

Urszula Błaszczuk^{1*}, Jagoda Moczarny¹

¹ Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w lipcu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Klasyfikacja bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych. 3. Produkcja kolicyn przez bakterie kolicynogenne. 3.1. Synteza kolicyn. 3.2. Eksport kolicyn z komórek producenta. 4. Mechanizmy działania kolicyn. 4.1. Translokacja. 4.2. Efekt letalny kolicyn. 5. Charakterystyka i podział mikrocytn. 5.1. Struktura i genetyka wybranych mikrocytn. 5.1.1. MccE492. 5.1.2. MccJ25. 5.1.3. MccC7-C51. 5.2. Mechanizmy działania mikrocytn. 5.2.1. MccE492. 5.2.2. MccJ25. 5.2.3. MccC7-C51. 6. Potencjalne zastosowanie kolicyn i mikrocytn. 7. Podsumowanie

Bacteriocins of Gram-negative bacteria – structure, mode of action and potential applications

Abstract: Bacteriocins are a diverse group of ribosomally synthesized peptides or proteins secreted by bacteria, which help them to compete in their local environments for the limited nutritional resources. Bacteriocins kill or inhibit the growth of other bacteria. Generally, these molecules have a narrow spectrum of antibacterial activity, but some of them demonstrate a broad spectrum of action. Bacteriocins from Gram-negative bacteria are divided into two main groups: high molecular mass proteins (30–80 kDa) known as colicins, and low molecular mass peptides (between 1–10 kDa) termed microcins. Colicins are produced by *Escherichia coli* strains harbouring a colicinogenic plasmid. Such colicinogenic strains are widespread in nature and are especially abundant in the gut of animals. The biosynthesis of colicins is mediated by the SOS regulon, which becomes activated in the response to DNA damage. The colicin synthesis is lethal for the producing cells as a consequence of the concomitant biosynthesis of the colicin lysis protein. Microcins are usually highly stable molecules, which are resistant to proteases, extreme pH values and temperatures. They are produced by enteric bacteria under stress conditions, particularly nutrient depletion. Microcins are encoded by gene clusters carried by plasmids or in certain cases by the chromosome. In this review, we have summarized the most important information about structure and properties of bacteriocins from Gram-negative bacteria, their diverse mechanisms of action and potential application as food preservatives and in livestock industry.

1. Introduction. 2. Classification of bacteriocins from Gram-negative bacteria. 3. Production of colicins by colicinogenic bacteria. 3.1. Colicin synthesis. 3.2. Export of colicins from bacteriocin-producing cells. 4. Modes of colicin action. 4.1. Translocation. 4.2. Lethal effect of colicins. 5. Characteristics and classification of microcins. 5.1. Structure and genetics of selected microcins. 5.1.1. MccE492. 5.1.2. MccJ25. 5.1.3. MccC7-C51. 5.2. Mechanisms of action of microcins. 5.2.1. MccE492. 5.2.2. MccJ25. 5.2.3. MccC7-C51. 6. Potential applications of colicins and microcins. 7. Summary

Słowa kluczowe: aktywność antymikrobiologiczna, bakterie Gram-ujemne, kolicyny, mikrocytn

Key words: antimicrobial activity, Gram-negative bacteria, colicins, microcins

1. Wprowadzenie

Allelopatia to szeroko rozpowszechnione w naturze zjawisko, wprowadzone do literatury naukowej już w 1937 roku przez austriackiego badacza Hansa Molischa [66]. W świecie bakterii pojęcie to często odnośzone jest do antagonistycznego oddziaływania pomiędzy populacjami poprzez produkcję substancji szkodliwych dla populacji konkurencyjnej [40]. Do takich allelopatycznych związków wytwarzanych przez mikroorganizmy zaliczane są m.in.: metabolity wtórne – amoniak lub nadtlenuk wodoru, klasyczne antybiotyki o szerokim spektrum działania (bacytracyna, polimiksyna B), enzymy bakteriolityczne i, co stanowi temat niniejszego artykułu – bakteriocyny, zwykle definiowane jako biologicznie aktywne peptydy lub białka działające bakterioobójczo [40, 79].

W 1925 roku udokumentowano pierwsze odkrycie wskazujące na to, że bakterie są producentami cząsteczek antydeobnoustrojowych [42]. Wtedy to belgijski mikrobiolog André Gratia opisał obecność wrażliwych na podwyższoną temperaturę substancji o znacznej specyficzności antymikrobiologicznej, wytwarzanych przez *Escherichia coli* V, której aktywność skierowana była przeciwko innym szczepom tego samego gatunku, tj. *E. coli* φ [42]. Substancje te zostały nazwane kolicynami, by wskazać organizm, który je wyprodukował. W 1946 roku Gratia i Fredericq dowiedli, że kolicyny są białkami [41], a ich spektrum działania jest ograniczone w zależności od obecności bądź braku specyficznych receptorów na powierzchni komórek wrażliwych [32].

Bakteriocyny tworzą dużą i niezwykle zróżnicowaną funkcjonalnie rodzinę toksyn. Specyficzną cechą, która je łączy to fakt, że są peptydami lub białkami

* Autor korespondencyjny: Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; tel. 12 6624790; e-mail: ublaszczuk@ar.krakow.pl

syntetyzowanymi rybosomalnie [18]. Dodatkowo wykazują aktywność antimikrobiologiczną przeciwko szczerpom przeważnie blisko spokrewnionym, posiadając jednocześnie specyficzny sprzężony mechanizm immunologiczny, który chroni je przed działaniem własnej toksyny. Warto wspomnieć o badaniach, które wskazują, że bakteriocyny przyczyniają się do wzrostu dynamiki konkurencji pomiędzy różnymi szczepami bakterii, przez co w dużej mierze wpływają na utrzymanie różnorodności mikrobiologicznej [79, 80]. Prawdopodobnie 99% bakterii wytwarza co najmniej jedną bakteriocynę, jednak większość nie została jeszcze zidentyfikowana [53, 82]. Niektóre szczepy syntetyzują dwie lub więcej bakteriocyn [77].

Ze względu na rosnącą oporność bakterii na wiele klasycznych antybiotyków zapoczątkowano szereg badań mających na celu poznanie potencjalnej roli naturalnie produkowanych oraz modyfikowanych bakteriocyn, jako odpowiedników tradycyjnie stosowanych antybiotyków [19, 38]. Bakteriocyny można odróżnić od klasycznych antybiotyków ze względu na następujące cechy:

- bakteriocyny są peptydami lub białkami, których synteza odbywa się rybosomalnie, a antybiotyki to wtórne metabolity niektórych mikroorganizmów, nie tylko bakterii,
- bakteriocyny przeważnie mają wąskie spektrum działania, podczas gdy większość antybiotyków wykazuje szeroki zakres aktywności,
- w odróżnieniu od antybiotyków, do interakcji z komórką wrażliwą bakteriocyny wymagają niekiedy cząsteczki dokującej, która jest niezbędna do bezpośredniego kontaktu z błoną komórki docelowej,
- mechanizm działania bakteriocyn najczęściej polega na formowaniu porów w błonie komórkowej, ale niektóre bakteriocyny mogą również oddziaływać antagonistycznie wobec wrażliwych mikroorganizmów m.in. poprzez niespecyficzną degradację DNA, specyficzną hydrolizę RNA, hamowanie syntezy peptydoglikanu będącego składnikiem ściany komórkowej bakterii; antybiotyki blokują syntezę ściany komórkowej, upośledzają funkcje błony komórkowej lub działają wewnątrzkomórkowo (m.in. zaburzają replikację DNA, syntezę RNA i bakteryjnych białek),
- stwierdzono toksyczność i występowanie skutków ubocznych w przypadku stosowania antybiotyków, w odróżnieniu od nietoksycznych bakteriocyn, które naturalnie występują w niektórych produktach spożywczych i od dawna nieświadomie były spożywane przez ludzi, ponadto są wrażliwe na proteazy i podlegają rozkładowi w przewodzie pokarmowym,
- antybiotyki stosowane są w celach klinicznych, a bakteriocyny w przemyśle spożywczym [9, 17, 43].

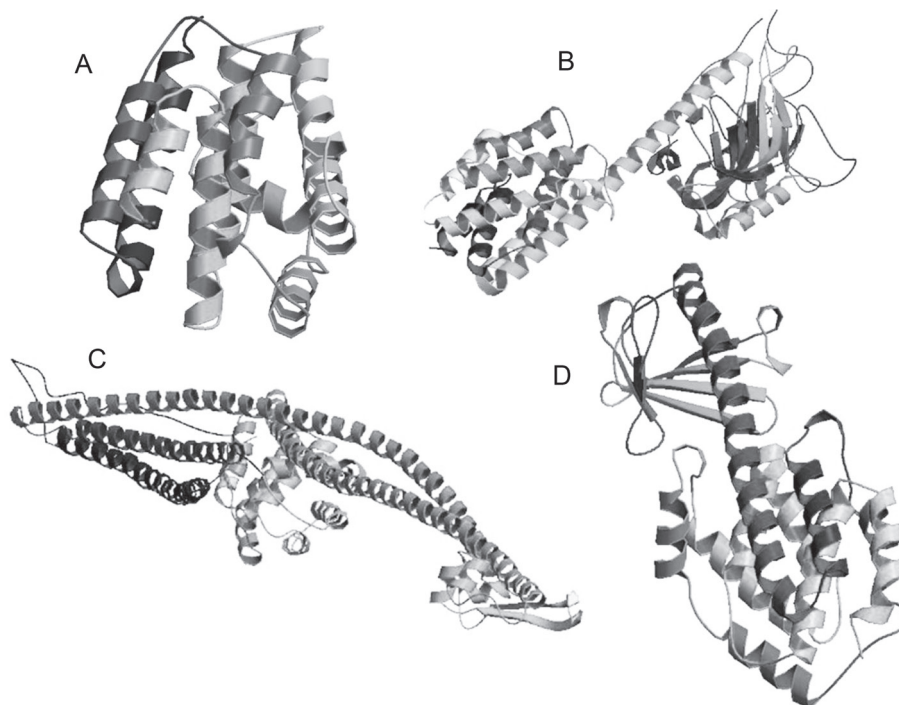
W przeciwieństwie do bakteriocyn, szerokie spektrum działania antybiotyków wiąże się z efektem letalnym nie tylko w stosunku do bakterii chorobotwórczych, ale także przyczynia się do likwidacji korzystnej dla organizmu człowieka flory bakteryjnej, która według niektórych badań może w późniejszym czasie nie wrócić już do swojego pierwotnego składu, a niektóre grupy bakterii mogą zostać zastąpione przez mikroorganizmy odporne na antybiotyki. Długotrwała ekspozycja pożytecznej flory bakteryjnej na antybiotyki może odpowiadać za zwiększoną podatność organizmu na infekcje i choroby takie jak: otyłość, cukrzyca typu 1, nieswoiste zapalenie jelit, alergię, astmę [8].

