

Kwartalnik

Tom 46

Zeszyt 3 • 2007

CODEN:

PMKMAV 46 (3)

2007

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

<http://www.pm.microbiology.pl>

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), MIECZYŚLAW K. BŁASZCZYK (SGGW Warszawa),
RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski), JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki),
DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka), EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Akademia Medyczna w Warszawie), MIROŚLAW KAŃTOCH (Państwowy Zakład Higieny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki), BOHDAN STAROŚCIAK (Akademia Medyczna w Warszawie),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

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

Adresy redakcji

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (0 22) 554 13 05/304, fax (0 22) 554 14 04
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (0 22) 628 08 22, (0 22) 621 13 51
e-mail: bjstaros@amwaw.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
tel./fax: (091) 46 616 51, 52, lub fax: (091) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@szczecin.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 KOMITETU BADAŃ NAUKOWYCH

Index Copernicus ICV = 3,06 (2006); Pismo indeksowane w EMBASE/Excerpta Medica

Na okładce:

Mikrofotografia fluorescencyjna cytoszkieletu aktynowego komórek nabłonkowych linii Int407
zainfekowanych szczepem *Bacillus subtilis* wydzielającym hemolizynę listeryjną
(fot. Jarosław Wiśniewski, Instytut Mikrobiologii UW).

Projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

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 + 15 egz., Objętość 13 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk:

Zakład Wydawniczy *Letter Quality*, 01-216 Warszawa, Bryłowska 35/38,
tel. 0 22 631 45 18, 0 607 217 879, e-mail: letter.quality@neostrada.pl

Mirosław Kańtoch

1928–2007

profesor zwyczajny
w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie,
wirusolog



W dniu 5 maja 2007, zmarł prof. zw. dr hab. med. Mirosław Kańtoch, członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk, wybitny wirusolog, twórca współczesnej wirusologii polskiej, ekspert WHO ds. wirusologii lekarskiej, inicjator i główny wykonawca programów naukowych wspólnie z Center for Disease Control w Atlancie, poświęconych zakażeniom wirusowym o społecznym znaczeniu w Polsce.

Mirosław Kańtoch urodził się 13.01.1928 roku w Sosnowcu, studiował na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej we Wrocławiu, gdzie w 1951 roku uzyskał dyplom lekarza medycyny. Był uczniem, a następnie asystentem prof. Ludwika Hirszfelda. Pracę doktorską, której promotorem był prof. Henryk Makower, obronił na AM we Wrocławiu w 1956 roku i uzyskał stanowisko adiunkta równoległe w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej AM i w Zakładzie Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. W 1956 roku zorganizował Pracownię Mikroskopii Elektronowej, której był kierownikiem przez blisko 10 lat. W 1961 roku, w wieku 33 lat, przedstawił pracę habilitacyjną oraz zdał kolokwium, a następnie wyjechał na stypendium z Fundacji Rockefellera do Baltimore, gdzie pracował pod kierownictwem prof. F.B. Banga. W swoich opowiadaniach prof. Kańtoch zawsze wymieniał nazwiska profesorów L. Hirszfelda, H. Makowera i F.B. Banga jako swoich nauczycieli, a zdjęcia tych trzech profesorów zawsze wisiały w jego gabinecie.

Trzy lata po powrocie z USA, w 1965 roku, prof. M. Kańtoch został przeniesiony służbowo przez Ministra Zdrowia do Warszawy, na stanowisko kie-

rownika Zakładu Wirusologii w Państwowym Zakładzie Higieny, które zajmował do 2000 roku.

Tytuł profesora nadzwyczajnego uzyskał w 1970 roku, profesora zwyczajnego w 1978 roku, zaś w 1986 został kolejno członkiem korespondentem PAN oraz w 1994 na członkiem rzeczywistym PAN.

Prof. M. Kańtoch brał udział w pracach szeregu Komitetów w PAN, między innymi Komitetu Mikrobiologii, Komitetu Immunologii, Komitetu Ekologii Człowieka, Komitetu Etiopatogenezy, Komitetu Immunologii i Etiopatogenezy Zakażeń Człowieka. Był członkiem honorowym Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Towarzystwa Epidemiologów, Mikrobiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych im. I.I. Miecznikowa w Rosji, członkiem zagranicznym New York Academy of Science, członkiem zwyczajnym Towarzystwa Naukowego Warszawskiego, Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, członkiem zespołu ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia.

Prof. M. Kańtoch zasiadał w Radach Naukowych wielu instytutów naukowych, m.in. Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Państwowego Zakładu Higieny, Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii. Był członkiem komitetów redakcyjnych szeregu czasopism naukowych m.in.: *Przeglądu Epidemiologicznego*, *Postępów Mikrobiologii*, *Medycyny Doświadczalnej i Mikrobiologii*, *Postępów Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *Polish Journal of Microbiology* oraz członkiem międzynarodowego komitetu redakcyjnego *Acta Virologica*.

Prof. M. K a n t o c h włożył wielki wkład w rozwój badań naukowych dotyczących etiopatogenezy, immunologii i immunoprofilaktyki zakażeń wirusowych. Na szczególną uwagę zasługuje Jego wkład w badania nad bezpieczeństwem, skutecznością i rozpowszechnieniem szczepień przeciwko wirusowi polio, odry i różyczki oraz badania, w tym czasie pionierskie, nad teratogennym działaniem wirusa różyczki jak również występowaniem wad wrodzonych spowodowanych zakażeniem matek w okresie ciąży innymi wirusami takimi jak wirus cytomegalii, *herpes simplex* (opryszczki wargowej) i *varicella zoster* (ospy wietrznej i półpaśca). Kontynuując dzieło prof. Feliksa Przesmyckiego, prof. M. K a n t o c h stał się współtwórcą polskiej wirusologii lekarskiej.

Wspomniane powyżej badania znajdują udokumentowanie w ponad dwustu pracach doświadczalnych, kilkudziesięciu doniesieniach zjazdowych, których Prof. M. K a n t o c h jest autorem lub współautorem.

Profesor jest również autorem szeregu monografii oraz kilku wydań podręcznika „Wirusologia Lekarska” przeznaczonego głównie dla studentów i lekarzy medycyny.

Wspominając prof. M. K a n t o c h a, nie można pominąć jego działalności dydaktycznej. My, pracownicy Zakładu Wirusologii PZH, pamiętamy Profesora przede wszystkim jako opiekuna, promotora prac doktorskich oraz Osobę, która nas inspirowała i wymagała przygotowania prac habilitacyjnych. Profesor był promotorem 20 prac doktorskich, z których 17 wyszło z Zakładu Wirusologii PZH, a 3 doktoraty pochodzą z okresu Jego pracy we Wrocławiu. Pamiętamy Profesora jako Osobę bardzo wymagającą, wiedzieliśmy jednak, że w każdym przypadku możemy liczyć na jego pomoc, opiekę i obronę.

*Pracownicy Zakładu Wirusologii
Państwowego Zakładu Higieny*

GORĄCZKA KRWOTOCZNA EBOLA. IMMUNOLOGICZNE I MOLEKULARNE MECHANIZMY PATOGENEZY, DIAGNOSTYKA, EKSPERYMENTALNE METODY LECZENIA I UODPARNIANIA

Maciej Łuczkiwicz¹, Magdalena Joanna Flaga²

¹Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (022) 5541421, e-mail: macciej@biol.uw.edu.pl

²Akademia Medyczna w Warszawie, I Wydział Lekarski, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2006 r.

1. Historia odkrycia wirusa. Epidemie gorączki krwotocznej Ebola. 2. Obraz kliniczny gorączki krwotocznej Ebola. 3. Przebieg infekcji. 4. Budowa i funkcje białek wirusa. 5. Diagnostyka gorączki krwotocznej Ebola. 6. Leczenie. 7. Eksperymentalne metody uodparniania czynnego. 8. Podsumowanie

Ebola haemorrhagic fever. Immunological and molecular mechanisms of pathogenesis, diagnostics, experimental methods of therapy and vaccination

Abstract: Two outbreaks of unknown haemorrhagic fever occurred in 1976 in central Africa. Mortality rate was very high, reaching 90%. Isolated virus was classified as a new member of the *Filoviridae* family and called Ebola. In the following years several new outbreaks occurred. The possibility of occurrence of this disease in developed countries and the threat of bioterrorism motivate many scientific centers to carry on the research on the mechanisms of pathogenesis trying to find effective treatment and vaccines. Experimental models using Ebola virus proteins (which do not require biosafety level 4 laboratories) have simplified investigations of viral protein functions. This review presents up-to-date knowledge about mechanisms of pathogenesis, molecular structure and function of viral proteins, rapid detection of Ebola hemorrhagic fever cases and experimental treatment as well as vaccination against this extremely dangerous disease.

1. Discovery of Ebola virus. Known Ebola haemorrhagic fever outbreaks. 2. Clinical symptoms of Ebola haemorrhagic fever. 3. Course of infection. 4. Structure and functions of viral proteins. 5. Diagnostics of Ebola haemorrhagic fever. 6. Treatment. 7. Experimental vaccines. 8. Summary

Słowa kluczowe: Ebola, *Filoviridae*, glikoproteina, krwotoki, Marburg

Key words: Ebola, *Filoviridae*, glycoprotein, haemorrhage, Marburg

1. Historia odkrycia wirusa. Epidemie gorączki krwotocznej Ebola

W czerwcu 1976 roku w południowym Sudanie w miejscowościach Nzara i Maridi wybuchła epidemia nieznanej dotąd gorączki krwotocznej (284 przypadki). We wrześniu 1976 r. podobna epidemia pojawiła się w północnym Zairze w miejscowości Yambuku (318 przypadków). Wyizolowany czynnik chorobotwórczy był wirusem bardzo podobnym do jedynego znanego dotąd przedstawiciela rodziny *Filoviridae* – wirusa Marburg, jednak z powodu różnic antygenowych sklasyfikowano go jako nowy typ i nazwano Ebola (*Ebolavirus* – EBOV) – od nazwy rzeki w Zairze, nad którą wybuchła epidemia [91, 96, 97]. Ponieważ wykazano różnice pomiędzy wirusami wyizolowanymi w Sudanie i Zairze, wyróżniono dwa podtypy: Ebola-Zaire (EBO-Z) i Ebola-Sudan (EBO-S) [9, 18, 65, 96, 97]. EBO-Z (wskaźnik śmiertelności 88%) był bardziej zjadliwy od EBO-S (wskaźnik śmiertelności 53%). Pojedynczy przypadek zakażenia EBO-Z zanotowano w 1977 w Tandala w Zairze. Analiza wykazała, że w tym rejonie wystąpiły już w 1972 r. 2 przypadki

choroby. U 7% okolicznych mieszkańców stwierdzono w surowicy krwi przeciwciała [28]. W 1979 w Nzara wybuchła kolejna, znacznie mniejsza (34 przypadki) epidemia wywołana przez EBO-S; śmiertelność sięgnęła 65%. W roku 1989 w laboratorium w Reston w USA wybuchła epidemia gorączki krwotocznej wśród małp z gatunku *Macacca fascicularis*. Małpy zabito i spalono, laboratorium zamknięto i odkażono. Wyizolowanego wirusa zaklasyfikowano jako nowy podtyp Ebola-Reston (EBO-R) [16, 96, 97]. Przypadki zachorowań wśród zwierząt doświadczalnych wywołane przez EBO-R zdarzały się jeszcze kilkakrotnie w USA i we Włoszech; dotyczyły małp przywiezionych z Filipin. EBO-R okazał się niepatogenny dla ludzi, mimo że wykrywano u nich przeciwciała. Jako jedyny z podtypów Ebola przenosił się na drodze kropelkowej. W 1994 na Wybrzeżu Kości Słoniowej zanotowano pojedynczy przypadek gorączki krwotocznej; osobą zakażoną był naukowiec, który dokonywał sekcji zwłok szympanów. Wyizolowanego wirusa zaklasyfikowano jako kolejny podtyp: Ebola-Cote d'Ivoire (EBO-CI) [96, 97]. Przypadki choroby wywołanej przez ten podtyp obserwowano również u różnych gatunków małp.

EBO-Z pojawił się znów w 1995 w Kikwit w Zairze (315 przypadków, śmiertelność 81%) [38, 96, 97] oraz w 1996, 1997 i 2002 w Gabonie (mniejsze epidemie). W latach 2001–2003 wywołał również trzy epidemie w Kongo (dawnym Zairze), potwierdzając po raz kolejny swoją bardzo wysoką zjadliwość (śmiertelność powyżej 75%). EBO-S wywołał największą ze znanych epidemii wirusa Ebola – w latach 2000–2001 w Ugandzie (425 przypadków, w tym 224 śmiertelne) [11, 96, 97]. Od czasu odkrycia wirusa Ebola notowano również kilka sporadycznych zachorowań na terenach endemicznych oraz przypadki zakażeń w laboratoriach. Zestawienie wszystkich dotychczasowych przypadków gorączki krwotocznej Ebola przedstawia tabela I.

Wirus Ebola należy do rodziny *Filoviridae* (wirusy o nitkowatym kształcie wirionu, otoczone osłonką z podwójnej błony lipidowej), zaliczanej do *Mononegavirales* (zwierzęcych wirusów, których genomem jest pojedyncza cząsteczka RNA o ujemnej polarności) [99]. Wyróżniono się 4 podtypy (EBO-Z, EBO-S, EBO-R, EBO-CI), różniące się w niewielkim stopniu średnią długością i morfologią wirionu; w ramach każdego podtypu występuje polimorfizm wirionów. Podtypy znacznie różnią się między sobą na poziomie antygenowym. Znane szczepy EBO-Z (Mayinga-76, Zaire-76, Eckron-76, Tandala-77, Kikwit-95 i Gabon-94) wykazywały najwyższą zjadliwość (śmiertelność w czasie większych epidemii sięgała ok. 90%). Szczepy EBO-S (Boniface-

76, Maleo-79) były również bardzo zjadliwe, ale tu śmiertelność była nieco niższa i wynosiła do ok. 65%. Zanotowano pojedyncze przypadki EBO-CI (Tai Forest-94), zakończone wyzdrowieniem. EBO-R (Reston-89, Philippines-89, Siena-92, Texas-96), mimo że infekował ludzi, nie wywoływał objawów chorobowych (jedyne epidemie wywołane przez EBO-R wystąpiły wśród małp). W czasie trzydziestu lat od wyizolowania i zidentyfikowania wirusa Ebola, zanotowano łącznie 1851 przypadków u ludzi, z czego 1288 śmiertelnych; ogólny wskaźnik śmiertelności wynosi 69,5% (należy jednak pamiętać, że poszczególne podtypy znacznie różnią się zjadliwością) [9, 96–98].

Do dnia dzisiejszego nie jest znany rezerwuar wirusa. Przepuszczalnie mogą być to owocożerne nietopierze, u których stwierdzano wysoki poziom przeciwciał, natomiast nie zaobserwowano objawów chorobowych [44]. Wirus Ebola wywołuje chorobę u różnych gatunków małp, na ludzi przenosi się sporadycznie. Do zakażenia dochodzi przez bezpośredni kontakt ze zwierzęciem lub osobą chorą. Szczególnie niebezpieczne są: krew, ślina, wydaliny; dochodzi również do zakażeń na drodze płciowej i w czasie kontaktu ze zwłokami. Z tego powodu najbardziej narażony jest personel medyczny i rodziny chorych. W epidemiach afrykańskich poważnym źródłem zakażenia były również niewystarczająco sterylizowane igły, strzykawki i inny sprzęt medyczny wielokrotnego użytku [11, 38, 91, 96, 97].

Tabela I
Znane przypadki gorączki krwotocznej Ebola [96, 97]

Rok	Kraj	Podtyp wirusa	Liczba przypadków	Liczba przypadków śmiertelnych	Śmiertelność
1976	Sudan	EBO-S	284	151	53%
1976	Zair	EBO-Z	318	280	88%
1976	Wlk. Brytania	EBO-S	1	0	0%
1977	Zair	EBO-Z	1	1	100%
1979	Sudan	EBO-S	34	22	65%
1994	Gabon	EBO-Z	52	31	60%
1994	Wybż. Kości Sł.	EBO-CI	1	0	0%
1995	Liberia	EBO-CI	1	0	0%
1995	Zair	EBO-Z	315	250	81%
1996	Gabon	EBO-Z	37	21	57%
1996	RPA	EBO-Z	1	1	100%
1996–1997	Gabon	EBO-Z	60	45	74%
2000–2001	Uganda	EBO-S	425	224	53%
2001–2002	Gabon	EBO-Z	65	53	82%
2001–2002	Kongo	EBO-Z	59	44	75%
2002–2003	Kongo	EBO-Z	143	128	89%
2003	Kongo	EBO-Z	35	29	83%
2004	Sudan	EBO-S	17	7	41%
2004	USA	EBO-Z	1	0	0%
2004	Rosja	EBO-Z	1	1	100%
Łącznie			1851	1288	

2. Obraz kliniczny gorączki krwotocznej Ebola

Początkowe objawy są niecharakterystyczne: uczucie zmęczenia, bóle brzucha, mięśni, stawów, gardła, nudności, wymioty, biegunka. W drugiej fazie choroby występuje skaza krwotoczna: krwawe wymioty i biegunki, wybroczyny (łac. *petechiae*), krwawienia i krwo-toki wewnętrzne i zewnętrzne, nawet przez nieuszkodzoną skórę i błony śluzowe. Pojawia się zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC – *disseminated intravascular coagulation*). Utrata krwi i powstawanie ognisk martwiczych w narządach prowadzą do wstrząsu i śmierci. W przebiegu choroby charakterystyczne są również: leukopenia, małopłytkowość, objawy uszkodzenia wątroby i masywna wiremia. Nie jest znane leczenie przyczynowe; pomoc udzielana chorym polega na łagodzeniu objawów i wyrównywaniu strat płynów, elektrolitów, krwi i osoczowych czynników krzepnięcia [5, 11, 38, 91, 96, 97].

