew. faxu należy obligatoryjnie podać adres e-mail Autora korespondencyjnego.

2. **Sposób przygotowania manuskryptu** – Pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w **INFORMACJI DLA AUTORÓW** aktualnie wydanego Tomu ***Postępów Mikrobiologii*** (Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:
   - Objętość pracy nie może przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 20 stron.
   - Ilość cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
   - W spisie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopismach naukowych, niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.

3. **Prawa autorskie** – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **Oświadczenie dotyczące praw autorskich.** Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *P.M.*

4. **Zalecenia i uwagi dodatkowe:**
   W celu uniknięcia kryptoreklamy, proszę o zwrócenie szczególnej uwagi na sposób przedstawienia czytelnikom produktów komercyjnych lub metod opracowanych przez producentów. Autorzy są również zobowiązani do ujawnienia (jeżeli takie istnieją) wszelkich powiązań (honoraria, granty, płatne ekspertyzy lub inne formy uzyskiwania korzyści osobistych) między Autorami a firmą, której produkt ma istotne znaczenie w nadesłanej pracy. W tym celu każdy z Autorów proszony jest o złożenie Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów". Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje. Wzór deklaracji można pobrać ze strony internetowej *M.*

   - Redakcja *PM* zastrzega sobie prawo ostatecznej decyzji o akceptacji pracy przeznaczonej do druku w dziale **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY.**
   - Wszelkie proponowane zmiany w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *P.M.*** zostaną przedstawione PT Czytelnikom *Postępów Mikrobiologii* przed ich wprowadzeniem.

5. **Stali recenzenci działu**
   PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY:

   Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)
   Waleria Hryniewicz (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)
   Józef Kur (Politechnika Gdańska)
   Anna Przondo-Mordarska (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

[Wzór]

Oświadczenie o oryginalności pracy

. . . .

Nazwisko i imię autora (korespondencyjnego)

. . . .

. . . .

Tytuł pracy

. . . .

Data złożenia pracy w Redakcji *Postępów Mikrobiologii*

Oświadczam, że złożona przeze mnie praca, zatytułowana jak wyżej, jest moim oryginalnym utworem i stanowi przedmiot prawa autorskiego w myśl Ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dn. 4 lutego 1994 r.

Oświadczam również, że praca ta ani w całości, ani we fragmentach nie została opublikowana wcześniej w żadnym innym czasopiśmie lub wydawnictwie naukowym. Dodatkowo stwierdzam, iż ww. pracy nie wysłano równolegle do opublikowania w innym czasopiśmie naukowym lub wydawnictwie.

Warszawa, dnia . . . .

. . . .

– podpis Autora korespondencyjnego –

– –

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1. . . . .

. . . .

(nazwisko/a i imię/ona autora/ów – proszę podkreślić autora korespondencyjnego)

Adres autorów: . . . .

. . . .

Tytuł pracy: . . . .

2. **Oświadczenie** (proszę wypełnić a lub b)

(a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania rysunki oraz tabele, są dziełem mojej/naszej oryginalnej twórczości (tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu), nie są obciążone jakimikolwiek prawami osób trzecich, ani nie naruszają jakichkolwiek przepisów prawa i interesów dóbr osób trzecich. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji/ ewentualnie w pracy zamieszono cytaty w ramach dozwolonego prawnie prawa cytatu, przy czym wszystkie zamieszczone cytaty zostały należycie oznaczone wraz z wymienieniem twórcy i źródła cytatu.

. . . .

(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

(b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję rysunków

nr: . . . . , zamieszczonych w: . . . .

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję tabel

nr: . . . . , zamieszczonych w: . . . .

(* podać bibliografie prac oryginalnych z których reprodukowane będą rysunki lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie: . . . .

rysunków: . . . . tabel: . . . . cytowanego tekstu: . . . .

. . . .

(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące „konfliktu interesów”[1]

1. Nazwisko i imię autora: .....

2. Tytuł pracy: .....

.....

.....

3. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b, niepotrzebne skreślić)

(a) Oświadczam, że „konflikt interesów” nie występuje

(b) Oświadczam, że występuje „konflikt interesów”, który polega na: .....

.....