Rodzina bakteriocyn stanowi grupę związków organicznych, które różnią się między sobą m.in. masą cząsteczkową, właściwościami biochemicznymi, mechanizmem działania, spektrum aktywności lub rodzajem komórek wrażliwych, na którą działają [15, 44].

2. Klasyfikacja bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych

Wiele uwagi poświęca się bakteriocynom wytwarzanym przez bakterie Gram-dodatnie. Poznawane są coraz to nowe cząsteczki należące do tej niezwykle licznej i zróżnicowanej grupy związków antydrobnoustrojowych [36, 37, 46, 56, 57, 59, 60, 62, 65, 70, 105, 109]. Bakteriocyny produkowane przez bakterie Gram-dodatnie różnią się od tych wytwarzanych przez bakterie Gram-ujemne w dwóch zasadniczych kwestiach. Po pierwsze, uwalnianie bakteriocyny do środowiska zewnętrznego w przypadku bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich niekoniecznie musi się wiązać się z lizą komórki, która ją wyprodukowała jak ma to miejsce w przypadku bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych, zaliczanych do rodziny kolicyn. Ta znacząca różnica powstała w związku z mechanizmem transportu umożliwiającym wydzielenie bakteriocyny. Zwykle biosynteza bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich podlega samoregulacji dzięki specyficznym wyspecjalizowanym mechanizmom transportu ułatwiającym wydzielanie, jednak niektóre wykorzystują *sec*-zależne drogi eksportu. Po drugie, bakterie Gram-dodatnie wykształciły bakteriocyno-specyficzną regulację, natomiast w przypadku większości bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych synteza jest regulowana w oparciu o system SOS [79].

Bakterie Gram-ujemne, podobnie jak Gram-dodatnie, produkują szereg bakteriocyn, a ich nazwa pochodzi od rodzaju bakterii, który je wytwarza (np. klebicyna – *Klebsiella pneumoniae*) lub od gatunku (np. kolicyna – *E. coli*, pestycyna – *Yersinia pestis*, marcescyna – *Serratia marcescens*) [15]. Charakterystyczne dla bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych jest to, że zarówno producent, jak również szczepy wrażliwe należą do tego samego rodzaju i w większości tego



Rys. 1. Struktury wybranych kolicyn

A. Kolicyna A (PDB: 1COL). B. Kolicyna B (PDB: 1RH1). C. Kolicyna Ia (PDB: 1CII). D. Kolicyna N (PDB: 1A87).

PDB ID: 1COL

Parker M.W., Postma J.P., Pattus F., Tucker A.D., Tsernoglou, D.: Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **224**, 639–657 (1992)

PDB ID: 1RH1

Hilsenbeck J.L., Park H., Chen, G., Youn B., Postle K., Kang C.: Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol. Microbiol.* **51**, 711–720 (2004)

PDB ID: 1CII

Wiener M., Freymann D., Ghosh P., Stroud R.M.: Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, **385**, 461–464 (1997)

PDB ID: 1A87

Vetter I.R., Parker M.W., Tucker A.D., Lakey J.H., Pattus F., Tsernoglou D.: Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure*, **6**, 863–874 (1998)

samego gatunku [95]. Klasyfikuje się je zasadniczo jako kolicyny i mikrocyyny.

Kolicyny to białka o masie cząsteczkowej 25–80 kDa produkowane przez i aktywne przeciwko *E. coli* i innym członkom rodziny *Enterobacteriaceae* [81]. Kolicyna V jest pierwszą, odkrytą prawie 100 lat temu bakteriocyną [42], do dzisiaj opisano ponad 30 różnych cząsteczek zaliczanych do rodziny kolicyn [77]. Schematyczne struktury wybranych kolicyn zostały przedstawiona na Rysunku 1.

Z historycznego punktu widzenia, jak i możliwości ich potencjalnego zastosowania, kolicyny, obok bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej, należą do najintensywniej badanych bakteriocyn. W przeciwieństwie do bakteriocyn produkowanych przez bakterie Gram-dodatnie, których biosynteza podlega samoregulacji, jeśli chodzi o mechanizmy transportu odpowiedzialne za ich wydzielanie, kolicyny funkcjonują w oparciu o system SOS. W warunkach stresowych, takich jak: redukcja składników pokarmowych lub promieniowanie UV, dochodzi do indukcji części bakterii z populacji *E. coli* zdolnych do wydzielania bakteriocyny. Indukcja ta skutkuje śmiercią komórek produkujących kolicyny (jednocześnie z koli-

cyną syntetyzowane jest białko lityczne), co w rezultacie prowadzi do uwolnienia z komórek producenta cząsteczek kolicyny, a przez to również śmierci znajdujących się w pobliżu komórek wrażliwych. Wydzielone białka wiążą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek docelowych i przemieszczają się do ich wnętrza z pomocą białek transportowych.

Pomimo różnic w mechanizmach działania, większość kolicyn wykazuje podobną organizację strukturalną z trzema funkcjonalnymi domenami: regionem N-terminalnym (ok. 25% białka) odpowiedzialnym za przemieszczenie się do komórki docelowej, regionem centralnym (ok. 50% całego białka) zaangażowanym w wiązanie kolicyny ze specyficznymi receptorami w błonie zewnętrznej oraz regionem C-terminalnym odpowiadającym za aktywność antybakteryjną [79]. Domena receptorowa wiąże kolicynę z receptorem na powierzchni błony zewnętrznej komórki wrażliwej, po czym białko to jest translokowane w głąb błony bądź cytoplazmy komórki docelowej. W transporcie do komórki biorą udział dwie grupy białek – system Ton oraz system Tol. Oporność na antybakteryjne działanie kolicyn może wytworzyć się w wyniku zmian strukturalnych w obrębie receptorów błonowych, dzięki

którym kolicyny wnikają do wnętrza komórki, bądź modyfikacji w mechanizmie wchłaniania [10, 82]. Duże podobieństwo strukturalne do kolicyn wykazują pirocyny, bakteriocyny produkowane przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [48].

Mikrocyny to znacznie mniejsze od kolicyn niskocząsteczkowe peptydy (< 10 kDa), syntetyzowane przez bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Działają antagonistycznie w stosunku do szczepów blisko spokrewnionych. Z wyjątkiem *K. pneumoniae*, wszystkie znane szczepy wytwarzające mikrocyny należą do gatunku *E. coli* [23, 44]. W przeciwieństwie do kolicyn, synteza mikrocyn nie podlega regulacji przez system SOS i nie jest śmiertelna dla szczepu, który produkuje mikrocynę [44, 72]. Klaster mikrocynowy jest bardziej zróżnicowany od kolicynowego i zawiera w sobie geny odpowiedzialne za biosyntezę mikrocyn (w niektórych przypadkach geny kodujące białko prekursorowe i enzymy modyfikacji posttranslacyjnej) oraz te decydujące o ich sekrecji i odporności [4].

Co ciekawe, mikrocyną okazała się być również pierwsza opisana bakteriocyna – kolicyna V (ColV) [77]. W ostatnich latach liczba zidentyfikowanych mikrocyn powiększyła się z dziewięciu do czternastu i, w przeciwieństwie do kolicyn, siedem z nich udało się wyizolować oraz opisać na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym. Są to mikrocyny B17, C51, E492, J25, L, M oraz V (wcześniej zanana jako ColV) [28].

3. Produkcja kolicyn przez bakterie kolicynogenne

3.1. Synteza kolicyn

Synteza kolicyn jest kodowana przez plazmidy Col, różniące się między sobą wielkością (np.: plazmid pColE1 – 6,6 kbp, a pColH aż 94 kbp) [95]. Odróżnia je również zdolność do powielania, liczba kopii przypadających na komórkę oraz zdolność do transferu przez koniugację [74].

Plazmidy Col, oprócz kolicyn, kodują dodatkowo jeden, bądź częściej, dwa dodatkowe typy białek: białko odpornościowe i białko lityczne [74]. Przykład stanowi operon kolicyny E1, który zawiera trzy geny. Geny *cea*, *imm* oraz *kil* odpowiadają w kolejności za strukturę bakteriocyny, białka odpornościowego oraz litycznego. Rolą białka immunologicznego jest specyficzna ochrona komórki kolicynogennej (wiąże i inaktywuje toksyczną proteinę) przed jej własną kolicyną, jak również przed innymi kolicynami tego samego typu, które pochodzą ze środowiska. Białko lityczne jest natomiast małą lipoproteiną, odpowiedzialną za łatwiejsze uwolnienie zsyntetyzowanej kolicyny z komórki producenta. Podczas gdy gen *imm* występuje we wszystkich plazmidach Col, gen *kil* obecny jest jedynie w grupie plazmidów małych – Ia i Ib [95].

Usytuowanie genów w plazmidach Col zależy od antagonistycznego mechanizmu działania kolicyn oraz od wzajemnej interakcji pomiędzy kolicyną, a jej białkiem odpornościowym. W przypadku kolicyn, które działają na błonę plazmatyczną, gen *imm* jest transkrybowany kolejno w kierunku przeciwnym do genu decydującego o strukturze kolicyny, jak i genu *kil*. Dla kolicyn posiadających aktywność nukleazy, gen *imm* stanowi część jednostki transkrypcyjnej i zorientowany jest w tym samym kierunku co dwa pozostałe geny, a dodatkowo intensywność jego transkrypcji jest proporcjonalna do transkrypcji genów *cea* i *kil*. Nawet w przypadku komórek, w których operon kolicynowy jest wyłączony, synteza białka odpornościowego jest kontynuowana. Kontrolowana jest przez niezależny promotor, który umożliwia komórce przeżycie na podłożu, w którym kolicyny produkowane są w sposób spontaniczny przez pewną część komórek.

Proces syntezy kolicyn determinowany jest przez kilka czynników. Podstawową regulację, powszechną wśród prawie wszystkich kolicyn, zapewnia system SOS, który bierze udział w kontrolowaniu ekspresji genów oraz naprawianiu uszkodzonego DNA. W normalnych warunkach produkcja kolicyn jest wyłączona u większości komórek w populacji. Ma ona miejsce tylko u małej części populacji, jako skutek losowej samorzutnej aktywacji systemu SOS [44]. Synteza kolicyn w kulturze producenta wzrasta ponad tysiąc razy dzięki indukcji po fazie lag. W przypadku niektórych kolicyn istnieją również bardziej łagodne mechanizmy regulacji uczestniczące w kształtowaniu tego procesu [95]. Kolejno, synteza kolicyn może być regulowana poprzez nieswoistą represję kataboliczną. Niskie stężenie glukozy w podłożu komórek kolicynogennych powoduje, że wzrasta synteza cAMP, który wiążąc się z odpowiednim białkiem receptorowym tworzy kompleks stymulujący ekspresję genu strukturalnego kolicyny [85]. Produkcja kolicyny E1 jest również stymulowana przez brak tlenu. W warunkach beztlenowych, transkrypcja genu kolicyny jest aktywowana przez białko regulatorowe FNR. Warunki anaerobiozy dodatkowo znacznie skracają fazę lag, przez co synteza kolicyny wzrasta 45-krotnie w porównaniu z warunkami tlenowymi. Białko FNR jest syntetyzowane stale, ale aktywne jest tylko w warunkach beztlenowych. Związanie aktywnej formy białka FNR blisko promotora inicjuje transkrypcję genu kolicyny [29].