3. Przebieg infekcji

Na podstawie badań wśród ludzi zakażonych wirusem Ebola, jak również doświadczeń prowadzonych na małpach, opracowano model przebiegu infekcji. EBOV infekuje w pierwszej kolejności monocyty i komórki dendrytyczne [2, 19, 75, 87]. We wnikaniu wirusa istotną rolę odgrywa komórkowe białko DC-SIGN (*Dendritic Cell – Specific ICAM-3 Grabbing Nontegrin*, CD209) i jego homolog L-SIGN. Są to białka błonowe typu 2, z pozakomórkową domeną C-lecytyny. Ekspresja DC-SIGN zachodzi w niedojrzałych komórkach dendrytycznych, natomiast L-SIGN w komórkach śródbłonna w wątrobie i w węzłach chłonnych. DC-SIGN bierze udział w migracji komórek dendrytycznych oraz we wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej – w interakcjach pomiędzy komórkami dendrytycznymi i komórkami śródbłonna z limfocytami T. Obydwa białka są prawdopodobnie receptorem *cis* dla wirusa Ebola, ale mogą również funkcjonować jako receptor *trans*, umożliwiając cząstkom wirusowym wnikanie do innych komórek [2]. Koreceptorem jest prawdopodobnie FR- α (*folate receptor alpha*) – białko błonowe, wiążące cząsteczki kwasu foliowego i transportujące je do komórki [12]. Szereg prac podkreśla rolę wirusowego białka GP_{1,2} w specyficznym rozpoznaniu receptora [1, 13, 48, 49, 67]. Po sfagocytowaniu wirus znajduje się w pęcherzyku endosomalnym, gdzie w wyniku działania obniżonego pH następuje zmiana konformacji białka powierzchniowego GP, co z kolei indukuje fuzję błony komórki z otoczką wirusa [1, 49, 67]. EBOV rozprzestrzenia się z pierwotnego miejsca zakażenia za pośrednictwem monocytów i komórek dendrytycznych do regionalnych

węzłów chłonnych (głównie przez naczynia limfatyczne) oraz do wątroby i śledziony (przez naczynia krwionośne). Na wczesnym etapie infekcji wirus aktywuje monocyty i makrofagi. Początkowa aktywacja jest niezależna od replikacji wirusa wewnątrz zainfekowanych komórek; natomiast podtrzymanie aktywacji wymaga replikacji wirusa bądź dłuższego kontaktu z wirusem inaktywowanym. Sądzone, że może to świadczyć o pewnej roli niestrukturalnych białek wirusowych w zapoczątkowaniu aktywacji [75], jednak nowsze prace wykazały, że białkiem aktywującym jest GP_{1,2} w formie związanej z otoczką wirionu [87]. Żadne z białek niestrukturalnych nie aktywowało monocytów, być może białko obecne na wirionach ma inną konformację, niezbędną do aktywacji. Rola białek niestrukturalnych jest nadal dyskusyjna; przypuszcza się, że mogą one działać w tkankach będących późniejszymi celami infekcji, adsorbować przeciwciała lub blokować aktywację neutrofilii [93]. Aktywacja monocytów i makrofagów powoduje zwiększenie ekspresji genów kodujących wiele czynników wydzielanych przez te komórki: cytokiny i chemokiny prozapalne. W wątrobie i węzłach chłonnych EBOV infekuje makrofagi tkankowe (w tym komórki Kupffera w wątrobie) i komórki dendrytyczne. We wczesnej fazie infekcji EBOV aktywuje komórki dendrytyczne przez zwiększenie ekspresji INF- α i TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Nadekspresja TRAIL indukuje apoptozę limfocytów T, co skutkuje supresją odpowiedzi immunologicznej [21, 27]. Makrofagi nie ulegają apoptozie pod wpływem TRAIL z powodu obniżonej ekspresji TRAIL-receptora 2 [21]. Wśród czynników wydzielanych przez zainfekowane komórki wymienić należy: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, GRO- α , MIP-1 α , MIP-2 β i MCP-1. Przyciągają one kolejne makrofagi do miejsc infekcji, ułatwiając w ten sposób wirusowi zakażenie nowych komórek [3, 21, 27, 43, 75]. Dodatkowo po ok. 6 dniach od infekcji następuje zahamowanie ekspresji MHC II [27]. W wyniku działania białka VP35 zahamowana zostaje również produkcja interferonów typu I (α i β) w zainfekowanych komórkach [6, 7]. W miarę postępu choroby wzrasta poziom wolnych rodników tlenowych uwalnianych przez zakażone makrofagi, co wywołuje apoptozę komórek NK, dodatkowo upośledzając odpowiedź immunologiczną gospodarza. Niekontrolowane, masywne namnażanie wirusa prowadzi do dalszego podwyższenia poziomu cytokin prozapalnych; powoduje to m.in. zwiększenie adhezji komórek i zlepianie się monocytów, co może zaburzać przepływ krwi w małych naczyniach i wyzwolić kaskadę krzepnięcia [75]. TNF- α wraz z wolnymi rodnikami uwalnianymi z zainfekowanych komórek zmniejszają adhezję plakoglobiny do komórek śródbłonna naczyń. Plakoglobina jest białkiem spajającym śródbłonek i jej utrata powoduje rozluźnienie

połączeń pomiędzy komórkami, a w efekcie utratę szczelności śródbłonka (*permeabilization*) [19]. Supresja odpowiedzi immunologicznej ułatwia wirusowi kolonizację komórek śródbłonka, hepatocytów i innych tkanek. Niszczenie śródbłonka przez wirusa oraz przez cytokiny i wolne rodniki wydzielane z aktywowanych i lizowanych komórek jednojądrzastych krwi sprzyja wyzwoleniu kaskady krzepnięcia. Następuje aktywacja fibrynogenowych i fibrynolitycznych szlaków, co prowadzi do zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) [19, 21, 75]. Masowość powstających zakrzepów prowadzi do szybkiego wyczerpania czynników krzepnięcia i ich inhibitorów; jednocześnie uszkodzenie komórek wątroby przez wirusy w bardzo znaczącym stopniu upośledza ich produkcję. Kombinacja uszkodzenia śródbłonka, licznych zakrzepów i wyczerpania czynników krzepnięcia prowadzi do masywnych krwotoków i do wstrząsu krwotocznego oraz MOF (*multiple organ failure* – niewydolność wielonarządowa) i ostatecznie do śmierci [21].

Na podstawie badań ludzi zakażonych wirusem Ebola, jak również doświadczeń prowadzonych na małpach, stworzono profile odpowiedzi immunologicznej dla przypadków o przebiegu łagodnym i śmiertelnym [3, 21, 27, 43, 75, 80].

Łagodny przebieg choroby charakteryzuje się wystąpieniem w fazie objawowej silnej odpowiedzi immunologicznej. Miano przeciwciał IgG anty-EBOV wyraźnie narasta w trakcie trwania fazy objawowej i fazy zdrowienia (po ustąpieniu objawów). Faza objawowa charakteryzuje się od początku wysokimi stężeniami cytokin prozapalnych: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, GRO- α , MIP-1 α i MIP-2 β (czynniki mobilizujące układ immunologiczny); stężenia te obniżają się w trakcie zdrowienia do poziomu występującego u ludzi zdrowych. W końcowym stadium fazy objawowej w pewnym stopniu wzrastają, a następnie w fazie zdrowienia obniżają się stężenia IL-1RA, sIL-6R, sTNF-RI, sTNF-RII (cytokiny odpowiedzialne za kontrolę i ograniczanie reakcji zapalnej), jak również kortyzolu, NO₂- i neopteryny. Narasta również poziom INF- γ i INF- α . Zatrzymanie narastania, a następnie obniżenie stężenia tych czynników świadczy o skutecznej walce układu immunologicznego z wirusem. Dowodem jej skuteczności jest również ciągły wzrost miana przeciwciał IgG anty-EBOV, i spadek poziomu antygenów wirusowych.

Za dobre wskaźniki rokownicze choroby można uznać: wyjściowo wysoki poziom IL-1 β , IL-6 i TNF- α , który obniża się w trakcie trwania choroby; narastające miano przeciwciał IgG; niski i nie narastający poziom IL-10 i neopteryny [3].

Śmiertelny przebieg choroby charakteryzuje praktycznie brak odpowiedzi immunologicznej. Miano przeciwciał IgG anty-EBOV jest bardzo niskie przez cały czas trwania choroby. W konsekwencji wirus zakaża

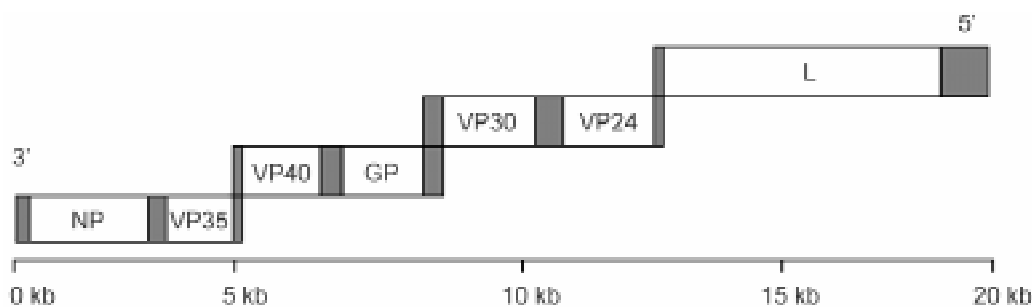
bez przeszkód kolejne komórki jednojądrzaste krwi, indukując wydzielanie dużych ilości cytokin: TNF- α , IL-6, IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII, IL-10. Stężenia tych cytokin wyraźnie narastają w trakcie trwania choroby, natomiast stężenia IL-1 β , MIP-1 α i MIP-2 β praktycznie w ogóle nie różnią się od tych występujących u ludzi zdrowych. Przed śmiercią narastają także znacząco stężenia NO₂- i neopteryny. Charakterystyczny jest również stały wzrost wiremii. Uszkodzenie śródbłonka naczyń przez TNF- α i uwalnianie wolne rodniki tlenowe oraz blokowanie reakcji zapalnej przez IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII i IL-10 ułatwia wirusowi kolonizację komórek śródbłonka i ich niszczenie. Uszkodzenie śródbłonka spowodowane przez namnażaniem się wirusa i działaniem cytokin jest jedną z przyczyn wystąpienia DIC i masywnych krwawień. Narastająca wiremia i rozpad zajętych przez wirusa tkanek (komórki wątroby, nerek, śledziony, gonad) w połączeniu ze wstrząsem krwotocznym prowadzą do śmierci.

Za złe wskaźniki rokownicze choroby można uznać: utrzymujące się niskie miano przeciwciał IgG; narastające stężenia IL-10, IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII i neopteryny.

W badaniach prowadzonych po epidemii w Kikwit w 1995 r. wyizolowano od ozdowieńców przeciwciała skierowane przeciwko białkom wirusowym: anty-NP, anty-GP, anty-sGP. Przeciwciała wiążące silnie sGP i NP nie neutralizowały wirusa, natomiast przeciwciała anty-GP neutralizowały go skutecznie [50]. W późniejszych badaniach na myszach zaobserwowano, że infekcyjność wirusa VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) zrekombinowanego białkiem GP EBOV wzrasta pod wpływem monoklonalnych przeciwciał anty-EBOV uzyskanych z immunizowanych myszy. Sugeruje to, że przeciwciała mogą zwiększać infekcyjność wirusa, prawdopodobnie ułatwiając wnikanie do wnętrza komórek jednojądrzastych krwi. Dodanie białka sGP zmniejszyło efekt wzmocnienia – prawdopodobnie część przeciwciał została związana przez sGP [78].

4. Budowa i funkcje białek wirusa

Genom wirusa Ebola tworzy jednoniciowa cząsteczka (–)RNA długości ok. 19 kpz. Zawiera ona 7 otwartych ramek odczytu, kodujących 7 białek strukturalnych wirionu: L (180 kDa), GP (125 kDa), NP (104 kDa), VP40 (40 kDa), VP35 (35 kDa), VP30 (30 kDa), VP24 (24 kDa) [17]. Układ genów jest następujący: 3'-*np-vp35-vp40-gp-vp30-vp24-l-5'*. Białko GP jest drugim produktem genu *gp*, powstającym w wyniku edycji ramki odczytu; podstawowym produktem genu *gp* jest niestrukturalne białko sGP [71, 72]. Miejsca terminacji transkrypcji są konserwowa-



Rys. 1. Schemat organizacji genomu wirusa Ebola

Zaznaczono położenie poszczególnych genów, a także kolorem szarym obszary niekodujące i zachodzenia genów na siebie

ne; wszystkie zawierają sekwencję 3'-UAAUU-5'. Po między genami występują 3 fragmenty niekodujące: między *np* a *vp35* (3'-GAU-5'), między *vp40* a *gp* (3'-AGC-5') oraz między *vp30* a *vp24* (142-nukleotydowy obszar). Genom wirusa zawiera trzy 18–20 nukleotydowe obszary zachodzenia genów na siebie: między *vp35* a *vp40*, między *gp* a *vp30* oraz między *vp24* a *l*. Odcinek liderowy RNA i 5'-koniec każdego z mRNA zawiera obszar tworzący wypętloną strukturę drugorzędową [71]. Rysunek 1 przedstawia schemat genomu wirusa Ebola.

Glikoproteinami nazywamy białka zawierające dołączony kowalencyjnie do określonego aminokwasu łańcuch cukrowy, jako część ich struktury cząsteczkowej. Przyłączenie oligomerów cukrowych może zachodzić przez wiązanie z resztą amidową asparaginy (N-glikozylacja) lub grupą hydroksylową seryny lub treoniny (O-glikozylacja). Wszystkie N-glikany zawierają charakterystyczny rdzeń: Mana1-6(Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcbAsn; asparagina pochodzi z fragmentu białka o ściśle konserwatywnej sekwencji (Asn-X-Ser/Thr). Mimo wspólnej sekwencji rdzeniowej N-glikany cechuje duża zmienność oligosacharydów przyłączonych do rdzenia. O-glikany, w przeciwieństwie do N-glikanów, nie posiadają wspólnego rdzenia i charakteryzują się większą zmiennością końca redukującego. N-glikozylacja zachodzi w szorstkim ER i aparacie Golgiego; O-glikozylacja tylko w aparacie Golgiego [57].

Glikoproteina (GP) jest najlepiej poznanym białkiem wirusa. Szereg prac podkreśla rolę tego białka: w rozpoznawaniu receptorów na powierzchni komórek docelowych [1, 13, 48, 49, 67]; w indukcji fuzji błony cytoplazmatycznej z otoczką wirionu i wnikanu wirusa [1, 13, 49, 67, 82]; także jako głównego determinantu cytotoxycznosci [84, 94] oraz roli zarówno powierzchniowego GP, jak i jego form i fragmentów wolnych (sGP, ssGP, D-peptyd, GP1 i DGP_{1,2}) w indukcji i hamowaniu odpowiedzi immunologicznej [14, 72, 85, 86]. Białko to wydaje się być najistotniejszym czynnikiem patogenezy i potencjalnie głównym celem działania leków.

Gen *gp* koduje jako główny produkt białko sGPer (364–367 aminokwasów, w zależności od szczepu wirusa) [72, 73, 86]. Gen *gp* zawiera po 295 kodonie miejsce edycyjne składające się z 7 uracyli [72, 81]. W wyniku kotranskrypcyjnej edycji w powstającym mRNA wirusowa polimeraza RNA może dodać jedną lub dwie adenozyny bądź też usunąć jedną adenozynę. W przypadku dodania jednej adenozyny ramka odczytu dalszej części genu ulega przesunięciu i ekspresji ulega drugi produkt genu *gp* – GPer (676 aminokwasów). W przypadku dodania dwóch adenozyn lub usunięcia jednej następuje przedwczesna terminacja transkrypcji i ekspresji ulega skrócona forma sGP – ssGP (297 aminokwasów) [85]. Edycji tej może również dokonać polimeraza faga T7 lub wirusa krowianki [81].

Białko sGP. Białko sGP (364–367 aminokwasów) nie posiada domeny transbłonowej na C-końcu, natomiast na N-końcu ma sekwencję sygnałną (32–33 aminokwasów), która jest odcinana podczas translacji przez błonę komórkową. Białko zawiera miejsce cięcia przez furynę (Arg-X/Lys-Arg-Arg), ok. 325 aminokwasu. Sekwencja sGP jest silnie konserwowana we wszystkich podtypach wirusa; zawiera aminokwasów zaangażowane w rozpoznawanie receptora. Bezpośredni produkt ekspresji genu *gp* to białko sGPer. Powstaje ono w rybosomach ER, gdzie dołączane są przez N-glikozylację łańcuchy oligomannozowe; w aparacie Golgiego białko jest w pełni N-glikozylowane (część N-końcowa – sGP) i O-glikozylowane (część C-końcowa – D-peptyd) do formy pre-sGP (41,8 kDa) oraz rozcinane przez furynę na sGP i D-peptyd i następnie wydzielane na zewnątrz komórki. Glikozylowane sGP ma masę 50–70 kDa, w zależności od stopnia glikozylacji [72, 82].