....
(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

[1] Konflikt interesów występuje, kiedy autor lub zakład pracy autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje.

INFORMACJA DLA AUTORÓW
o opłatach za prace publikowane w Postępach Mikrobiologii

Uprzejmie informujemy PT Autorów PM, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku oraz z dnia 2 marca 2011 r. wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym piśmie. Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat w wysokości 250 PLN + VAT 23% – razem 307,50 PLN za każdy artykuł na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550

Opłatę można wnosić indywidualnie. W imieniu Autorów opłatę może wnosić sponsorująca instytucja, fundacja itp. W takim przypadku proszę przesłać do Zarządu Głównego PTM informacje potrzebne do wystawienia faktury na adres: kizmikrob@cm.umk.pl. Opłatę należy wnieść po uzyskaniu od Redakcji informacji, że praca została przyjęta do druku. Dodatkowo, Wydawca pobiera opłaty za wydruk kolorowych ilustracji w wysokości 300 PLN + VAT 23% (369 PLN) za stronę.

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. Do zobowiązania zapłaty należy dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko Autora korespondencyjnego.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25-ciu stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony tekstu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplemencie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przesyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology* (*Acta Microbiologica Polonica*) lub innego czsopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub Komitet Mikrobiologii PAN, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Zespół Redakcyjny *Postępów Mikrobiologii*.

Oferta Reklamy

Postępy Mikrobiologii udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowi instytutów badawczych, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:
1/2 strony 250,– zł
cała strona 500,– zł
Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji Postępów Mikrobiologii, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 628 08 22.

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń

SPIS TREŚCI

Doc. dr hab. Gustaw Kerszman 1932–2014 3
M. Wesserling – Regulacja bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych (R-M) typu II 5
A. Krzysztoszek, M. Wieczorek – Sukcesor wirusa polio – enterowirus 71 10
A. Dobosz – Różnorodność szlaków utleniania białek Dsb (disulfide bond) w świecie mikroorganizmów 21
J. Krzyczkowska, A. Urszula Fabiszewska – *Yarrowia lipolytica* – niekonwencjonalne drożdże w biotechnologii 33
M. Skóra, J. Bielecki, M. Bulanda, A.B. Macura, T. Jagielski – Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* – mało znane patogeny człowieka 44
J. Kutkowska, M. Michalska-Szymaszek, R. Matuszewska, E. Chmiel, T. Urbanik-Sypniewska – Antygeny powierzchniowe i czynniki wirulencji *Escherichia coli* O157 53
A. Wierzbicka-Woś, W. Deptuła – Bakteriofagi i drapieżniki bakterii jako czynniki limitujące liczbę bakterii w środowisku 65

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

S. Rynans, S.W. de Walthoffen, T. Dzieciątkowski, G. Młynarczyk – Zastosowanie techniki real-time PCR w wirusologii 75

INFORMACJA DLA AUTORÓW 83

CONTENTS

Doc. dr hab. Gustaw Kerszman 1932–2014 3
M. Wesserling – Regulation of bacterial type II restriction-modification (R-M) systems .. 5
A. Krzysztoszek, M. Wieczorek – Successor of polio virus – enterovirus 71 10
A. Dobosz – Diversity of the Dsb (disulfide bond) oxidative protein folding pathways in microbial world 21
J. Krzyczkowska, A. Urszula Fabiszewska – *Yarrowia lipolytica* – non-conventional yeast in biotechnology 33
M. Skóra, J. Bielecki, M. Bulanda, A.B. Macura, T. Jagielski – Fungi of the genus *Scopulariopsis* – ill-defined human pathogens 44
J. Kutkowska, M. Michalska-Szymaszek, R. Matuszewska, E. Chmiel, T. Urbanik-Sypniewska – Cell-surface antigens and virulence factors of *Escherichia coli* O157 53
A. Wierzbicka-Woś, W. Deptuła – Bacteriophages and bacterial predators as agents limiting the amount of bacteria in the environment 65

METHODS AND STANDARDS

S. Rynans, S.W. de Walthoffen, T. Dzieciątkowski, G. Młynarczyk – Application of real-time PCR in virology 75

INFORMATION FOR AUTHORS 83