3.2. Eksport kolicyn z komórek producenta

Żadna z kolicyn nie jest transportowana specyficznie z komórki producenta. Nie wykryto również w obrębie ich struktury N-końcowej sekwencji sygnałowej [10, 50]. Kolicyny są uwalniane z komórki razem

z innymi proteinami. Ten proces jest wspomagany przez tzw. białko lityczne, które powoduje również lizę błony komórkowej, ściany komórkowej i błony zewnętrznej, w wyniku czego dochodzi do śmierci komórki bakteryjnej [14]. Ekspresja genu *kil* kodującego białko lityczne regulowana jest przez promotor, który jest wspólny z genem strukturalnym białka kolicynowego. W związku z tym do ekspresji genu *kil* dochodzi wtedy, gdy synteza kolicyny w komórce zostanie zaindukowana. Niezwykle stabilna sekwencja sygnałowa białka litycznego nie jest degradowana przez co wpływa na efektywny eksport kolicyny z komórki producenta [95].

4. Oddziaływanie kolicyn na komórki bakteryjne

Hamujący efekt kolicyn na komórki bakteryjne ograniczony jest do wrażliwych szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae*. Efekt inhibicji zależny jest od rodzaju interakcji pomiędzy kolicyną, a komórką bakteryjną, przy czym wymagana jest obecność specyficznego receptora kolicynowego w błonie zewnętrznej oraz funkcjonalnego mechanizmu translokacji pomiędzy błoną zewnętrzną i plazmatyczną bakterii. Oddziaływanie kolicyn na komórki wrażliwe sprowadza się do trzech etapów:

- związanie się do zewnętrznej błony bakteryjnej z udziałem specyficznego receptora,
- translokacja przez błonę zewnętrzną, ścianę i błonę komórkową,
- efekt letalny.

To trzostopniowe działanie odzwierciedla organizacja cząsteczki kolicynowej, która składa się z trzech domen: receptorowej, translokacyjnej i letalnej [13]. Każda z domen funkcjonalnych w cząsteczce kolicyny jest właściwie niezależna, w związku z czym, dzięki wzajemnej kombinacji fragmentów genów poszczególnych domen, możliwe jest stworzenie nowych typów kolicyn, jak również hybryd kolicyn z innymi bakteriocynami.

Stopień wrażliwości szczepu na kolicynę jest funkcją średniej liczby receptorów przypadających na komórkę. Stąd, wrażliwość na kolicyny ma charakter ilościowy.

Można wyróżnić trzy typy niewrażliwości na kolicyny:

- Oporność z powodu braku funkcjonalnego receptora kolicynowego. Stwierdzono doświadczalnie, że kultura wzrastająca na płytce z agarem w obecności kolicyny bez występujących widocznych czynników ograniczających jest uważana za oporną.
- Tolerancja z powodu zaburzonego systemu translokacji. „Tolerancyjna” komórka, w przeciwieństwie do komórki „opornej” wyposażona jest w całkowicie funkcjonalny receptor. Jednakże, wiąże ona zwykle mniejszą liczbę cząsteczek kolicyny niż komórka wrażliwa.

- Odporność. Komórka posiada funkcjonalny receptor kolicynowy, jak również sprawny mechanizm translokacji, jednakże wzmocnienie efektu letalnego jest utrudnione przez wzajemne oddziaływanie kolicyny z proteiną odpornościową, która syntetyzowana jest przez komórkę razem z kolicyną [49]. W związku z tym, odporność jest równoważna z niewrażliwością komórki producenta [95].

4.1. Translokacja kolicyn

Kolicyny wiążą się ze specyficznymi receptorami znajdującymi się na zewnętrznej błonie, skąd zostają przemieszczone do wnętrza komórki bakteryjnej. Translokacja przebiega dzięki systemom Ton oraz Tol. Grupa kolicyn A wykorzystuje system Tol i potrzebuje poryn, tj.: OmpF oraz białek TolA, TolB, TolQ i TolR, podczas gdy kolicyny grupy B wykorzystują system Ton razem ze specyficznymi receptorami oraz białkami TonB, ExbB oraz ExbD [50]. TonB i ExbD, jak również TolA i TolR to białka zakotwiczone dzięki swoim N-końcom w błonie plazmatycznej. TolQ i ExbB to integralne białka błonowe, natomiast białko TolB, które nie posiada swojego odpowiednika w systemie Ton, jest zlokalizowane głównie w peryplazmie. Białko TolA jest analogiczne do białka TonB, natomiast nie mogą się zastępować. TolQ funkcjonalnie może pełnić rolę odpowiednika ExbB, podobnie jak TolR z ExbD [95].

Kompleks Tol jest niezbędny dla integralności osłony bakteryjnej. Skutkiem mutacji genu *tol* jest tzw. tolerancyjny fenotyp – obniżona wrażliwość na kolicyny, zwiększona przepuszczalność zewnętrznej błony komórkowej dla barwników, zwiększona wrażliwość na detergenty itd.

Liczba receptorów błonowych przypadająca na jedną komórkę bakteryjną waha się od 10^2 (BtuB) do 10^5 (OmpF) kopii. Jednakże import kolicyn nie jest ograniczony liczbą cząsteczek receptorowych na powierzchni błony, a raczej liczbą receptorów związanych z kompleksami translokacyjnymi – system Tol występuje w liczbie 400–1000 kopii na komórkę [27]. Wynika z tego, że pomimo znacznej liczby cząsteczek kolicynowych, które przyłączają się do specyficznych receptorów na powierzchni błony zewnętrznej, nie wszystkie zostaną translokowane do wnętrza. Niektóre receptory współdziałają alternatywnie z obydwoma systemami translokacji. W takich przypadkach transport „naturalnych” substratów odbywa się tylko przez system Ton, podczas gdy kolicyny wykorzystują obydwa systemy do ich translokacji [95].

Po translokacji cząsteczki kolicyny dochodzi do rearanżacji jej struktury trzeciorzędowej. Kolicyna A przekształca swoją strukturę podczas translokacji, a jej denaturacja zmniejsza czas, który jest potrzebny do wywołania efektu letalnego [6].

4.2. Efekt letalny kolicyn

Badania dotyczące oddziaływania kolicyn na wrażliwe komórki bakteryjne dowodzą, że już pojedyncza, bądź kilka cząsteczek kolicynowych wystarcza do wywołania efektu letalnego wrażliwej bakterii. Efekt bakteriobójczy kolicyny poprzedzony jest działaniem bakteriostatycznym [91], a czas trwania fazy bakteriostatycznej jest odwrotną funkcją mnogości kolicyn. Każda komórka, która zwiąże kolicynę chwilowo przeżywa, jednak traci zdolność do podziału.

Wysoce skuteczna aktywność antymikrobiologiczna kolicyn jest częściowo ograniczona ze względu na to, że nie wszystkie cząsteczki kolicyn połączone z receptorem mogą związać się z kompleksem translokacyjnym, a dodatkowo wystawione są na działanie proteinaz na powierzchni komórek bakteryjnych. Kolicyny obydwu grup A i B utrzymują kontakt z receptorem podczas tworzenia kanałów w błonie plazmatycznej. W związku z tym, można wykluczyć ich hamujący efekt dzięki trypsynie, która degradowuje części cząsteczek znajdujących się na powierzchni komórki.

Kolicyny eliminują wrażliwe bakterie na różne sposoby. Najczęstszym z nich jest formowanie kanałów jonowych w błonie plazmatycznej, co prowadzi do depolaryzacji błony. Inny sposób wiąże się z aktywnością nukleazową kolicyn, natomiast najrzadziej dochodzi do zahamowania syntezy peptydoglikanu [95].

5. Charakterystyka i podział mikrocyń

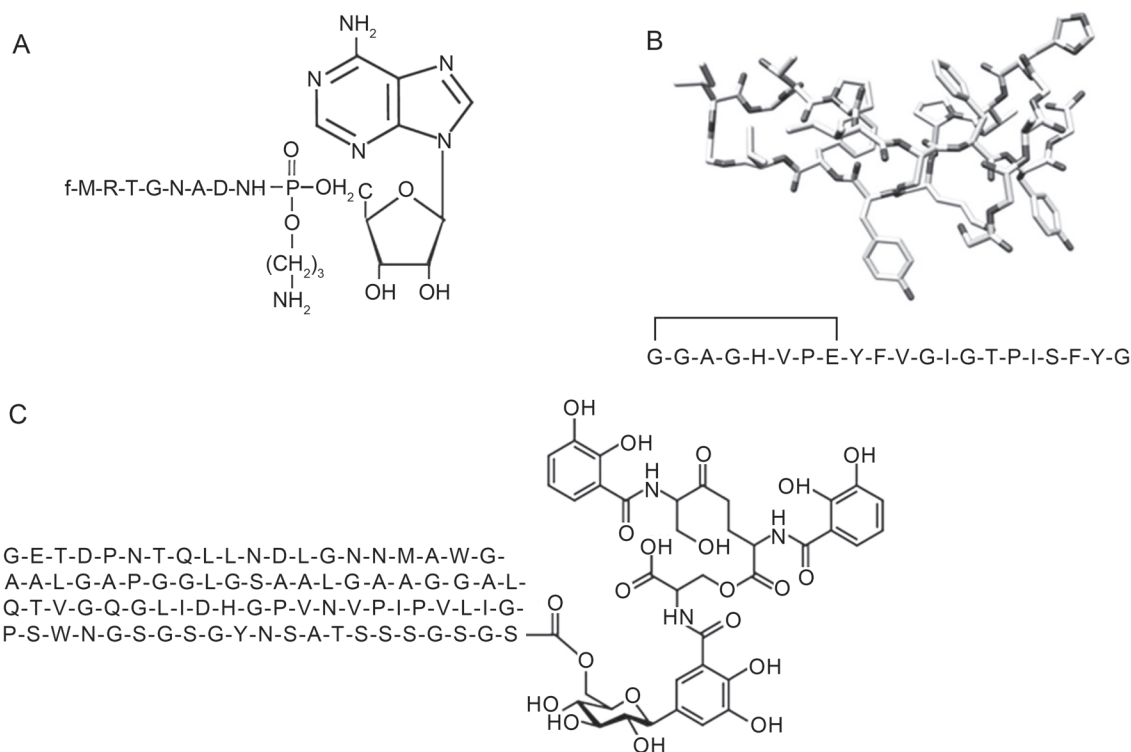
Termin „mikrocyny” wprowadzono z uwagi na to, żeby odróżnić klasę antybakteryjnych peptydów, o masie molekularnej poniżej 10 kDa, od większych od nich kolicyn [74]. Mikrocyń wykazują odporność na wysoką temperaturę, krańcowe pH i proteazy. Produkowane pod wpływem stresu (np. niedobór składników odżywczych), wykazują silną aktywność antybakteryjną w stosunku do szczepów blisko spokrewnionych włączając rodzaje: *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* oraz *Shigella*, przy minimalnym stężeniu hamującym (MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*) w skali nanomolarnej.