Białko sGP występuje w następujących formach [82, 85, 86]:

1. sGP – homodimer; podjednostki ułożone antyrównolegle, połączone dwoma mostkami dwusiarczkowymi (pomiędzy Cys53 pierwszej podjednostki i Cys306 drugiej, i drugi pomiędzy Cys306 pierwszej i Cys53 drugiej)

2. ssGP – monomer; mostki dwusiarczkowe między podjednostkami nie mogą powstać, gdyż forma skrócona nie posiada Cys306

3. D-peptyd – w formie O-glikozylowanej masa ok. 10–14 kDa; zawiera reszty kwasu sjałowego

Białko GP. Białko GP (676 aminokwasów) powstaje w wyniku kotranskrypcyjnej edycji genu *gp* [72, 81]. N-końcowe 295 aminokwasów jest identycznych z sGP, dalsza sekwencja białka jest już oczywiście inna. Białko posiada N-końcową sekwencję sygnałową (32–33 aminokwasów), która jest odcinana podczas translokacji przez błonę komórkową [82]. Domena N-końcowa zawiera ok. 150 aminokwasów, odgrywających rolę w rozpoznawaniu receptora i wnikaniu wirusa do komórki; 6 aminokwasów jest bardzo istotnych w pierwszych etapach wnikania, ale nie są one zaangażowane w tworzenie całej struktury białka; 3 nich są w obszarze 10 aminokwasów najprawdopodobniej tworzących kieszonkę katalityczną, odpowiedzialną za rozpoznanie receptora. Zidentyfikowano również ok. 30 aminokwasów istotnych w utrzymaniu właściwej konformacji białka [49]. Za częścią identyczną z białkiem sGP znajduje się rejon zmienny, tzw. mucynopodobny (*mucin-like domain*), bogaty w Thr i Ser, zawierający miejsca O-glikozylacji i część miejsc N-glikozylacji [34, 94]. Rejon ten sięga do aminokwasów 498–501, które tworzą kanoniczną sekwencję Arg-X/Lys-Arg-Arg, będącą miejscem cięcia dla furyny (cięcie po Arg501). Podtyp EBO-R ma w tym miejscu sekwencję Arg-Lys-Gln-Lys-Arg, która jest słabiej rozpoznawana przez furynę. Cięcie białka przez furynę powoduje powstawanie dwóch podjednostek – GP1 (140 kDa) i GP2 (26 kDa) [73, 82]. Cięcie to niejako „odslania” domenę mucynopodobną, odpowiedzialną za cytotoxyczność [82, 94]. W podtypie EBO-R zmiana w miejscu cięcia przez furynę skutkuje brakiem cytotoxyczności dla ludzkich komórek śródbłonna. Za miejscem cięcia furyny (czyli na N-końcu GP2) znajduje się 16 aminokwasów hydrofobowych, stanowiących tzw. *fusion peptide* (FP), odpowiedzialny za wnikanie w błonę infekowanej komórki i – po pH-zależnej zmianie konformacyjnej – destabilizację błony w kierunku fuzji z otoczką wirusa (wykazano, że najważniejszy jest obszar pomiędzy 25 a 35 aminokwasem GP2) [1, 49, 67]. Za FP zlokalizowana jest α -helisa z obszarem superskręconym, która zawiera jon chloru (przy Asn586). Ostatnie 3 skręty α -helisy oraz fragment znajdującej się dalej pętli (aminokwasów 584–610) stanowią rejon odpowiedzialny za immunosupresję (homologiczny do rejonów immunosupresyjnych u wirusów onkogennych). Wewnątrz tej pętli jest również krótki mostek dwusiarczkowy pomiędzy Cys601 i Cys608, natomiast Cys609 łączy się mostkiem dwusiarczkowym z Cys53 z podjednostki GP1. Dalej jest kolejny, krótszy obszar α -helisy, która z poprzed-

nią α -helisą tworzy strukturę „szpilki do włosów”. Na C-końcu (aminokwasów 651–676) zlokalizowana jest 23-aminokwasowa domena transbłonowa, kotwicząca białko w błonie cytoplazmatycznej. Prawdopodobnie od strony cytoplazmy pozostaje wolny 4-aminokwasowy C-końiec [48].

Niektóre prace donoszą, że w proteolityczną obróbkę GP zaangażowana jest nie tylko furyna, lub że taka obróbka w ogóle nie jest konieczna, a proces ten tylko w określonych typach komórek jest niezbędny do namnażania wirusa. Jednak silna konserwacja tego miejsca we wszystkich podtypach EBOV sugeruje, że na którymś z etapów cyklu życiowego wirusa cięcie to jest niezbędne [32, 90].

Jako bezpośredni produkt ekspresji edytowanego genu *gp* w rybosomach ER powstaje białko GPer, do którego przez N-glikozylację dołączane są łańcuchy oligomannozowe (110 kDa); następnie w aparacie Golgiego białko jest w pełni N-glikozylowane (część GP1 i GP2) i O-glikozylowane (tylko GP1) do formy preGP (160 kDa) i po cięciu przez furynę powstaje GP_{1,2}. Furyna występuje w części trans aparatu Golgiego, ale jest również wydzielana z komórki [32, 34, 73, 82].

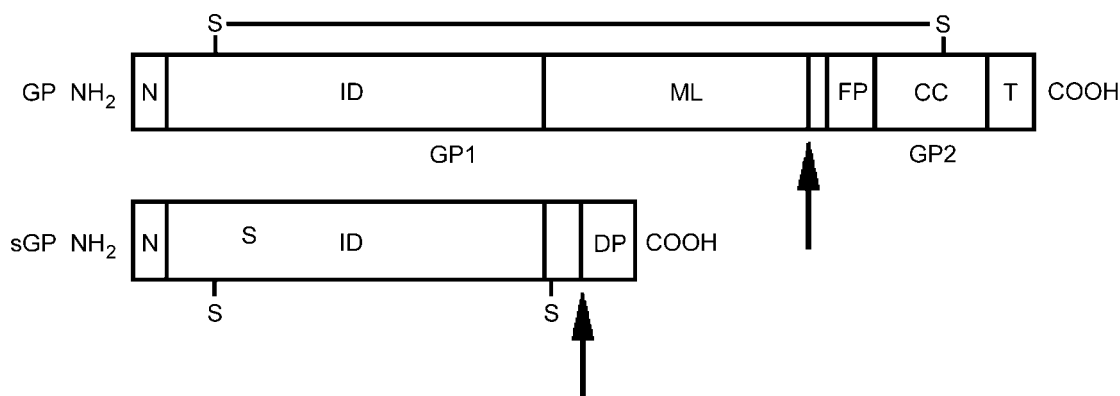
Białko GP występuje w następujących formach [14, 34]:

1. GP_{1,2} – białko zakotwiczone w błonie komórkowej (otoczce wirusa), zbudowane z podjednostek GP1 i GP2 połączonych mostkiem dwusiarczkowym; odpowiedzialne za rozpoznawanie receptora (obszar N-końcowy GP1), a także fuzję błon wirusa i komórki (N-końcowy obszar GP2); dodatkowo zawiera motyw immunosupresyjny (pętla i obszar pierwszej α -helisy GP2) i domenę kotwiczącą w błonie (C-końiec GP2); na powierzchni błony tworzy trimery (C-końcowe helisy GP2 na zewnątrz, N-końcowe wewnątrz tej struktury), FPs występujące na N-końcach GP2 położone są wewnątrz trimerów, niedaleko błony.
2. DGP_{1,2} – białko GP_{1,2} odcięte z powierzchni błony komórkowej przez metaloproteinazę TACE z rodziny ADAM; nie zawiera domeny transbłonowej, występuje w formie uwolnionej, poza tym jest identyczne z GP_{1,2}; prawdopodobnie to ono adsorbuje powstające przeciwciała, natomiast nie jest w stanie wywołać silnej aktywacji monocytów.
3. GP1 – uwolnione przez rozerwanie mostka dwusiarczkowego między podjednostkami GP1 i GP2.

Rysunek 2 przedstawia schematycznie organizację białek GP i sGP.

Białka matriksowe: VP40 i VP24

Główne białko matriksowe VP40 (326 aminokwasów) jest dość dobrze poznane: bierze udział



Rys. 2. Schemat organizacji białek GP i sGP

N – N-końcowa sekwencja sygnałna; ID – część identyczna białek GP i sGP; ML – domena *mucin-like*; FP – *fusion peptide*; CC – rejon zawierający superskręcony obszar z fragmentem immunosupresyjnym; T – domena transbłonowa; DP – D-peptyd; zaznaczono mostek dwusiarczkowy łączący Cys53 i Cys609 w białku GP, a także Cys53 i Cys306, tworzące mostki dwusiarczkowe z drugą podjednostką sGP; strzałkami zaznaczono miejsce cięcia przez furynę

w formowaniu wirionów potomnych i ich uwalnianiu z zakażonej komórki, łączy otoczkę wirionu z jego rdzeniem, ma również zdolność indukowania błony komórki do formowania VLP (*virus-like particles*) – cząstek podobnych morfologicznie do wirionów, natomiast nie zawierających genomowego RNA ani pozostałych białek wirusa; formowanie VLP jest bardziej wydajne, jeśli dodatkowo w komórce wytwarzane jest białko GP lub NP [26, 45, 60].

Białko VP40 ma charakterystyczną strukturę, zawierającą dwie wyraźnie wyodrębnione domeny, każda w formie „kanapki” zbudowanej z β -katek, pomiędzy którymi znajdują się α -helisy. Obie domeny połączone są długim odcinkiem nie posiadającym wyrażonej struktury drugorzędowej [23]. N-koniec białka tzw. *L-domain* (*late budding domain*), oddziałuje z białkami komórkowymi formując VLP i wiriony potomne [26, 45, 60]. *L-domain* zawiera charakterystyczne motywy: Pro-Thr-Ala-Pro i Pro-Pro-Glu-Tyr, które oddziałują z ligazą ubikwityny Nedd4 i białkiem Tsg101 (część systemu wydzielniczego komórki); obecność białka Tsg101 wykryto w VLP powstałych w wyniku działania VP40 [45]. Motywy te są homologiczne do motywów w białkach Gag retrowirusów i białkach M rabdowirusów, co może świadczyć o podobieństwie mechanizmów uwalniania cząstek wirusowych z komórki [26]. Jednak najnowsze badania z użyciem wirusa Ebola, z mutacją w obrębie VP40 wykazały, że *L-domain* nie jest niezbędna w cyklu życiowym [58].

Domena N-końcowa (aminokwasy 55–194) odpowiedzialna jest za oligomeryzację; natomiast domena C-końcowa, a szczególnie ostatnie 18 aminokwasów, zaangażowana jest w łączenie białka z błoną cytoplazmatyczną [60, 66, 74]; łączenie zachodzi w określonych obszarach, bogatych w cholesterol, tworzących tzw. „tratwy” (*rafts*). Gromadzenie się VP40 i GP w tych rejonach poprzedza formowanie wirionów lub VLP [60].

W monomerycznej formie białka VP40 domena N-końcowa jest położona blisko C-końcowej. Oligomeryzację białka poprzedzają dwie zmiany konformacyjne: odsunięcie N-końca, zawierającego *L-domain*, oraz domeny C-końcowej od domeny odpowiedzialnej za oligomeryzację. W trakcie oligomeryzacji powstają oktamer, mające formę pierścieni [23, 66]; każdy oktamer zbudowany jest z 4 homodimerów, których podjednostki ułożone są antyrównolegle. Połączenia pomiędzy poszczególnymi homodimerami w pierścieniowej strukturze oktameru stabilizowane są przez krótkie odcinki RNA, które niejako dopasowują się do przestrzennego ułożenia aminokwasów sąsiadujących homodimerów. Wiązanie z RNA jest specyficzne; rozpoznawana jest sekwencja 5'UGA3', a szczególnie zaangażowane są Phe125 i Arg134 [23, 29]. Domeny C-końcowe, jak również sam N-koniec (*L-domain*) lokują się najprawdopodobniej powyżej i poniżej płaszczyzny pierścienia utworzonego przez domeny N-końcowe [23].

Ponieważ oligomeryzacja wydaje się niezbędna do składania i uwalniania wirusów, ewentualny lek mógłby wiązać ze sobą domeny C- i N-końcowe formy monomerycznej, uniemożliwiając ich rozejście się, a – co za tym idzie – także oligomeryzację [74]. Co ciekawe w formowaniu VLP nie jest konieczna obecność RNA, natomiast utworzenie w pełni aktywnych cząstek wirusowych wymaga obecności Phe125 i Arg134 i wiązania RNA, co prawdopodobnie świadczy o dodatkowej, nieznannej jeszcze roli białka VP40 w cyklu życiowym wirusa [29].

Pomocnicze białko matriksowe VP24 (251 aminokwasów) jest słabo poznane; pełni funkcję strukturalną, łącząc otoczkę wirionu z nukleokapsydem; jest zdolne do oligomeryzacji i silnego wiązania się z błoną komórkową; jest także w stanie indukować powstawanie VLP, choć z mniejszą wydajnością niż VP40;

przypisuje mu się więc rolę przy składaniu i uwalnianiu wirusów potomnych [25, 46].

Badania wykazały, że białko VP24 nie jest glikozylowane, mimo że zawiera 3 potencjalne miejsca N-glikozylacji (aminokwasy 84, 185 i 246). W czasie eksperymentów w komórkach ssaków VP24 samoistnie tworzyło tetramery; nie można wykluczyć możliwości powstawania innych form oligomerycznych. W tworzenie oligomerów szczególnie zaangażowana jest N-końcowa część białka. W obrębie aminokwasów 172–175 znajduje się motyw Tyr-X-X-Leu, homologiczny do *L-domain* białka VP40 [25].

Białka nukleokapsydu: VP30, VP35, NP i L

Białko VP30 (288 aminokwasów) jest jednym z 4 białek tworzących nukleokapsyd. Pełni rolę aktywatora transkrypcji genów wirusa; jest zaangażowane we wczesne etapy cyklu życiowego [52, 53, 88]; w późniejszych etapach przyłącza się do kompleksów budowanych przez NP [52].

W N-końcowej części białka znajdują się miejsca fosforylacji (Ser 29–31, 42, 44, 46 i Thr 52); od stopnia fosforylacji zależy rodzaj wykazywanej przez białko aktywności. Słabo ufosforylowane silnie aktywuje transkrypcję, natomiast nie wiąże się z kompleksami NP.; częściowo ufosforylowane zdolne jest zarówno do aktywacji transkrypcji, jak i do wiązania się z kompleksami NP; w pełni ufosforylowane wiąże się z NP, ale nie jest w stanie aktywować transkrypcji. Stopień fosforylacji zależy od aktywności komórkowych fosfataz PP1 i PP2A [52].

VP30 ma zdolność wiązania jonów cynku. W proces ten zaangażowany jest rejon pomiędzy aminokwasami 68–95, zawierający 3 Cys i 1 His. Wiązanie cynku jest niezbędne do aktywacji transkrypcji, nie ma natomiast znaczenia przy łączeniu z kompleksami NP i składaniu wirionów [53].

W aktywacji transkrypcji przez VP30 bierze udział specyficzna struktura pętli w miejscu „start” pierwszej z genów wirusa, hamująca prawdopodobnie przesuwanie się wirusowej polimerazy RNA po nici genomowego RNA; obecność białka VP30 znosi ten efekt i umożliwia transkrypcję [88].

Białko VP35 (340 aminokwasów) jest składnikiem nukleokapsydu; blokuje również wydzielanie interferonów typu I przez zainfekowane komórki – prawdopodobnie przez zablokowanie indukcji promotora IFN- β spowodowanej obecnością dwuniciowego RNA oraz przez zablokowanie fosforylacji IRF-3 (*IFN regulatory factor 3*), odpowiedzialnego za aktywację promotora IFN- α w trakcie infekcji wirusowej – a w efekcie hamuje odpowiedź immunologiczną [6, 7].

Białko VP35 tworzy także w połączeniu z białkami L i NP funkcjonalną RNA-zależną polimerazę RNA [55]. Do zajęcia transkrypcji, replikacji i two-

żenia nukleokapsydu konieczna jest obecność białek VP35, NP i L. VP35 jest odpowiednikiem białka P u innych (–)RNA wirusów [36, 54]

Białko L (2212 aminokwasów) wraz z białkami VP35 i NP tworzy kompleks aktywny transkrypcyjnie – RNA-zależną polimerazę RNA, stanowiąc jego część katalityczną [55]. Analiza sekwencji genu kodującego białko L, wykazała duże podobieństwa do białek *Paramyxoviridae* i innych (–)RNA wirusów. Ma ono wysoką zawartość leucyny i izoleucyny (17,9%) i wysoki ładunek całociowy w obojętnym pH (+57). Zawiera 3 charakterystyczne dla polimeraz RNA z wirusów (–)RNA motywy aminokwasowe: motyw A, wiążący RNA (aminokwasy 553–571), motyw B, rozpoznający sekwencję RNA i/lub tworzący wiązania fosfodiestrowe (aminokwasy 738–744) oraz motyw C, wiążący ATP (aminokwasy 1815–1841). Posiada również 2 Cys (1351–1352), stabilizujące przestrzenną strukturę białka, wysoce konserwowane w wszystkich wirusowych polimerazach RNA [83].

Białko NP (739 aminokwasów) jest głównym składnikiem nukleokapsydu. Jego N-końcowa część jest hydrofobowa, natomiast część C-końcowa ma właściwości hydrofilowe i kwasowe [70].

Białko NP wirusa Marburg, blisko spokrewnionego z Ebolą, wykazuje samoistną zdolność do agregacji w zakażonych komórkach, bez udziału innych białek wirusowych, tworząc TLS (*tubule-like structures*), widoczne w mikroskopie elektronowym, zlokalizowane w pobliżu błon szorstkiego ER. TLS mają w przekroju symetrię heksagonalną i morfologicznie są bardzo zbliżone do nukleokapsydów, powstających w komórkach zainfekowanych wirusem Marburg. Zdolność białek strukturalnych nukleokapsydu do samoistnego formowania struktur morfologicznie podobnych do nukleokapsydu występuje również w rodzinach *Rhabdoviridae* i *Paramyxoviridae* [36].

5. Diagnostyka gorączki krwotocznej Ebola

Znanych jest kilka metod wykrywania wirusa Ebolą u osób zakażonych oraz u zmarłych z powodu gorączki krwotocznej.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM – *Transmission Electron Microscopy*) – metoda pozwalająca na wykrycie cząstek wirusa we krwi i płynach ustrojowych pacjenta oraz nukleokapsydów powstających w wyniku namnażania się wirusa w cytoplazmie zainfekowanych komórek. Wadą tej metody jest konieczność posiadania bardzo dobrze wyposażonego laboratorium, co czyni ją właściwie niedostępną w krajach afrykańskich, miejscu występowania wirusa [38].

Izolacja wirusa z tkanek osób chorych i zmarłych, a następnie jego **hodowla** i **serotypowanie** – nie jest

szeroko stosowana, gdyż jest niebezpieczna i wymaga laboratoriów 4 stopnia bezpieczeństwa [37, 38].

Immunohistochemiczny test skóry (IHC – *Immunohistochemical Assay*) – wykrywanie antygenów wirusa w skórze osób zmarłych przy użyciu monoklonalnych przeciwciał; skóra do badań jest konserwowana w formalinie. Metoda czuła, specyficzna i bezpieczna [95].