Podobnie do bakteriocyn produkowanych przez bakterie Gram-dodatnie, mikrocyń wydzielane są zwykle jako syntetyzowane rybosomalnie prekursorzy. Są kodowane przez geny znajdujące się w plazmidach albo, w niektórych przypadkach, w chromosomach. Operony, które zawierają geny kodujące prekursorzy mikrocyń, kodują również czynniki odpowiedzialne za odporność na mikrocyń, białka sekrecyjne oraz enzymy modyfikacyjne, co wpływa na ogromną różnorodność mikrocyń, zarówno pod względem ich struktury, jak i mechanizmów działania [28].

Mikrocyny dzieli się na dwie klasy w zależności od ich masy cząsteczkowej, obecności bądź też braku mostków disiarczkowych oraz ze względu na modyfikacje posttranslacyjne. **Klasa I** mikrocyń (B17, C7-C51, J25) to kodowane w plazmidach peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa, które podlegają modyfikacjom posttranslacyjnym i działają na cele zlokalizowane wewnątrzkomórkowo [34, 72]. Hamują funkcje życiowe tych szczepów bakteryjnych, które wykazują podobną morfologię i fizjologię. Do **klasy II** należą peptydy o wyższej masie molekularnej w zakresie 5–10 kDa, wykazujące aktywność antybakteryjną głównie poprzez oddziaływanie na błony komórkowe. Wśród mikrocyń zaliczanych do klasy II wyróżnia się dwie podklasy. **Klasa IIa** obejmuje trzy kodowane plazmidowo peptydy, które nie ulegają modyfikacjom posttranslacyjnym, a w swej budowie prawdopodobnie posiadają mostki dwusiarczkowe (mikrocyny L, V oraz 24). Natomiast kodowane w chromosomach liniowe mikrocyń E492, M i H47, które mogą ulegać lub nie C-końcowym modyfikacjom zaliczane są do **klasy IIb**. Są to tzw. mikrocyń sideroforowe. Wysoce konserwatywna C-końcowa sekwencja 10 aminokwasów jest ich znakiem rozpoznawczym [100].

Pomimo wysokiej heterogeniczności mikrocyń pod względem budowy strukturalnej, organizacja ich klastru genowego jest konserwatywna i składa się z przynajmniej czterech zespolonych genów, zgrupowanych w jednym lub kilku operonach. Mowa tu o genach strukturalnych kodujących prekursorzy mikrocyńowy, sąsiadujących z nimi genach odpowiadających za odporność szczepu wytwarzającego daną mikrocyń na jej działanie antymikrobiologiczne i genach kodujących właściwy system eksportu mikrocyń, który umożliwia jej prawidłową sekrecję. Dodatkowo występują geny kodujące enzymy niezbędne do prawidłowego przebiegu modyfikacji posttranslacyjnych [28]. Niektóre prekursorzy mikrocyń ulegają modyfikacjom posttranslacyjnym w trakcie procesu dojrzewania do mikrocyń aktywnej. Modyfikacje, którym ulegają mikrocyń aktywne mogą przebiegać drogami rybosomalną i nierybosomalną. Dojrzałe mikrocyń są wówczas eksportowane przy użyciu systemu transportującego ABC (*ATP-Binding Cassette Transporter*) [78].

Warto zwrócić uwagę na trzy wybrane mikrocyń: E492, J25 i C7-C51 (Rys. 2) oraz strategię wykorzystywane przez enterobakterie, które dzięki tym białkom wykazują aktywność antymikrobiologiczną w obecności bakterii. Wspomniane mikrocyń oddziałują na inne komórki przy użyciu strategii tzw. konia trojańskiego (*Trojan Horse*). Mikrocyńa może naśladować potrzebny komórce składnik odżywczy, np. kompleks siderofor-żelazo, co umożliwia jej translokację do peryplazmy dzięki wcześniejszemu rozpoznaniu mikrocyńa przez specyficzne receptory w zewnętrznej błonie komórko-



Rys. 2. Struktury wybranych mikrocyń

A. Mikrocyń C7-C51 – peptyd z modyfikowanym AMP. B. Mikrocyń J25 – peptyd w kształcie laso; struktura trójwymiarowa (górna, PDB: 1Q71) i pierwszorzędowa (dolna), kłama oznacza pierścieni laktamowy utworzony pomiędzy grupą α-aminową Gly¹ a grupą γ-karboksylową Glu⁸. C. Mikrocyń E492 – peptyd sideroforowy.

PDB ID: 1Q71

Rosengren K.J., Clark R.J., Daly N.L., Goransson U., Jones A., Craik D.J.: Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12464–12474 (2003)

wej atakowanej bakterii. Może być również wydzielana w formie nieaktywnej molekuly, by po wnikięciu do wrażliwej bakterii i związaniu się z wewnętrzną błoną stać się cząsteczką toksyczną [78].

5.1. Struktura i genetyka wybranych mikrocyń

5.1.1. MccE492

Najlepiej scharakteryzowaną mikrocyń należąca do klasy IIB jest mikrocyń E492 (w skrócie Mcc492), która produkowana jest przez szczep *K. pneumoniae* RYC492 [23]. Późniejsze klonowanie 13 kbp fragmentu DNA w *E. coli* [106] pozwoliło na oczyszczenie i określenie struktury wyżej wymienionej mikrocyń. Dzieśięć genów uporządkowanych w pięć jednostek transkrypcyjnych jest niezbędnych do biosyntezy MccE492 [54]. Gen *mceA* koduje 99-aminokwasowy prekursor MccE492, a *mceB* białko odpornościowe (chroniące producenta przed działaniem własnej bakteriocyny). Inne geny zaangażowane są w modyfikacje posttranslacyjne. Są to *mceC*, *mceD* i *mceI*, kodujące odpowiednio peptydy homologiczne do glikozylotransferazy, esterazy i acylotransferazy [68, 101], jak również gen *mceJ*, który nie ma ewidentnych homologii ze znanymi genami

[68]. Dwa kolejne geny *mceG* i *mceH* są niezbędne do eksportu MccE492. Kodują odpowiednio transporter ABC oraz białko pomocnicze. Gen *mceF* jest również zaangażowany w eksport mikrocyń, natomiast funkcja *mceE* pozostaje nieokreślona [54].

W oparciu o wyniki spektrometrii masowej stwierdzono, że MccE492 to niemodyfikowany, 84-aminokwasowy peptyd o charakterze anionowym. Co więcej, aminokwasy wchodzące w skład wspomnianej mikrocyń w większości nie posiadają ładunku i mają charakter hydrofobowy z wyłączeniem histydyny, trzech reszt asparagianinu i jednej glutaminianu [78]. Odcinek C-końcowy bogaty jest w cząsteczki seryny (sekwencja aminokwasowa SGSGYNSATSSSGSGS, Rys. 2). Zmieniając skład podłoża hodowlanego wyizolowano oraz zidentyfikowano posttranslacyjnie zmodyfikowaną mikrocyń E492 nazwaną MccE492m, która jest produkowana zarówno przez typ dziki *K. pneumoniae*, jak i przez rekombinowany szczep *E. coli* VCS257 [98]. Zmodyfikowana mikrocyń E492 posiada w swojej budowie C-glikozylowany, liniowy trimer DHBS (N-(2,3-dihydroksybenzoilo)-L-serynę) związany do grupy karboksylowej seryny w pozycji 84 dzięki związaniu O-glikozydowemu. Razem z enterobaktyną (cykliczny trimer DHBS) i salmocheliną (C-glikozylowany

odpowiednik enterobaktyny), DHBS jest jednym z głównych sideroforów katecholowych, dzięki którym bakterie Gram-ujemne wiążą żelazo i importują do wnętrza komórek. Zmodyfikowana mikrocyta wybiórczo wiąże żelazo do fragmentu katecholowego naśladując prawdziwy siderofor. Ponieważ MccE492m wykazuje szersze spektrum aktywności przeciwbakteryjnej oraz działa znacznie silniej na mikroorganizmy wrażliwe (niższy zakres wartości MIC) w porównaniu do MccE492, Thomas i wsp. [98] wysnuli wniosek, że modyfikacja prowadzi do lepszego rozpoznawania oraz większej aktywności przeciwbakteryjnej mikrocyty. Mikrocyta E492m zawierająca siderofor salmochelinowy jest pierwszym członkiem z nowej klasy peptydów przeciwdrobnoustrojowych określanych jest jako peptydy sideroforowe. Postranslacyjna modyfikacja (ugrupowanie sideroforowe) wzmacnia aktywność przeciwbakteryjną MccE492, która jest skierowana głównie przeciwko niektórym enterobakteriom za pośrednictwem receptorów sideroforów typu katecholowego [98]. Co więcej, wyizolowano oraz scharakteryzowano dwie kolejne mikrocyty sideroforowe – M oraz H47 i tym samym dowiedziono istnienia rodziny peptydów antybakteryjnych, produkowanych przez bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* i związanych ze sobą strukturalnie – mikorcyn sideroforowych [100].

5.1.2. MccJ25

Mikrocyta J25 (MccJ25, Rys. 2) odkryta u kałowego szczepu *E. coli* AY25 jest kodowana w plazmidzie pTUC100. Fragment DNA o długości 4,8 kbp, zawierający geny odpowiedzialne za produkcję MccJ25, eksport z komórki i odporność na wspomnianą mikrocytę, został sklonowany i zsekwencjonowany. Gen *mcjA* koduje prekursor MccJ25, podczas gdy *mcjB* i *mcjC* kodują peptydy odpowiedzialne prawdopodobnie za modyfikacje posttranslacyjne MccJ25. Ostatni gen *mcjD* odpowiedzialny jest zarówno za wydzielanie, jak i odporność na mikrocytę J25 [28].

Mikrocyta J25 jest pierwowzorem peptydów o kształcie laso, które tworzą rosnącą klasę bioaktywnych peptydów, syntetyzowanych w większości przez proteobakterie i aktinobakterie. Składają się z pierścienia makrolaktamowego zamkniętego pomiędzy N-końcową grupą aminową i boczną grupą karboksylową asparaginianu lub glutaminianu w pozycji 8 lub 9, gdzie zakleszczony jest C-końcowy fragment peptydu w formie luźnego łańcucha tworząc kształt laso.

Ta szczególnie, nefaworyzowana entropowo budowa jest stabilizowana m.in. przez mostki disiarczkowe, które wiążą luźny łańcuch z pierścieniem. MccJ25 jest 21-aminokwasowym peptydem w kształcie laso: grupa aminowa Gly¹ połączona jest z boczną grupą karboksylową Glu⁸ wiązaniem laktamowym formując N-końcowy pierścień związany z C-końcowym łańcu-

chem. Zagięcie laso jest utrzymywane dzięki bocznym łańcuchom dwóch aromatycznych aminokwasów, Phe¹⁹ i Tyr²⁰, które zapobiegają jego wysunięciu się z pierścienia. C-końcowy łańcuch jest trwale uwięziony w pierścieniu dzięki oddziaływaniom sterycznym [83]. Taka struktura nadaje mikrocytę J25, jak również innym peptydom w kształcie laso, niezwykle wysoką stabilność w momencie oddziaływania większości proteaz oraz wysokich temperatur w połączeniu z dużą koncentracją czynników chaotropowych [83]. W bardzo kwaśnym środowisku lub poprzez działanie endopeptydaz dochodzi do przzerwania pętli i powstania dwułańcuchowego białka, podczas gdy C-końcowy fragment pozostaje ściśle zakotwiczony w pierścieniu [78].

5.1.3. MccC7-C51

Mikrocyta C7-C51 (w skrócie MccC7-C51, MccC, Rys. 2) jest najmniejszą wyizolowaną dotąd mikrocytą, a dodatkowo jedyną znaną, która przyłącza nukleotyd podczas modyfikacji posttranslacyjnych. MccC7-C51 to N-formylowany heptapeptyd ze związanym kowalencyjnie do C-końcowego asparaginianu zmodyfikowanym adenozymonofosforanem (AMP) [78].

Mikrocyta C7 została wyizolowana przez Novoa i wsp. [69], którzy stwierdzili, że jest kodowana w plazmidzie pMccC7 o wielkości 43 kbp. Następnie mikrocyta nazwana C51, produkowana przez inny szczep *E. coli*, została wyodrębniona przez Khmela i wsp. [52], a wyizolowany plazmid pMccC51 miał wielkość 38 kbp. W dalszym etapie badań fragmenty DNA o wielkości 6,2 kbp i 5,7 kbp, pochodzące odpowiednio z plazmidu pC7 oraz pC51, zawierające klastry genów odpowiedzialnych za syntezę wyżej wspomnianych mikrocyt, a także ich sekrecję oraz odporność zostały zsekwencjonowane, a geny scharakteryzowane [31, 39]. Okazało się, że sekwencje nukleotydowe genów pochodzących z pC7 oraz pC51 są bardzo zbliżone do siebie. Wchodzące w skład klastrow geny *mccA*, *mccB*, *mccD* i *mccE* odpowiedzialne są za produkcję MccC7 i MccC51, podczas gdy *mccC* i *mccE* są niezbędne do warunkowania odporności. Ostatni, szósty gen z klastra – *mccF*, jest transkrybowany od przeciwległego końca i w małym stopniu odpowiada za odporność wobec MccC7, natomiast nie spełnia tej roli w przypadku MccC51. Zatem jedyna różnica pomiędzy klastrami genów pochodzących z pC7 oraz pC51 ma związek z kodowaniem odporności. Okazało się ponadto, że mikrocyty C7 i C51, chociaż kodowane przez dwa różne klastry genów mają identyczną strukturę cząsteczkową [78].

5.2. Mechanizmy działania mikrocyt

5.2.1. MccE492

MccE492 selektywnie hamuje wzrost Gram-ujemnych enterobakterii takich jak: *E. coli*, *Salmonella ente-*

rica, *Enterobacter cloacae* i *K. pneumoniae*. Wartości MIC wynoszą 40–160 nM przeciwko *E. coli* i *S. enterica* [28].

Mikrocyny E492, M i H47 nie są zdolne do zahamowania wzrostu szczepów niosących mutację w genach *fepA*, *cir* i *fiu* (produktami genów są białka receptorowe FepA, Cir i Fiu), gdyż dla uzyskania aktywności wymagają receptorów żelazowo-katecholowych. Przyłączenie MccE492 poprzez FepA, Fiu i Cir działa na zasadzie kooperacji, jednak głównym receptorem jest FepA [97]. Są to trzy sideroforowe receptory typu katecholowego, które związane są z systemem TonB. Aktywność mikrocyny E492 jest TonB-zależna [98], co oznacza, że wymagany jest występujący w błonie wewnętrznej kompleks TonB-ExbB-ExbD, który wykorzystuje siłę protonomotoryczną z błony plazmatycznej w celu transdukcji energii do błony zewnętrznej i zapewnienie energii do transportu. Bogaty w seryny region C-końcowy nie jest wymagany do funkcjonowania mikrocyny wewnątrz komórki wrażliwej, toteż uważa się, że służy on rozpoznaniu mikrocyny przez receptory katecholowo-sideroforowe FepA, Fiu i Cir. Po wnikięciu do przestrzeni peryplazmatycznej, mikrocyna E492 oddziałuje z komponentami błony wewnętrznej – ManY/ManZ i indukuje formowanie porów oraz depolaryzację błony wewnętrznej powodując śmierć komórki [7]. Nie wiadomo jednak, czy receptory żelazowo-sideroforowe kończą swoje działanie na destabilizacji błony, czy też służą dodatkowo do translokowania mikrocyny [25].

5.2.2. MccJ25

Mikrocyna ta wykazuje silną aktywność bakteriobójczą przeciwko wielu bakteriom należącym do rodziny *Enterobacteriaceae* z MIC w granicach 5–500 nM, m.in. szczepom z rodzajów *Salmonella*, *Escherichia* oraz *Shigella* [73]. Mikrocyna J25 do swojej aktywności wymaga transportera żelaza FhuA znajdującego się w błonie zewnętrznej [86]. Przeprowadzono eksperyment, w którym zbadano *in vitro* i *in vivo* wzajemne interakcje pomiędzy mikrocyną, a FhuA. W tym celu użyto aktywnej mikrocyny J25 i jej zmodyfikowanej formy uzyskanej dzięki trawieniu termolizyną. Ta modyfikacja sprawia, że mikrocyna traci prawie całkowicie swoją antybakteryjną aktywność. Badania *in vivo* wykazały, że dla prawidłowej aktywności mikrocyny niezbędne są zarówno zewnętrzny receptor błonowy FhuA, jak i kompleks TonB-ExbB-ExbD znajdujący się w błonie wewnętrznej. W przypadku, gdy u szczepu wrażliwego dojdzie do mutacji w genach kodujących FhuA, TonB i ExbB-ExbD, staje się on oporny na mikrocynę [24]. Dodatkowo MccJ25 nie pozwala na zainfekowanie *E. coli* przez faga T5 hamując jego adhezję, co wskazuje na to, że mikrocyna powstrzymuje interakcję pomiędzy fagiem, a receptorem FhuA. Badania *in vitro* potwierdzają te wyniki [78].

Znajdując się w przestrzeni peryplazmatycznej, MccJ25 wchodzi w interakcję z białkiem SbmA [86]. Nie określono precyzyjnie roli wspomnianego białka, ale prawdopodobnie pozwala mikrocynie J25 przekroczyć wewnętrzną błonę bakteryjną. Wewnątrzkomórkowym celem MccJ25 jest polimeraza RNA (RNAP, *RNA Polymerase*). Mikrocyna hamuje proces transkrypcji w komórce bakteryjnej poprzez zablokowanie drugiego kanału doprowadzającego substraty NTP (trifosforany rybonukleozydów) do centrum aktywnego polimerazy RNA [2, 67].

Mikrocyna J25 jest podzielona na dwa regiony: pierścień i łańcuch oraz fragment Val¹¹-Pro¹⁶ tworzący motyw β -szpilki do włosów, a każdy z wspomnianych regionów odgrywa szczególną rolę w odniesieniu do aktywności antybakteryjnej bakteriocydu. Beta zakręt odpowiada za rozpoznanie przez receptor FhuA, natomiast region pierścień – łańcuch odpowiedzialny jest za inhibicję RNAP [24, 89]. Trwają badania nad krystalizacją kompleksu FhuA – MccJ25 i określeniem sposobu w jaki mikrocyna jest translokowana do przestrzeni peryplazmatycznej [78].

5.2.3. MccC7-C51

Mikrocyna C7-C51 wykazuje bakteriostatyczną aktywność przeciwko kilku gatunkom spośród następujących rodzajów enterobakterii: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* oraz *Proteus* [39, 52]. Hamuje wzrost szczepów *E. coli* w zakresie MIC 100–500 nM [28].

Mikrocyna ta wnika do wnętrza komórki wrażliwej dzięki porynom OmpF i jest aktywnie przemieszczana przez błonę wewnętrzną jedynie dzięki transporterowi ABC – YejABEF. W rzeczywistości mikrocyna ta wykorzystuje N-formylowany heptapeptyd jako kamuflaż, by wnikać w głąb komórki bakteryjnej i tam się aktywować [63]. Zanim to nastąpi, podlega dwustopniowej modyfikacji. Pierwszy etap zapewnia deformylaza peptydowa, która usuwa N-końcową grupę formylową, drugi następuje dzięki kilku aminopeptydazom o szerokim spektrum działania, których celem jest wiązanie peptydowe Ala⁶-Asp⁷ i rozszczepienie części białkowej bakteriocydu. W rezultacie, zmodyfikowany związek zostaje uwolniony i pełni rolę potencjalnego inhibitora syntetazy aspartylo-tRNA, co skutkuje zatrzymaniem syntezy białek [64].

Unikalny sposób działania mikrocyny C7-C51, która dopiero wewnątrz komórki docelowej wykazuje swoją aktywność antymikrobiologiczną, czyni z niej bardzo atrakcyjny przedmiot dalszych badań. Szereg analogów MccC7-C51, które wykorzystują mechanizm tzw. konia trojańskiego naśladując naturalną mikrocynę już zostało zsyntetyzowanych chemicznie [103]. Związki te zamiast asparagianinu w pozycji 7 mają wbudowane inne aminokwasy i dlatego mogą działać

na inne syntetazy aminoacylo-tRNA. Rozważa się możliwość tworzenia kolejnych, nowych peptydów antybakteryjnych wywodzących się z mikrocyliny C7-C51, charakteryzujących się większą biodostępnością, silniejszą aktywnością antymikrobiologiczną i działających na inne cele wewnątrzkomórkowe [103].