Testy immunosorbcyjne (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – łatwe w stosowaniu, czułe testami wykrywające antygeny wirusowe lub przeciwciała anty-EBOV we krwi osób zakażonych i ozdrowieńców (również w przypadkach bezobjawowych) [24, 37–39, 47, 59, 61, 68]. Stosuje się 3 typy testów ELISA:

- ELISA wykrywające antygeny wirusa – wykrywa antygeny wirusa Ebola przez wiązanie ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi. Produkcja przeciwciał wymaga uzyskania białek wirusa, co możliwe jest jedynie w laboratoriach 4 stopnia bezpieczeństwa. Najczęściej są to białka NP lub GP [37, 47, 59, 68].
- ELISA wykrywające IgG – wykrywa przeciwciała anty-EBOV klasy IgG przy użyciu rekombinowanych białek wirusa Ebola. Tu również używa się najczęściej białek NP lub GP [61, 68]. Zaletą tej metody jest użycie białek rekombinowanych, co nie wymaga laboratoriów 4 stopnia bezpieczeństwa. Jej ograniczeniem jest częste zjawisko braku wystarczającej produkcji przeciwciał IgG (w ciężkich przypadkach), jak również to, że przeciwciała pojawiają się dopiero w 8–10 dniu od zakażenia. Wszyscy ozdrowieńcy i osoby, które przeszły infekcje bezobjawowe, posiadają przeciwciała IgG anty-EBOV, metoda jest więc skuteczna przy analizie seropozytywności populacji i w poszukiwaniach rezerwuaru wirusa [38, 39, 61].
- ELISA wykrywające IgM – metoda zbliżona do opisanej powyżej; wykrywa przeciwciała anty-EBOV klasy IgM. Pojawiają się one ok. 6 dnia od infekcji i są wykrywalne znacznie krócej niż IgG. Metoda dość skuteczna w szybkiej diagnostyce; ograniczeniem może być brak przeciwciał przy niedostatecznej odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu [38, 39, 61].

Pośredni immunofluorescencyjny test wykrywający przeciwciała (IFAT – *Indirect Immunofluorescence Antibody Test*) – metoda mniej czuła niż ELISA; przeciwciała IgG anty-EBOV obecne w próbce krwi chorego wiązane są przez komórki linii HeLa i Vero ekspresujące rekombinowane antygeny wirusa Ebola (białko NP). Do związanych przeciwciał anty-EBOV przyłączane są w kolejnym etapie drugorzędowe przeciwciała anty-IgG, wyznakowane fluorescencyjnie;

następnie hodowla komórkowa badana jest w mikroskopie fluorescencyjnym. Brak odpowiedzi immunologicznej w przypadku ciężkiego przebiegu choroby obniża czułość tej metody [31, 35, 69].

RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) – metoda najbardziej czuła; wykrywa RNA wirusa w komórkach jednojądrzastych krwi, także w przypadkach bezobjawowych. Potwierdza 100% dodatnich wyników metody ELISA wykrywającej antygeny i 91% ELISA wykrywającej IgM. Kombinacja tych 3 metod daje 97% czułości w wykrywaniu wirusa. Dodatkowo wyniki RT-PCR udaje się w 83% potwierdzić przy użyciu metody ELISA wykrywającej antygeny i w 67% przy użyciu ELISA wykrywającej IgM [42].

Modyfikacją metody RT-PCR jest określenie podtypu wirusa z zastosowaniem jako sondy **oligonukleotydów znakowanych fluorochromami** na 5'-końcu. Stosuje się mieszaninę 2 różnych oligonukleotydów, z których jeden jest komplementarny do EBO-Z, natomiast drugi do EBO-S. Każdy z oligonukleotydów ma na 5'-końcu kowalencyjnie dołączony związek blokujący fluoryzację barwnika reporterowego, tzw. wygaszacz (ang. *quencher*) TAMRA, natomiast na 3'-końcu fluorochrom reporterowy: FAM (oligonukleotyd dla EBO-Z) lub VIC (oligonukleotyd dla EBO-S). Fluorochromy FAM i VIC różnią się długością emitowanej fali świetlnej. Gdy sonda jest w postaci wolnej, wygaszacz jest blisko do fluorochromu, hamując emisję światła. W czasie reakcji PCR sondy łączą się specyficznie z cDNA (matrycą); hybrydyzacji ulega tylko sonda specyficzna dla danego podtypu. Termostabilna polimeraza DNA (wykorzystując swoją aktywność nukleolityczną) degraduje zhybrydyzowany oligonukleotyd, dzięki czemu fluorochrom może oddalić się od wygaszacza i wyemitować sygnał świetlny. Tym samym można określić podtyp wirusa już w trakcie reakcji PCR (*real-time PCR*). Zaletą tej metody jest czułość i szybkość [15, 22].

Western Blot – używana jako potwierdzenie innych metod; wykrywa antygeny wirusa oraz przeciwciała IgG i IgM anty-EBOV [8, 24, 41].

Test radioimmunoprecypitacyjny (RIPA – *Radioimmunoprecipitation Assay*) – do wykrycia przeciwciał anty-EBOV wykorzystuje znakowany radioaktywnie antygen wirusowy. Kompleksy przeciwciała-antygeny są strącane przy użyciu białka *A Staphylococcus*, a następnie analizowane przez elektroforezę i autoradiografię [65].

6. Leczenie

Do dziś nie jest znana żadna skuteczna metoda leczenia przyczynowego gorączki krwotocznej Ebola. W leczeniu objawowym i wyrównawczym stosuje się

środku przeciwbólowe, różne metody obniżenia gorączki, a przy wystąpieniu skazy krwotocznej uzupełnianie strat płynów, elektrolitów, krwi i osoczowych czynników krzepnięcia. W przypadkach o ciężkim przebiegu nie jest to skuteczne, może jedynie o kilka dni opóźnić śmierć chorego [5, 11, 38, 91, 96, 97]. W kilku przypadkach podejmowano próby zastosowania metod eksperymentalnych stosowano:

- **Osocze ozdrowieńców** (zawiera przeciwciała anty-EBOV) – w 1995 r. w czasie epidemii w Kikwit w Zairze przetoczono osocze 8 chorym z których 7 przeżyło. Biorąc pod uwagę 81% śmiertelność w czasie tej epidemii, wynik był bardzo obiecujący [56].
- **Ludzki interferon α -2b w połączeniu z IgG z osocza hiperimmunizowanych koni, kóz lub owiec** – podane 4 rosyjskim pracownikom laboratoryjnym, narażonym na ekspozycję na wirusa Ebola. Wszyscy przeżyli, co może świadczyć o wysokiej skuteczności. Podobnie jednak jak w poprzednim przypadku, trudno mówić o skuteczności metody, gdy rezultaty uzyskano na tak niewielkiej liczbie chorych. Metodę tę testowano również na świnkach morskich, myszach i małpach; okazała się skuteczna jedynie wobec świnek morskich i myszy [33, 40].

Prowadzone są również badania nad zastosowaniem leków:

- **Cyjanowiryna-N (CV-N)** – białko izolowane z sinic, odkryte w ramach programu poszukiwania naturalnych leków przeciwko wirusowi HIV; blokuje przyłączone do białka GP_{1,2} przez N-glikozylację oligosacharydy, uniemożliwiając fuzję osłonki wirusa z błoną cytoplazmatyczną [4].
- **Analogi nukleozydowe** hamujące aktywność hydrolazy S-adenozyl-L-homocysteiny (AdoHcy), blokujące w sposób pośredni metylację struktury cap na końcu 5' wirusowych cząsteczek mRNA – próby przeprowadzone na myszach dały obiecujące wyniki [10, 30].

7. Eksperymentalne metody uodparniania czynnego

W chwili obecnej nie jest dostępna żadna skuteczna szczepionka dla ludzi, jednak szereg eksperymentów na zwierzętach pozwala przypuszczać, że jej wyprodukowanie i dopuszczenie do użytku to kwestia najbliższych lat. W badaniach testowano kilka typów szczepionek:

- **Szczepionki DNA** – nagie DNA zawierające geny kodujące białka wirusa: NP, GP, sGP (sklonowane w plazmidach). DNA był podawany domięśniowo lub przy użyciu strzelby genowej.

Obiecujące wyniki otrzymano na różnych modelach zwierzęcych [20, 62, 76, 77, 79, 92].

- **Różne wirusy zawierające geny kodujące białka EBOV** – stosowano m.in. adenowirusy, atenuowany wirus końskiego zapalenia mózgu, wirus krowianki. Dla uzyskania wysokiej skuteczności łączono tę metodę z uodparnianiem przez podanie szczepionki DNA [20, 76, 77].
- **Szczepionki podjednostkowe** – zawierające wyizolowane białka wirusa Ebola. Odpowiedź immunologiczną wywoływały białka VP24, VP30, VP35 i VP40 [89].
- **Inaktywowany wirus Ebola** – inaktywacja formaliną; w nowszych pracach podawano liposomy zawierające wirusy inaktywowane przez napromieniowanie. Duże znaczenie w powstaniu trwałej odporności miała obecność lipidu A w liposomach [51, 63, 64].

Najbardziej obiecujące efekty osiągnięto przy zastosowaniu kilku metod uodparniania jednocześnie. Podanie małpom lub myszom szczepionki DNA zawierającej geny kodujące białko NP i trzy rodzaje GP w kilku powtórzeniach i dodatkowa immunizacja adenowirusem zawierającym gen kodujący białko GP dało bardzo dobre wyniki. Jest to prawdopodobnie droga do skonstruowania szczepionki skutecznej i bezpiecznej dla ludzi. Zaletą szczepionek DNA jest ich bezpieczeństwo, a także łatwość przechowywania i trwałość, co ma szczególne znaczenie w państwach afrykańskich, miejscu występowania wirusa Ebola [76, 77].

8. Podsumowanie

W 1976 r. w środkowej Afryce wystąpiły dwie epidemie nieznanego gorączki krwotocznej. Charakteryzowała je ogromna śmiertelność, sięgająca 90%. Wyizolowany wirus nazwano Ebola i zaklasyfikowano jako nowego przedstawiciela rodziny *Filoviridae*. W latach późniejszych zanotowano jeszcze kilka dużych epidemii. Niebezpieczeństwo wynikające z możliwości przypadkowego zawleczenia wirusa do krajów rozwiniętych lub użycia go jako narzędzia ataku biologicznego sprawia, że w wielu ośrodkach na świecie prowadzone są badania nad mechanizmami patogenezы.

Prace te przybliżyły budowę i funkcje białek wirusa; szczególnie dobrze poznano białka GP i VP40. Ich istotna rola w procesie patogenezы i w cyklu życiowym wirusa czyni je pierwszoplanowymi celami działania potencjalnych leków. Poszerzono również wiedzę o immunologicznym podłożu choroby, choć nadal wiele aspektów pozostaje niewyjaśnionych. Pozwoliło to na opracowanie skutecznych metod diagnostycznych, a także na stworzenie leków i szczepionek, będących na razie w fazie prób na zwierzętach.

Niniejsza praca stanowi próbę podsumowania aktualnej wiedzy dotyczącej immunologicznego i molekularnego podłoża gorączki krwotocznej Ebola, diagnostyki oraz prób leczenia i uodparniania.

Piśmiennictwo

- Adam B., Lins L., Stroobant V., Thomas A., Brasseur R.: Distribution of Hydrophobic Residues Is Crucial for the Fusogenic Properties of the Ebola Virus GP2 Fusion Peptide. *J. Virol.* **78**, 2131–2136 (2004)
- Alvarez C.P., Lasala F., Carrillo J., Muñoz O., Corbí A.L., Delgado R.: C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J. Virol.* **76**, 6841–6844 (2002)
- Baize S., Leroy E.M., Georges A.J., Georges-Courbot M.C., Capron M., Bedjabaga I., Lansoud-Soukate J., Mavoungou E.: Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 163–168 (2002)
- Barrientos L.G., O'Keefe B.R., Bray M., Sanchez A., Gronenborn A.M., Boyd M.R.: Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1,2 and inhibits infectivity of Ebola virus. *Antiviral. Res.* **58**, 47–56 (2003)
- Baskerville A., Bowen E.T., Platt G.S., McArdell L.B., Simpson D.I.: The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys. *J. Pathol.* **125**, 131–138 (1978)
- Basler C.F., Wang X., Mühlberger E., Volchkov V., Paragas J., Klenk H.D., García-Sastre A., Palese P.: The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12289–12294 (2000)
- Basler C.F., Mikulasova A., Martinez-Sobrido L., Paragas J., Mühlberger E., Bray M., Klenk H.D., Palese P., Garcia-Sastre A.: The Ebola Virus VP35 Protein Inhibits Activation of Interferon Regulatory Factor 3. *J. Virol.* **77**, 7945–7956 (2003)
- Becker S., Feldmann H., Will C., Slenczka W.: Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, **181**, 43–55 (1992)
- Bowen E.T., Platt G.S., Lloyd G., Raymond R.T., Simpson D.I.: A comparative study of strains of Ebola virus isolated from southern Sudan and northern Zaire in 1976. *J. Med. Virol.* **6**, 129–138 (1980)
- Bray M., Driscoll J., Huggins J.W.: Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral. Res.* **45**, 135–147 (2000)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Ebola hemorrhagic fever Uganda, August 2000–January 2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **9**, 73–77 (2001)
- Chan S.Y., Empig C.J., Welte F.J., Speck R.F., Schmaljohn A., Kreisberg J.F., Goldsmith M.A.: Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell*, **13**, 117–126 (2001)
- Chan S.Y., Speck R.F., Ma M.C., Goldsmith M.A.: Distinct Mechanisms of Entry by Envelope Glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) Viruses. *J. Virol.* **74**, 4933–4937 (2000)
- Dolnik O., Volchkova V., Garten W., Carbonnelle C., Becker S., Kahnt J., Stroher U., Klenk H.D., Volchkov V.: Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J.* **19**, 2175–2184 (2004)
- Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., Günther S.: Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2323–2330 (2002)
- Ebola virus infection in imported primates – United States. *Can. Dis. Wkly. Rep.* **27**, 17–18 (1990)
- Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B.: Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*, **147**, 169–76 (1985)
- Ellis D.S., Bowen E.T., Simpson D.I., Stamford S.: Ebola virus: a comparison, at ultrastructural level, of the behaviour of the Sudan and Zaire strains in monkeys. *Br. J. Exp. Pathol.* **59**, 584–593 (1978)
- Feldmann H., Bugany H., Mahner F., Klenk H.D., Drenckhahn D., Schnittler H.J.: Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Virol.* **70**, 2208–2214 (1996)
- Geisbert T.W., Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jahrling P.B.: Evaluation in Nonhuman Primates of Vaccines against Ebola Virus. *Infect. Dis.* **8**, 503–507 (2002)
- Geisbert T.W., Hensley L.E., Larsen T., Young H.A., Reed D.S., Geisbert J.B., Scott D.P., Kagan E., Jahrling P.B., Davis K.J.: Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in *Cynomolgus* Macaques. *Amer. J. Pathology*, **163**, 2347–2370 (2003)
- Gibb T.R., Norwood Jr. D.A., Woollen N., Henchal E.A.: Development and Evaluation of a Fluorogenic 5' Nuclease Assay To Detect and Differentiate between Ebola Virus Subtypes Zaire and Sudan. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4125–4130 (2001)
- Gomis-Ruth F.X., Dessen A., Timmins J., Bracher A., Kolesnikowa L., Becker S., Klenk H.D., Weissenhorn W.: The Matrix Protein VP40 from Ebola Virus Octamerizes into Pore-like Structures with Specific RNA Binding Properties. *Structure*, **11**, 423–433 (2003)
- Groen J., van den Hoogen B.G., Burghoorn-Maas C.P., Fooks A.R., Burton J., Clegg C.J., Zeller H., Osterhaus A.D.: Serological reactivity of baculovirus-expressed Ebola virus VP35 and nucleoproteins. *Microbes Infect.* **5**, 379–385 (2003)
- Han Z., Boshra H., Sunyer J.O., Zwiers S.H., Paragas J., Harty R.N.: Biochemical and Functional Characterization of the Ebola Virus VP24 Protein: Implications for a Role in Virus Assembly and Budding. *J. Virol.* **77**, 1793–1800 (2003)
- Harty R.N., Brown M.E., Wang G., Huibregtse J., Hayes F.P.: A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13871–13876 (2000)
- Hensley L.E., Young H.A., Jahrling P.B., Geisbert T.W.: Pro-inflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol. Lett.* **80**, 169–179 (2002)
- Heymann D.L., Weisfeld J.S., Webb P.A., Johnson K.M., Cairns T., Berquist H.: Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977–1978. *J. Infect. Dis.* **142**, 372–376 (1980)
- Hoenen T., Volchkov V., Kolesnikova L., Mittler E., Timmins J., Ottmann M., Reynard O., Becker S., Weissenhorn W.: VP40 Octamers Are Essential for Ebola Virus Replication. *J. Virol.* **79**, 1898–1905 (2005)
- Huggins J. i wsp.: Antiviral Drug Therapy of Filovirus Infections: *S*-adenosylhomocysteine Hydrolase Inhibitors Inhibit Ebola Virus in Vitro and in a Lethal Mouse Model. *J. Infect. Dis.* **179**, 240–247 (1999)

31. Ikegami T., Saijo M., Niikura M., Miranda M.E.G., Calaor A.B., Hernandez M., Manalo D.L., Kurane I., Yoshikawa Y., Morikawa S.: Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol. Immunol.* **46**, 633–638 (2002)
32. Ito H., Watanabe S., Takada A., Kawaoka Y.: Ebola Virus Glycoprotein: Proteolytic Processing, Acylation, Cell Tropism, and Detection of Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* **75**, 1576–1580 (2001)
33. Jahrling P.B., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Swearingen J.R., Bray M., Jaax N.K., Huggins J.W., Le Duc J.W., Peters C.J.: Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections. *J. Infect. Dis.* **179**, 224–234 (1999)
34. Jeffers S.A., Sanders D.A., Sanchez A.: Covalent Modifications of the Ebola Virus Glycoprotein. *J. Virol.* **76**, 12463–12472 (2002)
35. Johnson K.M., Elliott L.H., Heymann D.L.: Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigens and use in human serosurveys. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 527–529 (1981)
36. Kolesnikova L., Muhlberger E., Ryabchikova E., Becker S.: Ultrastructural Organization of Recombinant Marburg Virus Nucleoprotein: Comparison with Marburg Virus Inclusions. *J. Virol.* **74**, 3899–3904 (2000)
37. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Jahrling P.B., Johnson E., Dalgard D.W., Peters C.J.: Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 947–950 (1992)
38. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Williams A.J., Bressler D.S., Martin M.L., Swanepoel R., Burt F.J., Leman P.A., Khan A.S., Rowe A.K., Mukunu R., Sanchez A., Peters C.J.: Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* **179**, 177–87 (1999)
39. Ksiazek T.G., West C.P., Rollin P.E., Jahrling P.B., Peters C.J.: ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Infect. Dis.* **179**, 192–198 (1999)
40. Kudoyarova-Zubavichene N.M., Sergeev N.N., Chepurnov A.A., Netesov S.V.: Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infections. *J. Infect. Dis.* **179**, 218–223 (1999)
41. Leroy E.M., Baize S., Volchkov V.E., Fisher-Hoch S.P., Georges-Courbot M.C., Lansoud-Soukate J., Capron M., Debre P., McCormick J.B., Georges A.J.: Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet*, **355**, 2210–2215.
42. Leroy E.M., Baize S., Lu C.Y., McCormick J.B., Georges A.J., Georges-Courbot M.C., Lansoud-Soukate J., Fisher-Hoch S.P.: Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *J. Med. Virol.* **60**, 463–467 (2000)
43. Leroy E.M., Baize S., Debre P., Lansoud-Soukate J., Mavoungou E.: Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin. Exp. Immunol.* **124**, 453–460 (2001)
44. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Robert Swanepoel R.: Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, **438**, 575–576 (2005)
45. Licata J.M., Simpson-Holley M., Wright N.T., Han Z., Paragas J., Harty R.N.: Overlapping Motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola Virus VP40 Protein Function Independently as Late Budding Domains: Involvement of Host Proteins TSG101 and VPS-4. *J. Virol.* **77**, 1812–1819 (2003)
46. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N.: Contribution of Ebola Virus Glycoprotein, Nucleoprotein, and VP24 to Budding of VP40 Virus-Like Particles. *J. Virol.* **78**, 7344–7351 (2004)
47. Lucht A., Grunow R., Otterbein C., Moller P., Feldmann H., Becker S.: Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against the envelope glycoprotein GP of Ebola virus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **193**, 181–187 (2004)
48. Malashkevich V.N., Schneider B.J., McNally M.L., Milhollen M.A., Pang J.X., Kim P.S.: Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2662–2667 (1999)
49. Manicassamy B., Wang J., Jiang H., Rong L.: Comprehensive Analysis of Ebola Virus GP1 in Viral Entry. *J. Virol.* **79**, 4793–4805 (2005)
50. Maruyama T., Rodriguez L.L., Jahrling P.B., Sanchez A., Khan A.S., Nichol S.T., Peters C.J., Parren P.W., Burton D.R.: Ebola Virus Can Be Effectively Neutralized by Antibody Produced in Natural Human Infection. *J. Virol.* **73**, 6024–6030 (1999)
51. Mikhailov V.V., Borisevich I.V., Chernikova N.K., Potryvaeva N.V., Krasnianskii V.P.: The evaluation in hamadryas baboons of the possibility for the specific prevention of Ebola fever. *Vopr. Virusol.* **39**, 82–84 (1994)
52. Modrof J., Muhlberger E., Klenk H.D., Becker S.: Phosphorylation of VP30 Impairs Ebola Virus Transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 33099–33104 (2002)
53. Modrof J., Becker S., Muhlberger E.: Ebola Virus Transcription Activator VP30 Is a Zinc-Binding Protein. *J. Virol.* **77**, 3334–3338 (2003)
54. Muhlberger E., Lotfering B., Klenk H.D., Becker S.: Three of the Four Nucleocapsid Proteins of Marburg Virus, NP, VP35, and L, Are Sufficient To Mediate Replication and Transcription of Marburg Virus-Specific Monocistronic Minigenomes. *J. Virol.* **72**, 8756–8764 (1998)
55. Muhlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H.D., Becker S.: Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems. *J. Virol.* **73**, 2333–2342 (1999)
56. Mupapa K., Massamba M., Kibadi K., Kuvula K., Bwaka A., Kipasa M., Colebunders R., Muyembe-Tamfum J.J.: Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee. *J. Infect. Dis.* **179**, 18–23 (1999)
57. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1998
58. Neumann G., Ebihara H., Takada A., Noda T., Kobasa D., Jasenosky L.D., Watanabe S., Kim J.H., Feldmann H., Kawaoka Y.: Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol.* **79**, 10300–10307 (2005)
59. Niikura M., Ikegami T., Saijo M., Kurane I., Miranda M.E., Morikawa S.: Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3267–3271 (2001)
60. Panchal R.G., Ruthel G., Kenny T.A., Kallstrom G.H., Lane D., Badie S.S., Li L., Bavari S., Aman M.J.: *In vivo* oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15936–15941 (2003)

61. Prehaud C., Hellebrand E., Coudrier D., Volchkov V.E., Volchkova V.A., Feldmann H., Le Guenno B., Bouloy M.: Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J. Gen. Virol.* **79**, 2565–2572 (1998)
62. Pushko P., Bray M., Ludwig G.V., Parker M., Schmaljohn A., Sanchez A., Jahrling P.B., Smith J.F.: Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, **19**, 142–153 (2000)
63. Rao M., Matyas G.R., Grieder F., Anderson K., Jahrling P.B., Alving C.R.: Cytotoxic T lymphocytes to Ebola Zaire virus are induced in mice by immunization with liposomes containing lipid A. *Vaccine*, **17**, 2991–2998 (1999)
64. Rao M., Bray M., Alving C.R., Jahrling P., Matyas G.R.: Induction of Immune Responses in Mice and Monkeys to Ebola Virus after Immunization with Liposome-Encapsulated Irradiated Ebola Virus: Protection in Mice Requires CD4⁺ T Cells. *J. Virol.* **76**, 9176–9185 (2002)
65. Richman D.D., Cleveland P.H., McCormick J.B., Johnson K.M.: Antigenic analysis of strains of Ebola virus: identification of two Ebola virus serotypes. *J. Infect. Dis.* **147**, 268–271 (1983)
66. Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D., Weissenhorn W.: Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* **300**, 103–112 (2000)
67. Ruiz-Arguello M.B., Goni F.M., Pereira F.B., Nieva J.L.: Phosphatidylinositol-Dependent Membrane Fusion Induced by a Putative Fusogenic Sequence of Ebola Virus. *J. Virol.* **72**, 1775–1781 (1998)
68. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Ksiazek T.G., Meyer R.F., Peters C.J., Kurane I.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to Ebola and Marburg Viruses Using Recombinant Nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1–7 (2001)
69. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Kurane I.: Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 776–778 (2001)
70. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P., McCormick J.B., Auperin D.D.: The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and in vitro expression. *Virology*, **170**, 81–91 (1989)
71. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P., Auperin D.D.: Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res.* **29**, 215–240 (1993)
72. Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W.J., Peters C.J., Nichol S.T.: The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3602–3607 (1996)
73. Sanchez A., Yang Z.Y., Xu L., Nabel G.J., Crews T., Peters C.J.: Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *J. Virol.* **72**, 6442–6447 (1998)
74. Scianimanico S., Schoehn G., Timmins J., Ruigrok R.H., Klenk H.D., Weissenhorn W.: Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *EMBO J.* **19**, 6732–6741 (2000)
75. Ströher U., West E., Bugany H., Klenk H.D., Schnittler H.J., Feldmann H.: Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *J. Virol.* **75**, 11025–11033 (2001)
76. Sullivan N.J., Sanchez A., Rollin P.E., Yang Z.Y., Nabel G.J.: Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, **408**, 605–609 (2000)
77. Sullivan N.J., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Xu L., Yang Z., Roederer M., Koup R.A., Jahrling P.B., Nabel G.J.: Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, **424**, 681–684 (2003)
78. Takada A., Watanabe S., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y.: Infectivity-Enhancing Antibodies to Ebola Virus Glycoprotein. *J. Virol.* **75**, 2324–2330 (2001)
79. Vanderzanden L., Bray M., Fuller D., Roberts T., Custer D., Spik K., Jahrling P., Huggins J., Schmaljohn A., Schmaljohn C.: DNA Vaccines Expressing either the GP or NP Genes of Ebola Virus Protect Mice from Lethal Challenge. *Virology*, **246**, 134–144 (1998)
80. Villinger F., Rollin P.E., Brar S.S., Chikkala N.F., Winter J., Sundstrom J.B., Zaki S.R., Swanepoel R., Ansari A.A., Peters C.J.: Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* **179**, 188–191 (1999)
81. Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D.: GP mRNA of Ebola Virus Is Edited by the Ebola Virus Polymerase and by T7 and Vaccinia Virus Polymerases. *Virology*, **214**, 421–430 (1995)
82. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D.: Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5762–5767 (1998)
83. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Chepurinov A.A., Blinov V.M., Dolnik O., Netesov S.V., Feldmann H.: Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.* **80**, 355–362 (1999)
84. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Muhlberger E., Kolesnikova L.V., Weik M., Dolnik O., Klenk H.D.: Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science*, **291**, 1965–1969 (2001)
85. Volchkova V.A., Feldmann H., Klenk H.D., Volchkov V.E.: The Nonstructural Small Glycoprotein sGP of Ebola Virus Is Secreted as an Antiparallel-Orientated Homodimer. *Virology*, **250**, 408–414 (1998)
86. Volchkova V.A., Klenk H.D., Volchkov V.E.: Delta-Peptide Is the Carboxy-Terminal Cleavage Fragment of the Nonstructural Small Glycoprotein sGP of Ebola Virus. *Virology*, **265**, 164–171 (1999)
87. Wahl-Jensen V., Kurz S.K., Hazelton P.R., Schnittler H.J., Ströher U., Burton D.R., Feldmann H.: Role of Ebola Virus Secreted Glycoproteins and Virus-Like Particles in Activation of Human Macrophages. *J. Virol.* **79**, 2413–2419 (2005)
88. Weik M., Modrof J., Klenk H.D., Becker S., Muhlberger E.: Ebola Virus VP30-Mediated Transcription Is Regulated by RNA Secondary Structure Formation. *J. Virol.* **76**, 8532–8539 (2002)
89. Wilson J.A., Bray M., Bakken R., Hart M.K.: Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35, and VP40 proteins. *Virology*, **286**, 384–90 (2001)
90. Wool-Lewis R.J., Bates P.: Endoproteolytic Processing of the Ebola Virus Envelope Glycoprotein: Cleavage Is Not Required for Function. *J. Virol.* **73**, 1419–1426 (1999)
91. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull. WHO*, **56**, 271–293 (1978)
92. Xu L., Sanchez A., Yang Z., Zaki S.R., Nabel E.G., Nichol S.T., Nabel G.J.: Immunization for Ebola virus infection. *Nat. Med.* **4**, 37–42 (1998)

93. Yang Z., Delgado R., Xu L., Todd R.F., Nabel E.G., Sanchez A., Nabel G.J.: Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science*, **279**, 1034–1037 (1998)
94. Yang Z.Y., Duckers H.J., Sullivan N.J., Sanchez A., Nabel E.G., Nabel G.J.: Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat. Med.* **6**, 886–889 (2000)
95. Zaki S.R., Peters C.J. i wsp.: A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. *J. Infect. Dis.* **179**, 36–47 (1999)
96. WHO website, 21 marca 2006 roku. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/index.html>
97. CDC website, 21 marca 2006 roku. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/ebola.htm>
98. NCBI website, 21 marca 2006 roku. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_filov.htm
99. ICTVdB website, 21 marca 2006 roku. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/01.025.htm>

Tomasz Dzieciatkowski¹, Agnieszka Tomaszewska²,
Anna Majewska¹, Mirosław Łuczak¹

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Akademia Medyczna w Warszawie
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, tel. (22) 622 00 28, e-mail: dzieciatkowski@wp.pl

² Klinika Transplantacji Komórek Krwiotwórczych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii
ul. Gandhi 14, 02-776 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Rumień zakaźny (*erythema infectiosum*). 3. Zespół „rękawiczek i skarpetek”. 4. Zakażenia u kobiet ciężarnych. 5. Hematologiczne następstwa zakażenia parwowirusem B19. 5.1. Przemijające przełomy aplastyczne. 5.2. Aplazja czystoczerwonokrwinkowa. 5.3. Neutropenia, małopłytkowość i pancytopenia po zakażeniu parwowirusem B19. 6. Diagnostyka zakażeń B19. 7. Podsumowanie

Infections with human parvovirus B19

Abstract: Human parvovirus B19 belonging to the genus *Erythrovirus* is the only parvovirus known to be a human pathogen. Parvovirus B19 has extreme tropism for human erythroid progenitor cells and causes a variety of diseases in humans with outcomes ranging from symptomatic to severe, such as chronic anemia in immunocompromised patients. The virus may be transmitted to susceptible individuals via respiratory secretions, plasma-derived products and also transplacentally from the infected mother to the fetus during pregnancy which may result in hydrops fetalis, abortion or stillbirth. It is also presumable that B19-induced immune dysfunction can predispose to infection with other pathogens, although little is known about the effects and consequences of mixed infections of B19 and other infectious agents. The aim of this paper is the presentation of current knowledge about parvovirus B19 infections and also commonly used diagnostic procedures.

1. Introduction. 2. Erythema infectiosum. 3. „Gloves and socks” syndrome. 4. Parvovirus B19 infections in pregnancy. 5. Haematological consequences of parvovirus B19 infection. 5.1. Transient aplastic crisis. 5.2. Pure red cell aplasia. 5.3. Neutropenia, thrombocytopenia and pancytopenia in B19 infections. 6. Diagnostics of B19 infections. 7. Summary

Słowa kluczowe: parwowirus B19, rumień zakaźny, przełom aplastyczny, nieimmunologiczny obrzęk płodu

Key words: parvovirus B19, erythema infectiosum, aplastic crisis, non-immune hydrops fetalis

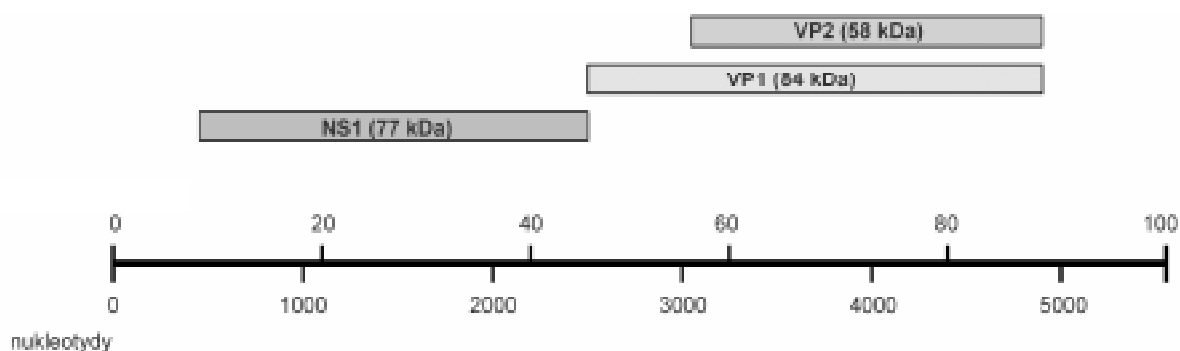
1. Wstęp

Parwowirus B19 został odkryty przypadkowo w 1974 r. przez Yvonne Cossart podczas prac nad testami do wykrywania antygenów powierzchniowych wirusa zapalenia wątroby typu B. Określenie nazwy wywodzi się z oznaczenia badanej próbki surowicy (płytką B, numer 19), w której wykryto nieprawidłowo wysokie wyniki testów serologicznych. W mikroskopii elektronowej wykazano obecność pojedynczych cząstek o średnicy 23 nm przypominających parwowirusy zwierzęce [10]. Kilka lat później parwowirus B19 został niezależnie opisany przez badaczy japońskich jako wirus Nakatani, jednak kolejne badania wykazały, że oba wirusy to ten sam czynnik zakaźny [29]. Pierwotną nazwę „surowicze cząsteczki parwowiruso-podobne” oficjalnie zmieniono w 1985 r. na parwowirus B19, zaś wirus został zakwalifikowany do rodziny *Parvoviridae* [36]. Do chwili obecnej jest on jedynym przedstawicielem parwowirusów bezsprzecznie powiązanych z patogenym działaniem na organizm człowieka. Zakażenia nim są powszechne na całym świecie i dają szeroki zakres objawów klinicznych w zależności od statusu immunologicznego i hematologicznego pacjenta. Większość ludzi zostaje zakażona tym wirusem już w dzie-

ciństwie, bowiem u ponad 50% ludzi do 20 roku życia stwierdza się dodatni poziom przeciwciał anti-B19 klasy IgG, a wraz z wiekiem odsetek ten wzrasta do 90–100% [4, 13].

Genom parwowirusa B19 składa się z jednoniciowego DNA i liczy około 5,6 tys. zasad [3]. Podobnie jak u innych parwowirusów, zawiera on dwie duże otwarte ramki odczytu (Open Reading Frames, ORF), kodujące dwa białka kapsydu – VP1 i VP2 oraz pojedyncze białko niestrukturalne NS1. Cały genom otoczony jest bezotoczkowym, dwudziestościanowym kapsydem, złożonym z 60 kapsomerów [3]. Brak otoczki powoduje dużą odporność wirusa na inaktywację za pomocą czynników fizycznych i chemicznych. Wirus jest niewrażliwy na działanie temperatury 56°C przez 60 minut oraz na działanie rozpuszczalników hydrofobowych [35].