6. Potencjalne zastosowanie kolicyn i mikrocylin

W związku ze wzrostem świadomości konsumentów dotyczącej artykułów spożywczych, producenci żywności stoją przed dużym wyzwaniem, aby produkty przez nich otrzymywane były jak najmniej przetworzone, bez chemicznych dodatków konserwujących, a przy tym miały długi okres przydatności do spożycia. Bakteriocyliny stanowią bardzo atrakcyjną opcję, aby choć część tych wymagań była w przyszłości zaspokojona. Stanowią naturalne dodatki do żywności, bo wytwarzane są przez bakterie, które występują w wielu produktach (np. otrzymywanych na drodze fermentacji mlekowej) i były spożywane przez ludzi nieświadomie od dawna [18]. By zastosować bakteriocynę jako potencjalny konserwant żywności, niezbędnym jest by spełniła kilka kryteriów. Po pierwsze, szczep wytwarzający bakteriocynę musi posiadać status GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Po drugie, wytwarzana bakteriocyna powinna być termostabilna, odporna na zmiany pH oraz wykazywać szerokie spektrum działania, bądź też aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do konkretnego patogenu. Bakteriocyna nie może stanowić ryzyka dla zdrowia konsumenta, a jej dodatek do żywności powinien wpływać na polepszenie bezpieczeństwa, jakości oraz smaku produktu [47]. Dodatek bakteriocyliny jako biokonserwanta może być korzystny ze względu na zmniejszenie ryzyka skażenia żywności, redukcję zakażeń krzyżowych w łańcuchu żywnościowym, wydłużenie czasu przydatności produktu do spożycia oraz zmniejszenie ilości innych chemicznych konserwantów, które potencjalnie mogłyby być użyte [35].

Obecnie stosowanymi jako biokonserwanty bakteriocynami są te wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego (LAB). Jednak bakteriocyliny bakterii Gram-dodatnich nie hamują lub hamują jedynie w niewielkim stopniu rozwój Gram-ujemnych patogenów. Bakteriocyną stosowaną na skalę przemysłową jest nizyna (E234) wytwarzana przez *L. lactis* i opisana po raz pierwszy w 1928 roku. Została zatwierdzona jako biokonserwant w 1988 roku przez FDA (*Food and Drug Agency*) i jest powszechnie używana w ponad 45 krajach, zgodnie z prawnie obowiązującymi regulacjami [35, 79]. Nizyna wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do szczepów bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus*, jednakże nie hamuje rozwoju bakterii

Gram-ujemnych, tj. *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* i *Pseudomonas*, chyba że zostaną one dodatkowo potraktowane substancją chelatującą, np. EDTA [21, 96]. Aby poszerzyć spektrum działania podjęto badania nad ekspresją mikrocyliny V w komórkach LAB [61]. Stworzono również rekombinantową bakteriocynę, hybrydę enterocyliny CRL35 i mikrocyliny V, nazwaną Ent35-MccV, która wykazuje aktywność antymikrobiologiczną przeciwko *E. coli* i *L. monocytogenes* [1].

Sable i wsp. [86] badając ekstrakty mleka i mięsa wykazali, że mikrocylina J25 hamuje wzrost szczepów *E. coli* O157:H7 wywołujących biegunki, natomiast Lyon i wsp. [58] zasugerowali rozpylanie kolicyn na produktach żywnościowych i maszynach używanych w przetwórstwie żywności.

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) probiotyki to żywe drobnoustroje, które podane człowiekowi i zwierzętom w odpowiedniej ilości mają korzystny wpływ na organizm gospodarza [26, 90]. Oczyszczone bakteriocyliny albo produkujące je kultury bakterii uważane za probiotyczne mogą redukować liczbę patogenów lub korzystnie wpływać na skład mikroflory jelitowej. Zdecydowana większość bakterii probiotycznych należy do bakterii Gram-dodatnich, jednak wyjątkiem od tej reguły jest np. niepatogenny szczep *E. coli* Nissle 1917 wchodzący w skład preparatów probiotycznych, np. Mutaflor® [110]. Cursino i wsp. [20] wykazali, że szczep *E. coli* H22, produkujący kilka związków o działaniu antybakteryjnym (m.in. kolicyny E1, Ib, mikrocylinę C7), hamuje rozwój patogennych i potencjalnie patogennych enterobakterii (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) i mogłyby znaleźć zastosowanie jako szczep probiotyczny.

W związku z rosnącą opornością bakterii na klasyczne antybiotyki poszukuje się nowych związków o działaniu antybakteryjnym i bakteriocyliny są rozważane jako jedno z alternatywnych rozwiązań wspomnianego problemu. Ponadto ze względu na różny mechanizm działania, połączenie bakteriocylin z niektórymi antybiotykami może pozwolić na uzyskanie synergistycznego efektu [3]. W wyniku fuzji domeny kolicyny Ia, odpowiedzialnej za tworzenie kanałów jonowych, i feromonów Gram-dodatnich bakterii (AgrD1, cCF10), otrzymano nową grupę peptydów antybakteryjnych, które są skuteczne i specyficzne wobec Gram-dodatnich szczepów patogennych, bez toksyczności w stosunku do komórek ssaków [75, 76]. Zihler i wsp. [110] wykazali, że szczep *E. coli* L1000, produkujący mikrocylinę B17, może być użyteczny w zwalczaniu infekcji wywołanych przez *Salmonella*. Natomiast Brown i wsp. [11] udowodnili, że niektóre kolicyny charakteryzują się aktywnością antybakteryjną skierowaną przeciwko adherentno-inwazyjnym szczepom *E. coli* (AIEC) wyizolowanym z przewodu pokar-

mowego pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i mogą być rozważane jako potencjalne terapeutyki.

Odrębną grupą badań nad bakteriocynami bakterii Gram-ujemnych jest sprawdzenie możliwości zastosowania ich w terapii antynowotworowej. Doświadczenia te zapoczątkowano ponad 30 lat temu, kiedy zaobserwowano, że kolicyna E3 działa cytotoksycznie na komórki HeLa [93]. Od tamtego czasu wiadomo, że niektóre kolicyny wywierają efekt letalny na komórki nowotworowe, chociaż nie jest jasne czy mechanizm działania jest identyczny jak w przypadku wrażliwych komórek bakteryjnych. Wykazano, że proliferacja komórek białaczki mysiej linii P388 jest zahamowana przez kolicynę E3 [33]. Wspomniana linia komórkowa została również poddana działaniu kolicyn D, E2 oraz A. Stwierdzono, że żywotność komórek ulegała obniżeniu w przypadku wszystkich zastosowanych bakteriocyn, przy czym najsilniejszy efekt był widoczny po zastosowaniu kolicyny A [94]. Badano również wpływ kolicyn E1 i E3 na transformowane *v-myb* monoblasty. W tym przypadku także zaobserwowano spadek żywotności testowanych komórek [92]. W innych badaniach wykazano, że kolicyny A i E1 charakteryzują się aktywnością cytotoksyczną wobec 11 ludzkich nowotworowych linii komórkowych [16]. Pozostałe testowane w doświadczeniu kolicyny (E3 i U) nie wpływały istotnie na badane linie komórkowe. Aktywność cytotoksyczna była silnie zróżnicowana w zależności od rodzaju kolicyny, jak i linii komórek nowotworowych. Kolicyna A charakteryzowała się największą aktywnością cytotoksyczną, ale również hamowała wzrost normalnych fibroblastów linii MRC5. Kolicyna E1 działała słabiej, zarówno na komórki nowotworowe, jak i normalne fibroblasty. Farkas-Himsley i Cheung [30] badali oddziaływanie bakteriocyn, w tym kolicyn na rozmaite komórki bakteryjne i eukariotyczne. Dowiedziono, że kolicyny wywierają silniejszy wpływ na komórki nowotworowe niż normalne, przy czym zwierzęce komórki nowotworowe były bardziej wrażliwe na działanie bakteriocyn niż ludzkie. Wiadomo również, że niektóre mikrocyyny (np. E492) mogą indukować apoptozę w pewnych ludzkich liniach komórkowych [45]. Wyniki innych badań sugerują, że obecność kolicyn, produkowanych przez szczepy bakterii występujące w przewodzie pokarmowym, może być jednym z czynników ograniczających rozwój raka jelita grubego [12]. W przypadku osób zdrowych stwierdzono, że 63,8% badanych posiadało w przewodzie pokarmowym szczepy *E. coli* wytwarzające bakteriocyny, podczas gdy u chorych na raka jelita grubego szczepy te wykryto jedynie u 41,6% badanych. Wydaje się zatem, że potencjalnym sposobem zapobiegania tego typu nowotworom mogłaby być suplementacja probiotykami produkującymi bakteriocyny. Kolicyny mogłyby być rozważane jako leki antynowotworowe o umiarkowanym potencjale [55, 108].

Intensywnie bada się również możliwość zastosowania bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych w hodowli zwierząt. Żywy inwentarz może zostać zainfekowany przez niezliczone patogenne mikroorganizmy, wśród których znajdują się i takie, które mogą zakazić organizm ludzki. Zjadliwe szczepy *E. coli* (np. O157:H7) oraz *Salmonella enteritidis* wywołują infekcje jelitowe zarówno u ludzi, jak i zwierząt, i są mikroorganizmami w zwalczaniu których wymagana jest terapia przeciwbakteryjna [5]. *Salmonella* i *Campylobacter* są przyczyną ponad 90% wszystkich przypadków zakażenia żywności na świecie [99].

Hodowcy zajmujący się żywym inwentarzem stosują szereg antybiotyków, np.: penicylinę, fluorochinolony lub tetracyklinę w celu zwalczania powszechnych infekcji bakteryjnych. Co więcej, specyfiki te często stosowane są profilaktycznie i wspomagająco, przez co działają nie tylko na szczepy zjadliwe, ale także na komensale żyjące w jelitach zwierząt [5]. Bardzo ważną kwestią jest ograniczenie stosowanie tradycyjnych antybiotyków, aby szczepy nie zyskiwały na nie oporności. W tym celu pracuje się nad wieloma strategiami, które mają polepszyć zdrowie zwierząt oraz wydajność i bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności bez zastosowania antybiotyków.

Istnieje wiele obaw zarówno o zdrowie publiczne, jak i ze względów ekonomicznych o wybuch chorób spowodowanych przez mikrobiologiczne zakażenie drobiu i jaj przez szczepy *S. enterica*, które są częstym kontaminantem i powszechnym patogenem wywołującym nieżyt żołądka i jelit [22, 99]. W celu zahamowania rozprzestrzeniania się, jak również eliminacji bakterii *Salmonella* z drobiu, do paszy piskląt dodaje się naturalną florę bakteryjną występującą w jelitach kur, a dodatkowo podaje się niezjadliwe mutanty tej bakterii, które konkurencyjnie zapobiegają kolonizacji przez szczepy wirulentne. Próby *in vitro* wskazują, że mikrocyyny produkowane przez szczepy *E. coli* hamują wzrost patogennych szczepów *Salmonella*. Nawet na podłożu ubogim w składniki pokarmowe, w warunkach zakwaszenia oraz w obecności żółci i enzymów proteolitycznych szczepy *E. coli* mogą produkować mikrocyyny [73, 107].