W połowie lat 90-tych we Francji od pacjenta z niedokrwistością aplastyczną została wyizolowana próbka parwowirusa, określona jako V9, jednak analiza jego sekwencji DNA wykazała różnicę powyżej 10% w porównaniu z innymi szczepami tego patogenu [28]. Ówczesne testy serologiczne nie potwierdzały ostrej infekcji B19, stąd też sugerowano, iż zaobserwowany przełom aplastyczny związany był z zakażeniem V9, jako nowym typem wirusa, który nie wykazywał



Rys. 1. Schemat budowy genomu parwowirusa B19

Na wykresie zaznaczono miejsca kodowania białka niestrukturalnego NS1 o masie cząst. 77 kDa oraz białek kapsydu VP1 i VP2 o masach cząst. odpowiednio – 84 i 58 kDa [3].

krzyżowej reakcji z testami specyficznymi dla B19. Standardowe startery PCR dla wirusa B19 nie amplifikowały sekwencji wariantu V9 [28], wskazując na konieczność zastosowania nowych metod do badania próbek podejrzanych o obecność tego szczepu i potencjalnych nowych wirusów. Występowanie typu V9 i jego związek z objawami chorobowymi pozostaje wciąż niewyjaśnione, a współcześnie zmodyfikowane testy serologiczne wykazują 100% reakcji krzyżowej pomiędzy białkami kapsydu VP2 B19 i V9.

2. Rumień zakaźny (*erythema infectiosum*)

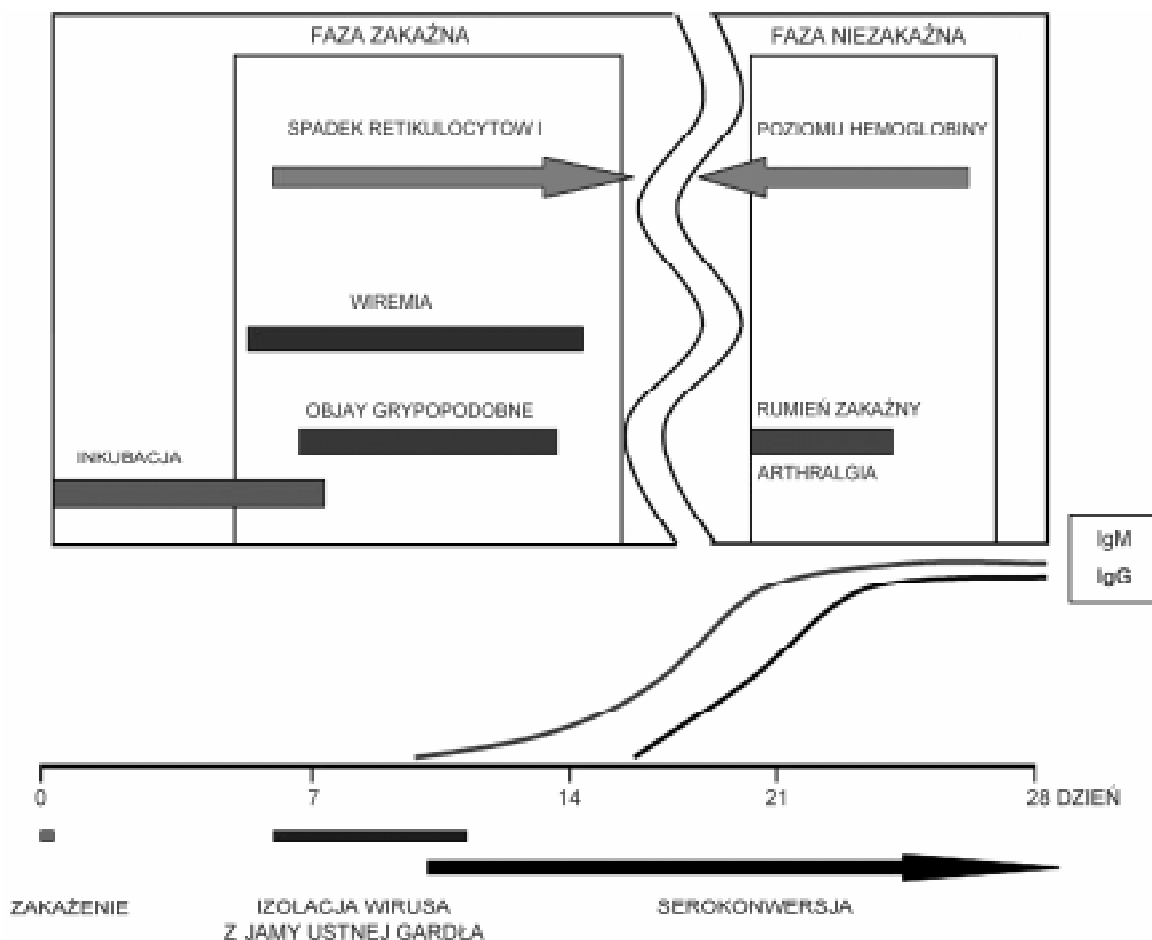
Zakażenie parwowirusem B19 u dzieci najczęściej występuje pod postacią rumienia zakaźnego, który także określany jest jako „choroba piąta”, gdyż pod koniec XIX wieku było sklasyfikowane jako piąta choroba wieku dziecięcego przebiegająca z wysypką. Inne często spotykane w literaturze określenie to „zespół spoliczkowanego dziecka”.

Choroba przebiega dwufazowo: po okresie inkubacji, trwającym około 7 dni (4–14 dni) u części dzieci pojawiają się niespecyficzne objawy grypopodobne związane z wiramią, takie jak: ból głowy, złe samopoczucie, umiarkowana gorączka, objawy żołądkowo-jelitowe, nieżyt dróg oddechowych czy też powiększenie szyjnych węzłów chłonnych. W tym czasie wirus obecny jest w wydzielinach górnych dróg oddechowych, które są źródłem zakażenia [9]. W fazie drugiej w 80% przypadków obserwowane są zmiany na skórze w postaci siateczkowatej wysypki umiejscowionej symetrycznie na policzkach i kształtem przypominającej motyla lub ślad po wymierzeniu policzka [9, 16]. Po 1–4 dniach wysypka może obejmować również tułów, kończyny górne i dolne. W patogenezie tej fazy prawdopodobnie znaczącą rolę odgrywają tworzące się kompleksy immunologiczne [15].

Zakażenie może przebiegać również bez jakichkolwiek objawów. Przechorowanie uodparnia na całe

życie, a reinfekcje notowane są bardzo rzadko. Obraz kliniczny zakażenia wirusem B19 u części dzieci może objawami przypominać różyczkę, co utrudnia prawidłowe rozpoznanie choroby.

U osób dorosłych parwowiroza może przebiegać odmiennie niż u dzieci. Głównymi dolegliwościami są wówczas bóle stawów na tle zapalenia stawów. Artropatię powiązaną z B19 opisano po raz pierwszy w 1985 roku. Występuje ona u 60% młodych ludzi zakażonych wirusem i u około 5–8% dzieci z rumieniem zakaźnym. U dorosłych stwierdza się symetryczne zapalenie wielu stawów np. śródręcza (75%), stawów kolanowych (65%), nadgarstka (55%), łokciowych (40%) i proksymalnych stawów międzypaliczkowych [37]. Podobnie jak u dzieci symptomy te poprzedzone są często objawami grypopodobnymi. Należy zauważyć, że rumień zakaźny występuje z równą częstością u dzieci płci męskiej, jak i żeńskiej, lecz dolegliwości stawowe są bardziej nasilone u kobiet niż mężczyzn. Objawom stawowym towarzyszyć może charakterystyczna wysypka. W połowie przypadków artropatii dorosłych po 1–2 tygodniach choroby dochodzi do ustąpienia zmian zapalnych w stawach. Rzadko zdarza się by objawy utrzymywały się dłużej, choć takie przypadki też są notowane. Pacjenci wymagają ciągłego monitorowania, ponieważ artropatia może wystąpić ponownie po długim okresie bezobjawowym [15, 16]. W przypadkach, gdy dolegliwości stawowe utrzymują się kilka miesięcy lub lat, chorzy spełniają kryteria diagnostyczne American Rheumatism Association dla reumatoidalnego zapalenia stawów i młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów. Obecnie trwają dyskusje dotyczące związku przyczynowego wirusa B19 z tymi jednostkami chorobowymi. Gdyby te dane zostały potwierdzone, można byłoby wyjaśnić rolę infekcji wirusowej w patogenezie chorób autoimmunologicznych, przez wpływ na odpowiedź immunologiczną humoralną i komórkową, bądź krzyżową reakcję pomiędzy wirusem, a ludzkimi epitopami [16].



Rys. 2. Korelacja objawów klinicznych ze statusem serologicznym w przebiegu zakażenia parwowirusem B19 [2, 16, 37]

Odpowiedź immunologiczna w postaci przeciwciał klasy IgM pojawia się około 5–8 dnia od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych. Przeciwciała w klasie IgG wykrywane są w surowicy krwi w drugim tygodniu od chwili zakażenia a ich poziom może utrzymywać się przez wiele lat.

3. Zespół „rękawiczek i skarpetek”

Zespół „rękawiczek i skarpetek” (gloves and socks syndrome) po raz pierwszy opisano w 1990 roku [34]. Dotychczas opublikowano kilkadziesiąt potwierdzonych laboratoryjnie przypadków. Objawami charakterystycznymi są ograniczone zmiany pojawiające się w obrębie stóp i dłoni. Choroba rozpoczyna się obrzękiem i rumieniem, następnie pojawia się krwotoczna wysypka grudkowa i świąd. Czasem zmiany skórne obecne są w innych miejscach np. na twarzy, pośladkach, łokciach czy kolanach [7, 30, 34].

Objawom miejscowym często towarzyszą bóle głowy, ogólne osłabienie, bóle stawowe i podwyższona ciepłota ciała. W wielu przypadkach zaobserwowano zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej, takie jak: zaczerwienienie gardła, wybroczyny, zmiany o charakterze pęcherzykowo-grudkowym na podniebieniu twardym i miękkim jak również typowe dla zakażenia wirusem odry plamki Koplika. Zajęta może być również błona śluzowa narządów płciowych, zarówno u kobiet jak i mężczyzn, co objawia się obrzękiem, rumieniem a nawet płytkimi owrzodzeniami. W nie-

licznych przypadkach laboratoryjnie stwierdza się leukopenię, neutropenię, monocytosę, eozynofilię, trombocytopenię i nieznacznie podwyższony poziom transaminaz [7, 11, 30]. Podobne zmiany miejscowe mogą występować w przebiegu innych chorób infekcyjnych zarówno bakteryjnych jak i wirusowych, dlatego w rozpoznaniu klinicznym należy uwzględnić możliwość kiły drugorzędowej, rickettsjozy (*Rickettsia conorii*), erlichiozy, gonokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych czy zapalenia gardła o etiologii *Arcanobacterium haemolyticum*. Choroby wirusowe przebiegające z podobnym obrazem klinicznym to zakażenia HHV-4, HHV-5, HBV, wirusami Coxackie typu A i B, wirusem ECHO oraz wirusem odry [11].

4. Zakażenia u kobiet ciężarnych

Do zakażenia kobiety ciężarnej dochodzi drogą kropelkową, przez bezpośredni kontakt z zakażonymi wydzielinami dróg oddechowych osoby, najczęściej dziecka. Około 40–50% kobiet ciężarnych jest wrażliwych na zakażenie wirusem. Ryzyko infekcji kobiet

podczas ciąży jest tym większe, im większy kontakt z dziećmi w wieku wczesnoszkolnym w domu, szkole czy domach opieki dziennej. Drugą możliwą drogą zakażenia jest przetoczenie zakażonej krwi, szczególnie preparatów zawierających czynnik VII i IX. Szacuje się, że w wyniku infekcji u matki seronegatywnej lub o nieznanym statusie immunologicznym dochodzi do 1 przypadku wewnątrzmacicznej infekcji płodu na 400 ciąż [14, 16]. Do zakażenia płodu dochodzi przez łożysko u około 30% kobiet pierwotnie zakażonych parwowirusem. Skutkiem infekcji wrodzonej może być spontaniczne poronienie lub nieimmunologiczny uogólniony obrzęk płodu [8, 25]. Znacznie rzadziej obserwuje się zapalenie mięśnia sercowego, kardiomiopatie, uszkodzenie wątroby oraz zapalenie opon mózgoworzeniowych [8, 22, 39]. U kobiet mających kontakt z wirusem wewnątrzmaciczne obumarcie płodu występuje w 4–30% przypadków. Ma to miejsce najczęściej na początku drugiego trymestru (12–17 tydzień), ponieważ w tym czasie nasilają się procesy erytropoezy. W czasie I trymestru utrata ciąży występuje w 10% przypadków. Prawdopodobieństwo utraty ciąży zmniejsza się znacznie w przypadku pierwotnej infekcji wirusowej nabytej w drugiej połowie ciąży i jest bardzo rzadkie, gdy kontakt z wirusem nastąpi w ostatnich 2 miesiącach ciąży [14, 39]. Zakażenie w kolejnym trymestrze może powodować oprócz śmierci także nieimmunologiczny obrzęk płodu (7% przypadków), pojawiający się najczęściej 2–4 tygodni po zakażeniu matki. Uważa się, że wirus ten odpowiada za blisko 18–27% wszystkich przypadków obrzęku płodu [12, 16, 39].

W chwili stwierdzenia zakażenia pierwotnego u kobiety ciężarnej zaleca się cotygodniowe ultrasonograficzne monitorowanie płodu w kierunku symptomów uogólnionego obrzęku płodu [25]. Kiedy obrzęk zostaje rozpoznany w pierwszej połowie ciąży, kontroluje się rozwój płodu w badaniu USG; w tym okresie często dochodzi do samoistnego cofnięcia się obrzęku i rozwój płodu przebiega prawidłowo [12].

Istnieje możliwość określenia swoistych przeciwciał we krwi pępowinowej, jednak wynik ujemny ma ograniczoną wartość dowodową, gdyż przeciwciała klasy IgM u płodu nie są wykrywalne przed 22 tygodniem po zakażeniu. Powodem tego może być niedojrzałość płodowego układu immunologicznego oraz możliwości wystąpienia długiego przedziału czasowego od zakażenia do wystąpienia objawów obrzęku u płodu [12].

W czasie rozwoju uogólnionego obrzęku płodu należy rozważyć wykonanie transfuzji dopłodowej krwi. Zabieg taki zmniejsza znacząco ryzyko śmierci płodu z tego powodu. Śmiertelność bez wykonania transfuzji wynosi 30%, natomiast przeżycie po niej obserwuje się w około 84% przypadków [12, 22].

Nieprawidłowości zauważalne w drugiej połowie ciąży mogą stanowić wskazanie do wcześniejszego

urodzenia dziecka po ustaleniu stopnia dojrzałości płuc. W monitorowaniu płodu i wyborze sposobu postępowania terapeutycznego należy uwzględnić ocenę stopnia niedokrwistości płodu [14, 16].

5. Hematologiczne następstwa zakażenia parwowirusem B19

Postacie zakażenia parwowirusem B19 u ludzi mogą się różnić nawet u dotychczas zdrowych osób – od zupełnie bezobjawowego przebiegu do pełnoobjawowej dwufazowej choroby [4, 13]. Wirus przenosi się głównie drogą kropelkową, możliwe jest także zakażenie przez krew lub jej składniki, np. preparaty czynników krzepnięcia. Parwowirus B19 wykorzystuje antygen grupowy krwi P (globozyd – Gb4) jako swój główny receptor komórkowy [4, 9, 13]. Układ grupowy P składa się z 3 antygenów: P, P^k oraz P₁. Prawie 100% populacji posiada fenotyp krwinek P1 (obecny antygen P i P₁ jednocześnie) lub P2 (obecny tylko antygen P). Z częstością około 1 : 200 000 zdarza się brak ekspresji wszystkich 3 antygenów lub fenotyp krwinek P^k₁ (z jednoczesną ekspresją antygenów P₁ i P^k) – osoby te wykazują naturalną oporność na zakażenie parwowirusem [4, 13]. Antygen P jest przede wszystkim obecny na błonie komórkowej krwinek czerwonych i ich prekursorów w szpiku kostnym, ale występuje także na płytkach krwi, megakarioblastach i megakariocytach, a także na komórkach mięśnia sercowego, śródbłonna, wątroby, płuc, nerek, błonie maziowej stawów, mięśniach gładkich przewodu pokarmowego [4, 13]. To oczywiście nie oznacza, że replikacja wirusa występuje we wszystkich wymienionych wyżej rodzajach komórek. Do replikacji B19 potrzebuje bardzo intensywnie dzielących się komórek – w praktyce należą do nich przede wszystkim prekursorzy układu czerwono-krwinkowego w szpiku kostnym, zwłaszcza w sytuacjach nasilonej hematopoezy, np. w przewlekłej hemolizie, po masywnych krwotokach, co powoduje określone następstwa hematologiczne [4, 9, 13].

Do najczęściej występujących hematologicznych powikłań zakażenia parwowirusem B19 należą: przemijające przelomy aplastyczne (TAC – *transient aplastic crisis*) i aplazja czystoczerwono-krwinkowa (PRCA – *pure red cell aplasia*) [4, 13].

5.1. Przemijające przelomy aplastyczne (TAC)

Przemijające przelomy aplastyczne spowodowane zakażeniem parwowirusem B19 są uważane za jedno z głównych powikłań u pacjentów z wrodzonymi zespołami hemolitycznymi najczęściej o przewlekłym przebiegu. TAC opisywano w prawie wszystkich rodzajach wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych:

membranopatiach (np. sferocytocie wrodzonej), hemoglobinopatiach (np. niedokrwistości sierpowatokrwinkowej, talasemiach) oraz enzymopatiach [4, 13]. Przełom aplastyczny może być pierwszym objawem w przypadku dobrze skompensowanej hemolizy. Poza niedokrwistościami wrodzonymi TAC był opisywany również w niedokrwistościach autoimmunohemolitycznych, po masywnym krwotoku, po przeszczepieniu nerki, czy po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [4, 9, 13]. Zawsze wyjściowo u tych pacjentów występował stan bardzo nasilonej hematopoezy, a zwłaszcza erytropoezy [40].

Charakterystyczną cechą przełomu aplastycznego jest bardzo ciężka, często zagrażająca życiu niedokrwistość lub pancytopenia z całkowitym brakiem retikulocytów, co pozwala zróżnicować przełom aplastyczny i hemolityczny (w tym ostatnim typowa jest wysoka retikulocytoza) [4, 13, 27]. W badaniu szpiku stwierdza się znaczne upośledzenie lub całkowity brak prekursorów erytropoezy, charakterystyczna, (ale nie patognomiczna) jest obecność olbrzymich pronormoblastów [4, 13].

Postępowanie terapeutyczne, ze względu na samoo ograniczający się przebieg tego powikłania, jest głównie objawowe. Przede wszystkim dąży się do wyrównania niedokrwistości poprzez przetoczenia koncentratów krwinek czerwonych. Na ogół objawy ustępują po ok. 1–2 tygodniach. W przypadkach przewlekłego (przetwałego) zakażenia B19 zaleca się stosowanie dożylnych preparatów immunoglobulin (IVIG) najczęściej w dawce 0,4 g/kg m.c./24 h przez 5 dni [4, 9, 13].

5.2. Aplazja czystoczerwokrwnikowa (PRCA)

Powikłanie zakażenia parwowirusem tego typu zdarza się przede wszystkim u pacjentów z różnego rodzaju niedoborami odporności – we wrodzonych zespołach niedoboru odporności, w nabytych – np. zakażenie HIV, w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych,

po przeszczepieniu narządów i tkanek podczas przewlekłego leczenia immunosupresyjnego [18]. Typowym objawem jest przewlekłe utrzymująca się niedokrwistość (często bardzo głęboka, zagrażająca życiu) z retikulocytopenią lub brakiem retikulocytów. W badaniu szpiku podobnie jak w TAC stwierdza się obecność olbrzymich pronormoblastów i zahamowanie erytropoezy [33]. W surowicy pacjentów przeciwciała anty-B19 są nieobecne lub występują w bardzo niskich mianach, stwierdza się natomiast przetrwałą lub nawracającą wiremę. W leczeniu stosuje się IVIG i postępowanie objawowe [13].

5.3. Neutropenia, małopłytkowość i pancytopenia po zakażeniu parwowirusem B19

Ostrej parwowirozie może towarzyszyć małopłytkowość, neutropenia lub rzadziej pancytopenia [19]. Patomechanizm tych nieprawidłowości nie został dotychczas dokładnie wyjaśniony. Najczęściej mają one przemijający charakter. Opisano także skojarzenie zakażenia B19 i cytopeniami o podłożu autoimmunizacyjnym, jak małopłytkowość o cechach małopłytkowości samoistnej, neutropenię autoimmunizacyjną, niedokrwistość autoimmunohemolityczną [23, 26]. Ponadto uważa się, że zakażenie parwowirusem B19 może być przyczyną przynajmniej części przypadków nabytej niedokrwistości aplastycznej zwłaszcza w sytuacjach przebiegających z zapaleniem wątroby o nieustalonej etiologii [4, 9, 13, 41]. Są to jednak doniesienia na podstawie badań małych grup pacjentów wymagające potwierdzenia w kontrolowanych badaniach.

6. Diagnostyka zakażeń B19

Na zakażenie B19 może wskazywać obecność olbrzymich pronormoblastów w szpiku kostnym bądź we krwi obwodowej, jednak metoda ta nie może być

Tabela I
Kliniczne objawy zakażenia parwowirusem B19 w różnych grupach pacjentów [4, 9, 13]

Zespół chorobowy	Grupa pacjentów
Zespoły hematologiczne	
<ul style="list-style-type: none"> ● Przemijający przełom aplastyczny (TAC) ● Przewlekła niedokrwistość, w tym aplazja czystoczerwokrwnikowa (PRCA) ● Obrzęk płodu/wrodzona niedokrwistość ● Małopłytkowość/neutropenia ● Zespół hemofagocytozy 	<ul style="list-style-type: none"> ● Pacjenci z nasiloną erytropoezą (np. hemoliza) ● Pacjenci z niedoborami odporności/leczeni immunosupresyjnie ● Płód (<20 tygodnia ciąży) ● Rzadko ● Rzadko
Inne zespoły	
<ul style="list-style-type: none"> ● Rumień zakaźny („piąta choroba”) ● Uszkodzenie stawów ● Zapalenie mięśnia sercowego ● Zapalenie wątroby 	<ul style="list-style-type: none"> ● Dotychczas zdrowe dzieci ● Dotychczas zdrowi dorośli ● Rzadko ● Rzadko

Tabela II

Interpretacja badań serologicznych w przebiegu zakażenia wirusem B19 u kobiet ciężarnych i zalecane postępowanie [14, 16]

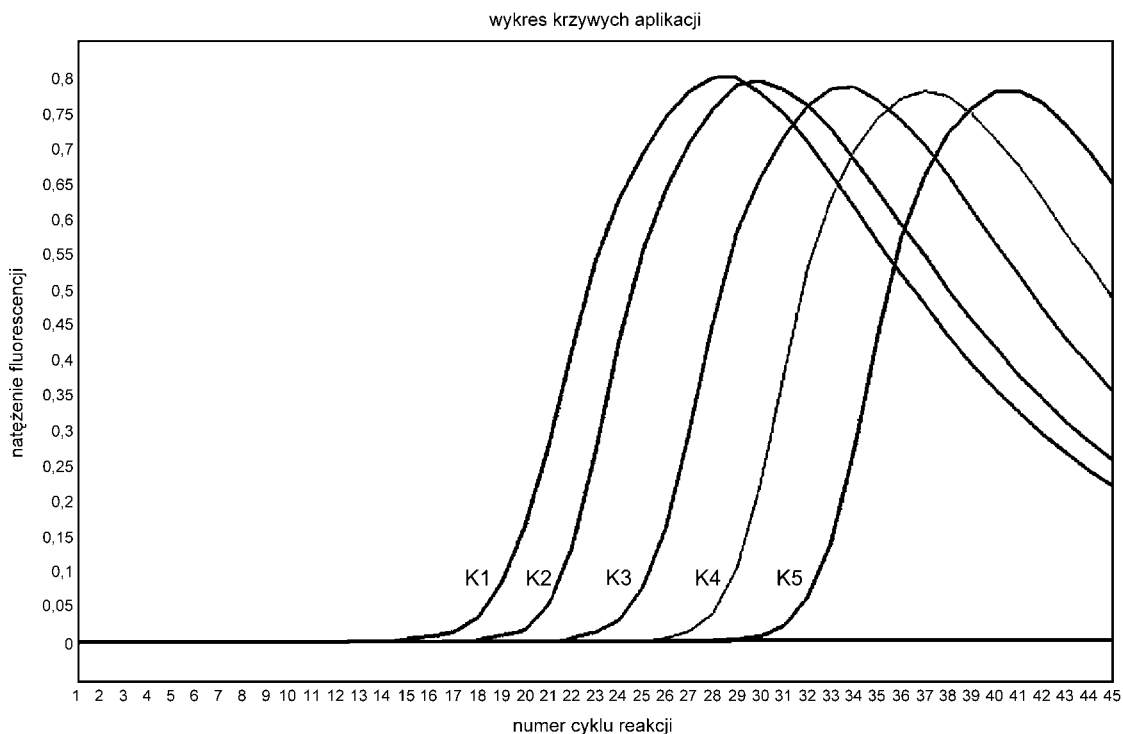
Status serologiczny	Przeciwciała		Postępowania	
	IgM	IgG		
Wrażliwość na zakażenie	–	–	Powtórzyć badanie za 2 tygodnie	
Infekcja przebyta	–	+	Brak wrażliwości na zakażenie płodu	
Zakażenie w ciągu ostatnich 7 dni	+	–	Ostra faza zakażenia	konieczna konsultacja i ultrasonograficzne monitorowanie płodu
Zakażenie w ciągu ostatnich 7–120 dni	+	+	Zakażenie	

stosowana do rutynowej diagnostyki parwowirusy, ponieważ komórki takie są również często obserwowane u pacjentów z HIV lub innymi przewlekłymi zakażeniami [4, 13].

Diagnostyka zakażeń B19 u immunokompetentnych pacjentów opiera się głównie na wykrywaniu specyficznych przeciwciał anty-VP2 [32]. Testy specyficzne dla przeciwciał klasy IgM pozwalają na skuteczne wykrycie aktualnego lub świeżo przebytego zakażenia u osób z prawidłową odpornością [5]. Ponad 85% pacjentów z rumieniem zakaźnym lub przełomem aplastycznym związanym z B19 wytwarza swoiste przeciwciała w klasie IgM, które są wykrywalne w surowicy przez 2 do 3 miesięcy [2]. Po dwóch tygodniach od chwili zakażenia, przeciwciała klasy IgG są wykrywalne i utrzymują się do końca życia, lecz kolejne próbki osocza mogą wykazywać zmniejszanie się ich poziomu. Z tego też powodu wykrywanie przeci-

ciał klasy IgG nie jest przydatne dla diagnostyki ostrych zakażeń, z wyjątkiem badania serokonwersji u pacjentów z upośledzoną odpornością, którzy mogą nie wytwarzać przeciwciał klasy IgM [24]. Do badania pobiera się surowice parzyste, co 2–4 tygodnie, co daje możliwość ustalenia fazy zakażenia. Tego rodzaju diagnostyka jest szczególnie istotna w przypadku infekcji rozpoznawalnych podczas ciąży, gdyż ryzyko wystąpienia patologii u płodu jest zmienne w zależności od trymestru ciąży, w którym doszło do zakażenia matki.

Znaczenie diagnostyki przeciwciał anty-NS1 jest podważane od czasu stwierdzenia związku białka NS1 z zapaleniem stawów lub przewlekłym zakażeniem B19 [17]. Większość badań wskazuje jednak, że niezależnie od objawów chorobowych przeciwciała klasy IgG anty-NS1 pojawiają się po 6 tygodniach od zakażenia, stąd też ich obecność pozwala wykluczyć ostre zakażenie u pacjentów z niejasnym obrazem serologicznym [17].



Rys. 3. Wynik reakcji real-time PCR do wykrywania parwowirusy B19

Krzywe na wykresie oznaczone K1-K5 stanowią poszczególne kalibratory poziomu wiremii w przedziale od 6×10^1 do 10^6 kopii/ml.

Obecnie zakażenie parwowirusem B19 jest najczęściej diagnozowane poprzez wykrycie DNA za pomocą hybrydyzacji [1] lub PCR [21, 32]. Hybrydyzacja ma wystarczającą czułość do identyfikacji B19, włączając wariant V9, w przypadku przełomu aplastycznego i aplazji szpiku u pacjentów z obniżoną odpornością, jednak wiremia niższa niż 10^4 kopii/ml może pozostać nie wykryta. Zastosowanie PCR znacząco zwiększyło możliwości badania obecności DNA wirusa w surowicy i próbkach tkanek [31]. Wirusowy DNA może być wykrywany w różnych okresach w surowicy, błonach maziowych, szpiku kostnym nawet u zdrowych osób [31], stąd też sama obecność DNA B19 nie powinna być kryterium rozpoznania ostrej fazy zakażenia. Tradycyjne badania PCR miały stosunkowo niewielką czułość i w większości nie wykrywały wariantu V9, dlatego też zostały zastąpione przez nowsze metody, jak nested-PCR [31] oraz real-time PCR [6, 38]. Komercyjnie dostępne testy real-time PCR pozwalają na wykrycie w różnych próbkach klinicznych wirusa na poziomie kilkudziesięciu kopii/ml, co znacząco ułatwia szybką identyfikację patogenu [38].

7. Podsumowanie

Rozwój transplantologii, zarówno w dziedzinie przeszczepów narządów unaczynionych i komórek krwiotwórczych powoduje, że w związku z wytworzoną głęboką immunosupresją zakażenia parwowirusem B19 mogą przebiegać częściej i z nasilonymi objawami. Dodatkowo w grupie pacjentów z obniżoną wydolnością układu immunologicznego poważnym problemem stają się zakażenia mieszane, towarzyszące obecności parwowirusa. W związku z tym sugerowane są badania przesiewowe w kierunku B19 u dzieci z chorobami nowotworowymi oraz badanie dawców przed przeszczepem szpiku.

Choć w większości przypadków zakażeń u osób z prawidłową czynnością układu odpornościowego parwowiroza nie wymaga leczenia, brak jest skutecznych form terapii przeciwwirusowej dla pacjentów hematologicznych. Stosowane leczenie objawowe jest skuteczne, lecz nie zapobiega możliwości reaktywacji wirusa. Prowadzone są obecnie prace nad rekombinowaną szczepionką zawierającą geny kodujące białka kapsydu parwowirusa, które ulegają ekspresji w wektorze bakulowirusowym [20]. Otrzymane białko VP1 indukuje w modelu zwierzęcym powstanie specyficznych przeciwciał. Badania prowadzone na ochotnikach immunizowanych tak wytworzonymi rekombinantami wykazały, że miano przeciwciał jest równe lub czasem wyższe niż w przypadku naturalnego zakażenia.

Piśmiennictwo

- Anderson M.J., Jones S.E., Minson A.C.: Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blot hybridization using cloned viral DNA. *J. Med. Virol.* **15**, 163–172 (1985)
- Anderson L.J., Tsou C., Parker R.A., Chorba T.L., Wulff H., Tattersall P., Mortimer P.P.: Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 522–526 (1986)
- Berns K.I.: Parvoviridae: the viruses and their replication [w:] Fields virology. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. i wsp. (red.) Lippincott-Raven, Philadelphia 1996, s. 2173–2197
- Brown K.E.: Haematological consequences of parvovirus B19 infection. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **13**, 245–259 (2000)
- Bruu A.L., Nordbo S.A.: Evaluation of five commercial tests for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1363–1365 (1995)
- Buller R.S., Storch G.: Evaluation of a Real-Time PCR Assay Using the LightCycler System for Detection of Parvovirus B19 DNA. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3326–3328 (2004)
- Carlesimo M., Palese E., Mari E., Panasi V., Picarelli A., Rossi A., Camplone G.: Gloves and socks syndrome caused by parvovirus B19 infection. *Dermatol. Online J.* **12**, 19 (2006)
- Chisaka H., Ito K., Niikura H., Sugawara J., Takano T., Murakami T., Terada Y., Okamura K., Shiroishi H., Sugamura K., Yaegashi N.: Clinical manifestations and outcomes of parvovirus B19 infection during pregnancy in Japan. *Tohoku. J. Exp. Med.* **209**, 277–283 (2006)
- Coon D.: Parvovirus B19: characteristics, diseases, and diagnosis. *Clin. Microbiol. Newsletter*, **25**, 161–167 (2003)
- Cossart Y. E., Field A. M., Cant B., Widdows D.: Parvovirus-like particles in human sera, *Lancet*, **11**, 72–73 (1975)
- Czarnecka A., Nowicka D.: Wybrane choroby wirusowe przebiegające z zajęciem skóry stawów. *Dermatologia Kliniczna*, **7**, 51–54 (2005)
- Devine P. A.: Parvovirus infection in women. *Prim. Care Update OB/Gyns.* **9**, 149–153 (2002)
- Elsacker-Niele A.M.W., Kroes A.C.M.: Human parvovirus B19: relevance in internal medicine. *Neth. J. Med.* **54**, 221–230 (1999)
- Ergaz Z., Ornoy A.: Parvovirus B19 in Pregnancy. *Reprod. Toxicol.* **21**, 421–435 (2006)
- Friedek D., Romanik M., Chelmiecki Z., Wiechula B.: Następstwa zakażenia parwowirusem B19 u ciężarnych z poronieniem zagrażającym. *Gin. Prakt.* **5**, 48–51 (2003)
- Goff M.: Parvovirus B19 in Pregnancy. *J. Midwifery Womens Health*, **6**, 536–538 (2005)
- Hemauer A., Gigler A., Searle K., Beckenlehner K., Raab U., Broliden K., Wolf H., Enders G., Modrow S.: Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J. Med. Virol.* **60**, 48–55 (2000)
- Hayes-Lattin B., Seipel T.J., Gatter K., Heinrich M.C., Maziarz R.T.: Pure red cell aplasia associated with parvovirus B19 infection occurring late after allogeneic bone marrow transplantation. *Am. J. Hematol.* **75**, 142–145 (2004)
- Istomin V., Sade E., Grossman Z., Rudich H., Sofer O., Hassin D.: Agranulocytosis associated with parvovirus B19 infection in otherwise healthy patients. *Eur. J. Intern. Med.* **15**, 531–533 (2000)

20. Kajigaya S., Fuji H., Field A., Anderson S., Rosenfeld S., Anderson L.J., Shimada T., Young N.S.: Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4646–4650 (1991)
21. Koch W.C., Adler S.P.: Detection of Human Parvovirus B19 DNA by Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 65–69 (1990)
22. Lauterbach R.: Zakażenie parwowirusem B19 [w:] ABC zakażeń u noworodka. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2001, s. 63–65
23. Lehmann H.W., von Landenberg P., Modrow S.: Parvovirus B19 infection and autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **2**, 218–223 (2003)
24. Manaresi E., Gallinella G., Venturoli S., Zerbini M., Musiani M.: Detection of parvovirus B19 IgG: choice of antigens and serological tests. *J. Clin. Virol.* **29**, 51–53 (2004)
25. Marton T., Martin W.L., Whittle M.J.: Hydrops fetalis and neonatal death from human parvovirus B19: an unusual complication. *Prenat. Diagn.* **25**, 543–545 (2005)
26. Meyer O.: Parvovirus B19 and autoimmune diseases. *Joint Bone Spine*, **70**, 6–11 (2003)
27. Mishra B., Malhotra P., Ratho R.K., Singh M.P., Varma S., Varma N.: Human parvovirus B19 in patients with aplastic anemia. *Am. J. Hematol.* **79**, 166–167 (2005)
28. Nguyen Q.T., Sifer C., Schneider V., Allalume X., Servant A., Bernaudin F., Auguste V., Garbarg-Chenon A.: Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2483–2487 (1999)
29. Okochi K., Mori R., Miyazaki M., Cohen B.J., Mortimer P.P.: Nakatani antigen and human parvovirus (B19). *Lancet*, **21**, 160–161 (1984)
30. Passoni L.F., Ribeiro S.R., Giordani M.L.L.: Papular-purpuric “gloves and socks” syndrome due to parvovirus B19: case report of a case with unusual features. *Rev. Inst. Med. Trop.* **43**, 167–170 (2001)
31. Patou G., Pillay D., Myint S., Pattison J.: Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 540–546 (1993)
32. Peterlana D., Puccetti A., Corrocher R., Lunardi C.: Serologic and molecular detection of human Parvovirus B19 infection. *Clin. Chim. Acta*, **372**, 14–23 (2006)
33. Pitchaipillai S., Kelsey P., Haeney M.: Persistent pure red cell aplasia due to parvovirus B19 infection in a patient with Turner’s syndrome. *Clin. Lab. Haematol.* **28**, 347–350 (2006)
34. Prudencio M.M., Maranon A.: Infection by human parvovirus B19: “gloves and socks” papular purpuric syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 209–10 (2000)
35. Schwarz T.F., Serke S., von Brunn A., Hottentrager B., Huhn D., Deinhardt F., Roggendorf M.: Heat stability of parvovirus B19: kinetics of inactivation. *Zentbl. Bakteriol.* **277**, 219–223 (1992)
36. Siegl G., Bates R.C., Berns K.I., Carter B.J., Kelly D.C., Kurstak E., Tattersall P.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*, **23**, 61–73 (1985)
37. Szumera M.: Parwowirus B19 (PB19) – czy zakażenie można wiązać z zapaleniami tkanki łącznej u dorosłych i dzieci? *Reumatologia*, **43**, 80–84 (2005)
38. Watzinger F., Suda M., Preuner S., Baumgartinger R., Ebner K., Baskova L., Niesters H.G., Lawitschka A., Lion T.: Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5189–5198 (2004)
39. Tolfvenstam T., Papadogiannakis N., Norbeck O., Petersson K., Broliden K.: Frequency of human parvovirus B19 infection in intrauterine fetal death. *Lancet*, **357**, 1494–1497 (2001)
40. Yetgin S., Cetin M., Ozyurek E., Aslan D., Uckan D.: Parvovirus B19 infection associated with severe aplastic anemia in an immunocompetent patient. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **21**, 223–226 (2004)
41. Young N.S.: Acquired aplastic anemia. *Ann. Int. Med.* **136**, 534–546 (2002)

Tomasz Dzieciatkowski¹, Agnieszka Rola², Anna Majewska¹,
Magdalena Solarska¹, Mirosław Łuczak¹

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie
ul. Chałubińskiego 5, 02-005 Warszawa, tel. (22) 622 00 28, e-mail: dzieciatkowski@wp.pl

²Wydział Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2006 r.