U bydła, zwacz jest głównym rezerwuarem Gram-ujemnego szczepu *E. coli* O157:H7, który wytwarza toksynę Shiga wywołującą u ludzi ostre biegunki i bardzo groźny, szczególnie u niemowląt, zespół hemolityczno-mocznicowy [71]. Zakażenie człowieka bakteriami STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) następuje głównie na skutek spożycia zanieczyszczonej żywności (mleka, sera, niedogotowanego mięsa) lub wody, a także poprzez bezpośredni kontakt z nosicielami. Zastosowanie terapii antybiotykowej powoduje, że bakterie produkują nadmierne ilości tej toksyny, co zwiększa zjadliwość szczepu producenta [104]. Niektóre kolicynogenne szczepy *E. coli* wykazują zdolność

hamowania rozwoju enterokrwotocznych szczepów *E. coli* [87]. Odkryto, że zaaplikowanie bakterii wytwarzających kolicyny do żywca znacznie redukuje poziom patogenów jelitowych u bydła [38]. Bakterie *E. coli* wytwarzające kolicynę E7 hamują kolonizację przez patogenny szczep *E. coli* O157:H7 po podaniu go cielętom w formie szczepienia [88]. W innych badaniach Jordi i wsp. [51] testowali wpływ 20 kolicynogennych szczepów *E. coli* na rozwój 5 szczepów *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga (O26, O111, O128, O145 i O157:H7). W symulowanym środowisku żywca, kolicyny E1, E4, E8-J, K i S4 znacząco ograniczały wzrost szczepów wytwarzających toksynę Shiga. Kolejnym obiecującym szczepem jest produkująca mikrocyne B17 *E. coli* Nissle 1917, której obecność prowadzi do zmniejszenia o połowę częstości występowania biegunki u bydła [102].

7. Podsumowanie

Od ostatnich niemalże stu lat trwają intensywne badania nad bakteriocynami wykazującymi działanie przeciwdrobnoustrojowe, produkowanymi przez Gram-ujemne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wśród nich wyróżnić można duże białka o masie 25–80 kDa, nazwane kolicynami oraz mikrocyne – peptydy o niskiej masie, wahającej się od 1–10 kDa. Informacja genetyczna zawarta w klastrach genowych kolicyn, jak i mikrocyne determinuje ich produkcję, eksport oraz odporność. Wszystkie do dziś odkryte kolicyny kodowane są w plazmidach, w przeciwieństwie do mikrocyne, wśród których te należące do klasy IIB kodowana są chromosomalnie.

Inaczej niż w przypadku mikrocyne, głównym mechanizmem indukującym produkcję kolicyn jest system SOS, który stanowi część systemu kontroli ekspresji genów, naprawiającego uszkodzenia DNA. Może być aktywowany pod wpływem stresu środowiskowego, np. promieniowania UV lub ekspozycji na inne czynniki uszkadzające DNA. Z kolei synteza mikrocyne przeważnie indukowana jest w wyniku redukcji składników odżywczych.

Jedną z ważniejszych różnic pomiędzy mikrocykami i kolicynami, pomijając oczywistą rozbieżność w przypadku mas cząsteczkowych obu grup związków, jest ich struktura. W przeciwieństwie do kolicyn, mikrocyne mogą podlegać modyfikacjom posttranslacyjnym. Klaster genowy kolicyn jest wysoce konserwatywny, a w obrębie ich struktury można wyróżnić trzy domeny odpowiedzialne za związanie kolicyny z odpowiednim receptorem, translokację do wnętrza komórki wrażliwej i aktywność antibakteryjną. Zarówno kolicyny, jak i mikrocyne mają wąskie spektrum działania i wykazują aktywność antimikrobiologiczną przeciwko

szczepom filogenetycznie spokrewnionym ze szczepem producenta.

Opisane w artykule mikrocyne (E492, J25, C7-C51) wykorzystują niezwykle złożone mechanizmy działania typu tzw. konia trojańskiego. Łączą się z receptorami, dzięki którym komórka wrażliwa pobiera ze środowiska niezbędne substancje (receptory żelazowo-sideroforowe), albo używają pewnego rodzaju kamuflażu w celu swobodnego wnikięcia w głąb komórki docelowej, która rozpoznaje je, jako substancje nieszkodliwe. Dopiero po wnikięciu wnętrza komórki docelowej, stają się substancjami szkodliwymi dla komórek wrażliwych. Powyższe strategie różnią się od tych wykorzystywanych przez bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich [28, 78].

Trwające od wielu lat badania nad bakteriocynami bakterii Gram-ujemnych pozwoliły odkryć zasady ich syntezy, budowę molekularną, stabilność, jak również mechanizmy, za pomocą których oddziałują na komórki bakteryjne. Od pewnego czasu wielką uwagę poświęca się na badanie ich potencjalnego zastosowania antimikrobiologicznego w przetwórstwie żywnościowym, ale także w medycynie i hodowli zwierząt. Jedno jest natomiast pewne, im więcej dowiadujemy o tej fascynującej rodzinie toksyn, tym większy zdaje się być ich potencjał, który w przyszłości pozwoliłby stawić czoła wielu ludzkim wyzwaniom związanym ze zdrowiem, rolnictwem i przemysłem żywnościowym.

Piśmiennictwo

1. Acuña L., Picariello G., Sesma F., Morero R.D., Bellomio A.: A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS Open Bio*, **2**, 12–19 (2012)
2. Adelman K., Yuzenkova J., La Porta A., Zenkin N., Lee J., Lis J.T., Borukhov S., Wang M.D., Severinov K.: Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic microcin J25. *Mol. Cell*, **14**, 753–762 (2004)
3. Balciunas E.M., Castillo Martinez F.A., Todorov S.D., Gombossy de Melo Franco B.D., Converti A., Prinheiro de Souza Oliveira R.: Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, **32**, 134–142 (2013)
4. Baquero F., Moreno F.: The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 117–124 (1984)
5. Barton M.D., Hart W.S.: Public health risks: Antibiotic resistance – review. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **14**, 414–422 (2001)
6. Bénédetti H., Llobès R., Lazdunski C., Letellier L.: Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* **11**, 441–447 (1992)
7. Bieler S., Silva F., Soto C., Belin D.: Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.* **188**, 7049–7061 (2006)
8. Blaser M.: Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*, **476**, 393–394 (2011)
9. Błaszczuk U.: Bakteriocyny – właściwości i zastosowanie. *Laboratorium przemysłowe*, **10**, 28–32 (2008)

10. Braun V., Pils H., Gross P.: Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.* **161**, 199–206 (1994)
11. Brown C.L., Smith K., Wall D.M., Walker D.: Activity of species-specific antibiotics against Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 2372–2382 (2015)
12. Bures J., Horák V., Fixa B., Komárková O., Zaydlar K., Lonský V., Masurka V.: Colicinogeny in colorectal cancer. *Neoplasma*, **33**, 233–237 (1986)
13. Cascales E., Buchanan S.K., Duché D., Kleanthous C., Llobès R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavad D.: Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 158–229 (2007)
14. Cavad D., Llobès R., Morlon J., Chartier M., Lazdunski C.: Lysis protein encoded by plasmid ColA-CA31. Gene sequence and export. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 95–100 (1985)
15. Chavan M.A., Riley M.A.: Molecular evolution of bacteriocins in Gram-negative bacteria (w) Bacteriocins: Ecology and Evolution, red. M.A. Riley, M.A. Chavan, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, s. 19–43
16. Chumchalová J., Smarda J.: Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol.* **48**, 111–115 (2003)
17. Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L.: Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1–20 (2001)
18. Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 (2005)
19. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.: Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95–105 (2013)
20. Cursino L., Smajs D., Smarda J., Nardi R.M., Nicoli J.R., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.: Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 821–829 (2006)
21. Cutter C.N., Siragusa G.R.: Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *J. Food Prot.* **58**, 1028–1030 (1995)
22. Daniels N.A., MacKinnon L., Rowe S.M., Griffin P.M., Mead P.S.: Foodborne disease outbreaks in United States schools. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 623–628 (2002)
23. de Lorenzo V.: Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**, 72–75 (1984)
24. Destoumieux-Garzón D., Duquesne S., Peduzzi J., Goulard C., Desmadril M., Letellier L., Rebuffat S., Boulanger P.: The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val¹¹-Pro¹⁶ β -hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem. J.* **389**, 869–876 (2005)
25. Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Thomas X., Djediat C., Rebuffat S.: Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *Biometals*, **19**, 181–191 (2006)
26. Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.: Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1–6 (2012)
27. Duché D., Letellier L., Géli V., Bénédetti H., Baty D.: Quantification of group A colicin import sites. *J. Bacteriol.* **177**, 4935–4939 (1995)
28. Duquesne S., Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Rebuffat S.: Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 708–734 (2007)
29. Eraso J.M., Chidambaram M., Weinstock G.M.: Increased production of colicin E1 in stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**, 1928–1935 (1996)
30. Farkas-Himsley H., Cheung R.: Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agent of neoplasia. *Cancer Res.* **36**, 3561–3567 (1976)
31. Fomenko D.E., Metlitskaya A.Z., Péduzzi J., Goulard C., Katrukh G.S., Gening L.V., Rebuffat S., Khmel I.A.: Microcin C51 plasmid genes: possible source of horizontal gene transfer. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2868–2874 (2003)
32. Fredericq P. Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose de *E. coli*. *C.R. Soc. Biol.* **140**, 1189–1194 (1946)
33. Fuska J., Fuskova A., Smarda J., Mach J.: Effect of colicin E3 on leukemia cells P388 in vitro. *Experientia*, **35**, 406–407 (1978)
34. Gaillard-Gendron S., Vignon D., Cottenceau G., Graber M., Zorn N., van Dorsselaer A., Pons A.M.: Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 95–98 (2000)
35. Gálvez A., López R.L., Abriouel H., Valdivia E., Omar N.B.: Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**, 125–152 (2008)
36. Gao Y., Li D., Liu S., Zhang L.: Garviecin LG34, a novel bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* isolated from traditional Chinese fermented cucumber. *Food Control*, **50**, 896–900 (2015)
37. Ghadbane M., Harzallah D., Laribi A.I., Jaouadi B., Belhadj H.: Purification and biochemical characterization of a highly thermostable bacteriocin isolated from *Brevibacillus brevis* strain GM100. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 151–160 (2013)
38. Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A.: Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 129–146 (2004)
39. González-Pastor J.E., San Millán J.L., Castilla M.A., Moreno F.: Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* **177**, 7131–7140 (1995)
40. Gordon D.M., Oliver E., Littlefield-Wyer J.: The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria (w) Bacteriocins: Ecology and Evolution, red. M. A. Riley, M. A. Chavan, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, s. 5–18
41. Gratia A., Fredericq P.: Diversité des souches antibiotiques de *Bacterium coli* et étendue variable de leur champ d'action. *C. R. Soc. Biol.* **140**, 1032–1033 (1946)
42. Gratia A.: Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* **93**, 1040–1042 (1925)
43. Güllüce M., Karaday M., Barış Ö.: Bacteriocins: promising natural antimicrobials (w) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Red. A. Méndez-Vilas, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2013, s. 1016–1027
44. Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocyyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, **1**, 114–130 (2005)
45. Hetz C., Bono M.R., Barros L.F., Lagos R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2696–2701 (2002)
46. H-Kittikun A., Biscola V., El-Ghaish S., Jaffrès E., Dousset X., Pillot G., Haertlé T., Chobert J.M., Hwanhlem N.: Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, **54**, 126–134 (2015)
47. Holzapfel W. H., Geisen R., Schillinger U.: Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 343–362 (1995)
48. Jachna-Sawicka K.G., Gospodarek E., Bugalski R.M.: Bakteriocyyny pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*. *Post. Mikrobiol.* **44**, 17–27 (2005)

49. Jakes K.S., Zinder N.: Highly purified colicin E3 contains immunity protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3380–3384 (1974)
50. James R., Kleanthous C., Moore G.R.: The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology*, **142**, 1569–1580 (1996)
51. Jordi B.J., Boutaga K., van Heeswijk C.M., van Knapen F., Lipman L.J.: Sensitivity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 329–334 (2001)
52. Khmel I.A., Bondarenko V.M., Manokhina I.M., Basyuk E.I., Metlitskaya A.Z., Lipasova V.A., Romanova Y.M.: Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains producing microcins B and C types. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 269–274 (1993)
53. Klaenhamer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–85 (1993)
54. Lagos R., Baeza M., Corsini G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., Vergara C., Monasterio O.: Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**, 229–243 (2001)
55. Lancaster L.E., Wintermeyer W., Rodnina M.V.: Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Mol. Dis.* **38**, 15–18 (2007)
56. Lü X., Hu P., Dang Y., Liu B.: Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food Control*, **43**, 276–283 (2014)
57. Lü X., Yi L., Dang J., Dang Y., Liu B.: Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms. *Food Control*, **46**, 264–271 (2014)
58. Lyon W.J., Olson D.G., Murano E.A.: Method and colicin composition for inhibiting *Escherichia coli* 0157:H7 in food products. US Patent 05549895, Iowa State University Research Foundation, Iowa, USA, 1996
59. Maqueda M., Gálvez A., Bueno M.M., Sanchez-Barrena M.J., González C., Albert A., Rico M., Valdivia E.: Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 399–416 (2004)
60. Martinez R.C., Wachsman M., Torres N.I., LeBlanc J.G., Todorov S.D., Franco B.D.: Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. *Food Microbiol.* **34**, 376–381 (2013)
61. McCormick J.K., Klaenhamer T.R., Stiles M.E.: Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 37–41 (1999)
62. Messaoudi S., Kergourlay G., Dalgalarondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prévost H., Pilet M.F., Chobert J.C., Manai M., Dousset X.: Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* **32**, 129–134 (2012)
63. Metlitskaya A., Kazakov T., Kommer A., Pavlova O., Praetorius-Ibba M., Ibba M., Krashennikov I., Kolb V., Khmel I., Severinov K.: Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. *J. Biol. Chem.* **281**, 18033–18042 (2006)
64. Metlitskaya A., Kazakov T., Vondenhoff G.H., Novikova M., Shashkov A., Zaitsepina T., Semenova E., Zaitseva N., Ramensky V., Van Aerschoot A., Severinov K.: Maturation of the translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriol.* **191**, 2380–2387 (2009)
65. Miao J., Guo H., Ou Y., Liu G., Fang X., Liao Z., Ke C., Chen Y., Zhao L., Cao Y.: Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*, **42**, 48–53 (2014)
66. Molisch H.: Der Einfluss einer Pflanze auf die andere- Allelopathie. Fischer, Jena, 1937
67. Mukhopadhyay J., Sineva E., Knight J., Levy R.M., Ebricht R.H.: Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell*, **14**, 739–751 (2004)
68. Nolan E.M., Fischbach M.A., Koglin A., Walsh C.T.: Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14336–14347 (2007)
69. Novoa M.A., Diaz-Guerra L., San Millan J.L., Moreno F.: Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J. Bacteriol.* **168**, 1384–1391 (1986)
70. Pei J., Yuan Y., Yue T.: Primary characterization of bacteriocin paracin C – A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*. *Food Control*, **34**, 168–176 (2013)
71. Phillips C.A.: The epidemiology, detection, and control of *Escherichia coli* O157. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1367–1381 (1999)
72. Pons A.M., Lanneluc I., Cottenceau G., Sable S.: New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, **84**, 531–537 (2002)
73. Portrait V., Gendron-Gaillard S., Cottenceau G., Pons A.M.: Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Can. J. Microbiol.* **45**, 988–994 (1999)
74. Pugsley A.P.: The ins and outs of colicins. I. Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **1**, 168–175 (1984)
75. Qiu X.Q., Wang H., Lu X.F., Zhang J., Li S.F., Cheng G., Wan L., Yang L., Zuo J.Y., Zhou Y.Q., Wang H.Y., Cheng X., Zhang S.H., Ou Z.R., Zhong Z.C., Cheng J.Q., Li Y.P., Wu G.Y.: An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1480–1485 (2003)
76. Qiu X.Q., Zhang J., Wang H., Wu G.Y.: A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1184–1189 (2005)
77. Rebuffat S.: Bacteriocins from Gram-negative bacteria: a classification? (w) Prokaryotic Antimicrobial Peptides, red. D. Drider, S. Rebuffat, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011, s. 55–72
78. Rebuffat S.: Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1456–1462 (2012)
79. Riley M.A.: Bacteriocins, biology, ecology, and evolution (w) Encyclopedia of Microbiology, red. M. Schaechter, Elsevier, Oxford, 2009, s. 32–44
80. Riley M.A., Gordon D.M.: The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**, 129–133 (1999)
81. Riley M.A., Gordon D.M.: The ecology and evolution of bacteriocins. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 151–158 (1996)
82. Riley M.A., Wertz J.E.: Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 117–137 (2002)
83. Rosengren K.J., Blond A., Afonso C., Tabet J.C., Rebuffat S., Craik D.J.: Structure of thermolysin cleaved microcin J25: extreme stability of a two-chain antimicrobial peptide devoid of covalent links. *Biochemistry*, **43**, 4696–4702 (2004)
84. Sable S., Pons A.M., Gendron-Gaillard S., Cottenceau G.: Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4595–4597 (2000)
85. Salles B., Weisemann J.M., Wfanstock G.M.: Temporal control of colicin E1 induction. *J. Bacteriol.* **169**, 5028–5034 (1987)
86. Salomón R.A., Fariás R.N.: The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* **175**, 7741–7742 (1993)
87. Schamberger G.P., Diez-Gonzalez F.: Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **67**, 486–492. (2004)

88. Schamberger G.P., Phillips R.L., Jacobs J.L., Diez-Gonzalez F.: Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6053–6060 (2004)
89. Semenova E., Yuzenkova Y., Peduzzi J., Rebuffat S., Severinov K.: Structure – activity analysis of microcin J25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **187**, 3859–3863 (2005)
90. Słońska A., Klimuszko D.: Bakteriocyny probiotycznych pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Mikrobiol.* **49**, 87–96 (2010)
91. Šmajš D.: The morphology of bacterial cell in inhibition zones produced by colicins. *Scripta medica*, **68**, 171–180 (1995)
92. Smarda J., Fialova M., Smarda J.: Cytotoxic effects of colicins E1 and E3 on v-myc-transformed chicken monoblasts. *Folia Microbiol. (Praha)*, **47**, 11–13 (2001)
93. Smarda J., Obdrzalek V.: The lethal effect of colicin E3 on HeLa cells in tissue cultures. *IRCS J. Med. Sci.* **5**, 524 (1977)
94. Smarda J., Oravec C.: Cytocidal effect of bacteriocin on lymphoma cells. *Akt. Klin. Onkol.* **21**, 209–212 (1989)
95. Smarda J., Šmajš D.: Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* **43**, 563–582 (1998)
96. Stevens K.A., Sheldon B.W., Klapes N.A., Klaenhammer T.R.: Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3613–3615 (1991)
97. Strahsburger E., Baeza M., Monasterio O., Lagos R.: Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3083–3086 (2005)
98. Thomas X., Destoumieux-Garzón D., Péduzzi J., Afonso C., Blond A., Birlirakis N., Goulard C., Dubost L., Thai R., Tabet J.C., Rebuffat S.: Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 28233–28242 (2004)
99. Trevejo R.T., Courtney J.G., Starr M., Vugia D.J.: Epidemiology of salmonellosis in California, 1990–1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs. *Am. J. Epidemiol.* **157**, 48–57 (2003)
100. Vassiliadis G., Destoumieux-Garzón D., Lombard C., Rebuffat S., Peduzzi J.: Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 288–297 (2010)
101. Vassiliadis G., Peduzzi J., Zirah S., Thomas X., Rebuffat S., Destoumieux-Garzón D.: Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3546–3553 (2007)
102. von Buenau R., Jaekel L., Schubotz E., Schwarz S., Stroff T., Krueger M.: *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* **88**, 317–323 (2005)
103. Vondenhoff G.H.M., Dubiley S., Severinov K., Lescrinier E., Rozenski J., Van Aerschot A.: Extended targeting potential and improved synthesis of Microcin C analogs as antibacterials. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 5462–5467 (2011)
104. Walterspiel J.N., Ashkenazi S., Morrow A.L., Cleary T.G.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin. *Infection*, **20**, 25–29 (1992)
105. Wannun P., Piwat S., Teanpaisan R.: Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. *Anaerobe*, **27**, 17–21 (2014)
106. Wilkens M., Villanueva J.E., Cofré J., Chnaiderman J., Lagos R.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**, 4789–4794 (1997)
107. Wooley R.E., Gibbs P.S., Shotts E.B.: Inhibition of *Salmonella typhimurium* in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **43**, 245–250 (1999)
108. Yang S.-C., Lin C.-H., Sung C.T., Fang J.-Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* **5**, 241 (2014)
109. Zhu X., Zhao Y., Sun Y., Gu Q.: Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chem.* **165**, 216–223 (2014)
110. Zihler A., Le Blay G., De Wouters T., Lacroix C., Braegger C.P., Lehner A., Tischler P., Rattei T., Hächler H., Stephan R.: *In vitro* inhibition activity of different bacteriocin-producing *Escherichia coli* against *Salmonella* strains isolated from clinical cases. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 31–38 (2009)