1. Wstęp. 2. Pierwsze preparaty przeciwherpeswirusowe. 3. Acyklowir (ACV). 4. Gancyklowir (GCV). 5. Pencyklowir. 6. Pochodne estrowe analogów nukleozydów. 7. Analogi nukleotydu. 8. Foscarnet. 9. Nowe preparaty przeciwherpeswirusowe. 10. Podsumowanie

Drugs used in antiherpesviral therapy in humans

Abstract: This paper reviews current knowledge about drugs and agents used in modern antiviral therapy and prophylaxis in humans. Described compounds possess an antiviral activity against *Herpesviridae* family, which contains large, enveloped DNA viruses. The study presents methods of treatment of different diseases caused by herpesviruses and dosage recommendations. The problem of viral resistance to available chemotherapeutics used in routine therapy is also shown. Although herpesviruses infect healthy children and adults, the diseases they cause are more severe and extensive in immunocompromised patients, in whom reactivation from latency appears more often. Therefore, further investigation of novel groups of compounds and their derivatives is highly justified, since they may constitute a base for future antiviral chemotherapeutics.

1. Introduction. 2. First anti-herpesviral agents. 3. Aciclovir (ACV). 4. Ganciclovir (GCV). 5. Penciclovir. 6. Ester derivatives of nucleoside analogues. 7. Nucleotide analogues. 8. Foscarnet. 9. Novel antiherpesviral agents. 10. Summary

Słowa kluczowe: analogi nukleozydów, foscarnet, herpeswirusy, terapia przeciwwirusowa

Key words: nucleoside analogues, foscarnet, herpesviruses, antiviral therapy

1. Wstęp

Herpeswirusy należą do najbardziej rozpowszechnionych DNA-wirusów w świecie kręgowców. Wszystkie z nich rozwinęły różnorodne mechanizmy ułatwiające ich ucieczkę spod kontroli układu immunologicznego gospodarza, jednakże główną strategią przetrwania w środowisku pozostaje zdolność do ustalania zakażenia latentnego [3]. Reaktywacja herpeswirusów ze stanu latencji prowadzi do zakażeń wtórnych, które mogą mieć rozmaity charakter, począwszy od samoograniczających się infekcji, do zakażeń narządowych i układowych o różnym stopniu nasilenia [3, 50].

Szerokim zakresem gospodarzy i krótkim czasem replikacji charakteryzują się przedstawiciele *α-herpesvirinae*; efekt cytotatyczny pojawia się *in vitro* w czasie krótszym niż 48 h [42, 50] – przykładem jest tu wirus opryszczki (human herpesvirus 1; HHV-1). Przedstawiciele tej podrodziny po wstępnym namnożeniu w komórkach nabłonka ustalają stan latencji w komórkach układu nerwowego i/lub w limfocytach [50].

Wirusy należące do *β-herpesvirinae* (np. human herpesvirus 5; HHV-5 – znany jako CMV) mają wąski zakres gospodarzy, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [42, 50]. Ich cykl replikacji jest długi, zakażone komórki ulegają często powiększeniu (cytomegalia),

czemu towarzyszy pojawianie się jądrowych i cytoplazmatycznych ciałek wtęgowych. Charakterystyczną cechą jest silne związanie wirionów potomnych ze strukturami błonowymi komórek gospodarza, powoduje to między innymi powolne zakażenie sąsiednich komórek. Wirusy z tej podrodziny powodują zakażenie latentne w makrofagach oraz prawdopodobnie w komórkach gruczołów wydzielania wewnętrznego [50].

Przedstawiciele *γ-herpesvirinae* wykazują podobnie ograniczony zakres gospodarzy oraz niezwykle wyraźnie zaznaczony limfotropizm. Ta ostatnia właściwość pomaga im w ustaleniu latencji wewnątrz limfocytów B i/lub T [42, 50]. Zmieniają one ich metabolizm, nie produkując przy tym wirionów potomnych. *In vivo* *γ-herpeswirusy* powodują zaburzenia w proliferacji limfocytów, lub jak wirus Epsteina-Barr (HHV-4) wiązane są z transformacją nowotworową komórek gospodarza [50].

Dostępnych jest wiele leków wykazujących aktywność wobec herpeswirusów. Pierwsze zsyntetyzowane były w początkach lat 60, lecz do tej pory trwają prace nad poszukiwaniem nowych preparatów, o większej aktywności przeciwwirusowej i lepszej biodostępności, a jednocześnie mniejszej toksyczności. Opracowywane są również nowe formy recepturowe już znanych preparatów. Przykładem mogą być: walacyklowir i walgancyklowir, które powstały w wyniku połączenia

cząstek macierzystych leków (acyklowiru i gancyklowiru) z waliną, co znacznie poprawiło lipofilność tych związków i poprawiło biodostępność po podaniu doustnym. Przewlekłe stosowanie leków przeciwwirusowych, zwłaszcza w monoterapii, może prowadzić do obniżenia wrażliwości klinicznych szczepów wirusów na chemioterapeutyki. Stanowi to kolejny powód do poszukiwania nowych leków o odmiennych mechanizmach działania [13, 64].

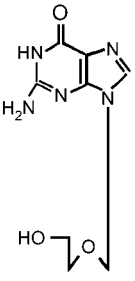
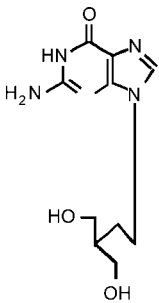
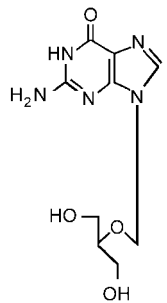
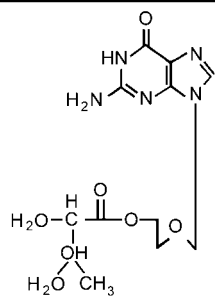
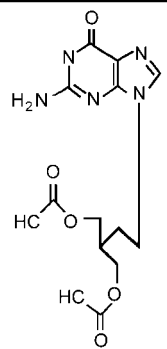
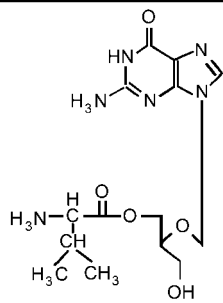
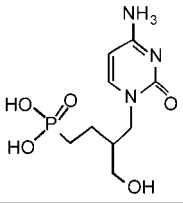
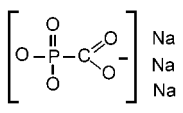
2. Pierwsze preparaty przeciwherpeswirusowe

Jednym z pierwszych wirusów, przeciwko któremu rozpoczęto opracowywanie chemioterapeutyków jest wirus opryszczki pospolitej. Pierwsze preparaty przeciwwirusowe posiadały pierwotnie aktywność przeciwnowotworową. Zsyntetyzowana w 1959 roku idoxurydyna jest syntetycznym analogiem pirymidynowym i wykazuje aktywność wobec wielu wirusów DNA, a szczególnie należących do podrodziny *α-herpesvirinae*, oraz wobec wirusa mięsaka Rousa. W 1968

zaobserwowano nagłe zmiany w odpowiedzi klinicznej na lek i wyizolowano pierwsze szczepy HHV-1 odporne na idoxurydynę. Oporność tę wygenerowano również w warunkach *in vitro*, jednak wykazano, że nie ma ona związku z krzyżową opornością na inne analogi nukleotydów [23]. Obecnie idoxurydyna stosowana jest miejscowo do leczenia opryszczkowego zapalenia rogówki lub rogówki i spojówek [17, 62].

Zsyntetyzowana we wczesnych latach 60 triflurydyna, jest inhibitorem polimerazy DNA. Nie wymaga kinazy tymidynowej do przeprowadzenia warunkującej aktywność fosforylacji i z tego powodu charakteryzuje się mniejszą selektywnością oraz większą toksycznością w porównaniu do innych analogów nukleozydów. Jej zastosowanie – w postaci 1% roztworu – ograniczone jest do leczenia zakażeń narządu wzroku spowodowanych przez HHV-1.

W tym samym okresie opracowano widarabinę. Spektrum działania leku obejmuje niektóre poxwirusy, polyomawirusy, adenowirusy, herpeswirusy, a spośród wirusów RNA wirusy mięsaka Rousa i M-MLV. Jest również inhibitorem polimerazy DNA wirusa *hepati-*

		
Acyklowir	Pencyklowir	Gancyklowir
		
Walacyklowir	Famcyklowir	Walgancyklowir
		5-GCG TTT GCG CTT CTT CTT GCG-3'
Cidofowir	Foskarnet	Fomiwirsen

Rys. 1. Wzory strukturalne leków o działaniu przeciwko herpeswirusom

Tabela I

Przykłady procedur stosowanych w leczeniu różnych postaci zakażeń wirusami HHV-1 i HHV-2 [17, 60]

Postać zakażenia	Leczenie	
Opryszczka jamy ustnej	Acyklowir 200 mg, 5 razy dziennie lub 5% Acyklowir co 3 godziny	5–10 dni (p.o) 7 dni (s.c)
	Walacyklowir 500 mg, 2 razy dziennie	5–10 dni (p.o)
	Pencyklowir co 2 godziny	4 dni (s.c)
Opryszczka narządów płciowych – pierwszy epizod kliniczny	Acyklowir 200 mg, 5 razy dziennie, lub 400 mg, 3 razy dziennie lub 5 mg/kg, co 8 godzin	7–10 dni (p.o) ≥7 dni (i.v)
	Walacyklowir 1000 mg, 2 razy dziennie	7–10 dni (p.o)
	Famcyklowir 250 mg, 3 razy dziennie	
	Opryszczka narządów płciowych – postać nawrotowa	Acyklowir 200 mg, 5 razy dziennie, lub 400 mg, 3 razy dziennie lub 800 mg, 2 razy dziennie
Walacyklowir 500 mg, 2 razy dziennie lub 1000 mg, 1 raz dziennie,		3–5 dni (p.o) 5 dni (p.o)
Famcyklowir 125 mg, 2 razy dziennie,		5 dni (p.o)
Opryszczka narządów płciowych – zapobieganie nawrotom	Acyklowir 400 mg, 2 razy dziennie lub Walacyklowir 1000 mg 1 raz dziennie lub Famcyklowir 250 mg 2 razy dziennie	6–12 miesięcy (p.o)
Zapalenie mózgu (dorośli)	Acyklowir 15 mg, co 8 h	14 dni (i.v)
Profilaktyka zakażeń u pacjentów z immunosupresją	Acyklowir 200–400 mg, 4 razy dziennie	p.o

tis B (HBV). Widarabina stosowana była w przeszłości miejscowo w leczeniu zakażeń oka oraz podawana drogą dożylną. Obecnie dostępna jest wyłącznie w postaci maści, a jej stosowanie ze względu na silną toksyczność ograniczone zostało do leczenia zapaleń rogówki i spojówek [17, 39, 62].

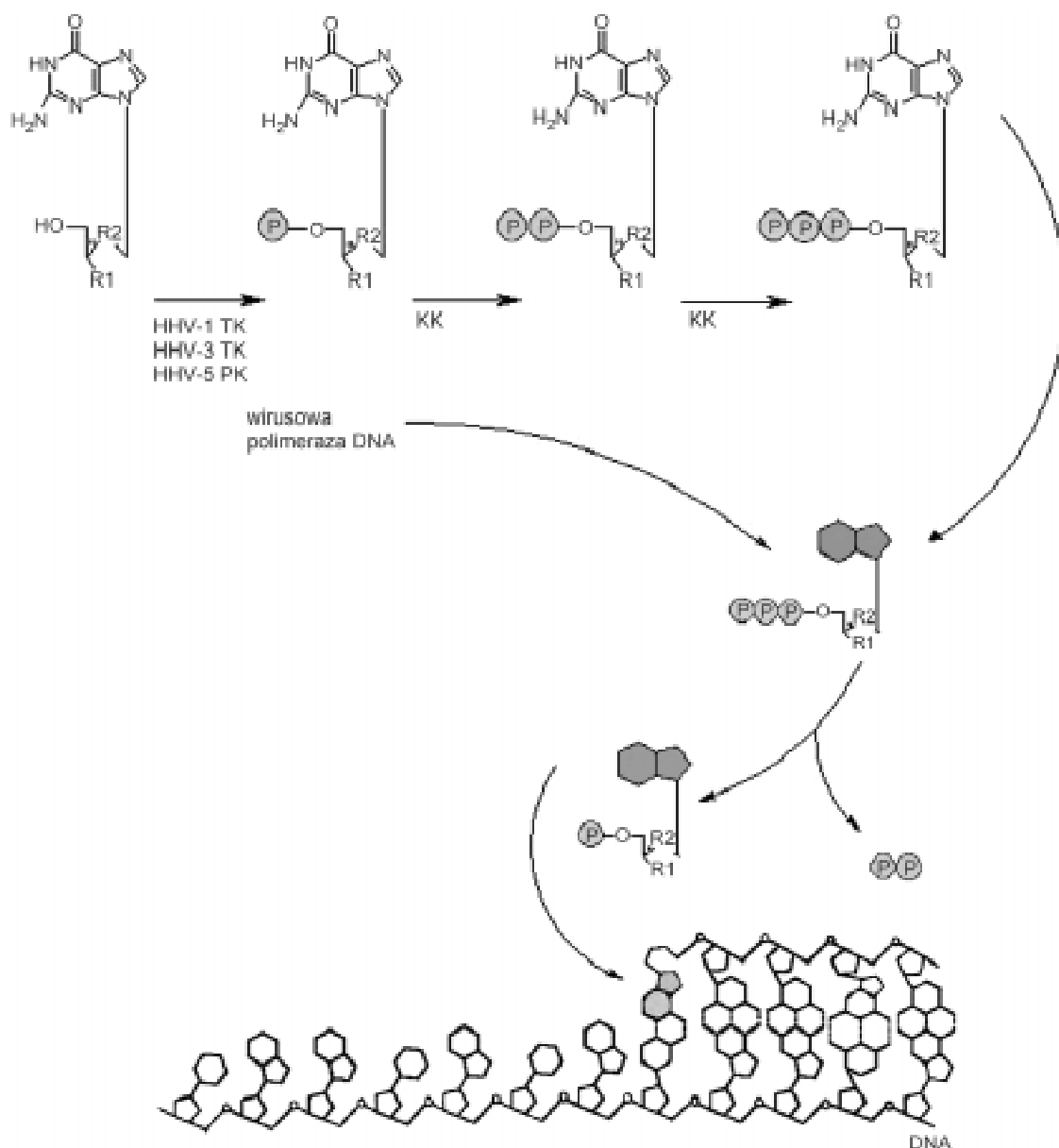
3. Acyklowir (ACV)

Acyklowir należy do kolejnej generacji analogów nukleozydów. Jest pochodną deoksyguanozyny o zmodyfikowanej reszcie cukrowej, gdzie w miejsce cyklicznej deoksyrybozy wprowadzono niecykliczny łańcuch boczny. Powstały w ten sposób analog okazał się mało toksyczny dla człowieka, chociaż zaliczany jest do kategorii C pod względem stosowania w okresie ciąży i przeciwwskazany jest w okresie karmienia piersią. Jest inhibitorem replikacji wirusów opryszczki oraz wirusa ospy wietrznej i półpaśca [19]. Zdecydowanie mniejszą skuteczność acyklowiru obserwuje się w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez inne wirusy z rodziny *Herpesviridae*: cytomegalowirusa czy wirusa Epsteina-Barr [12, 54].

Acyklowir wprowadzany jest do komórki za pomocą białka transportującego nukleozydy, w tym deoksyguanozyny [52, 38]. Początkowo wewnątrz komórki zakażonej wirusem acyklowir ulega przekształceniu w biologicznie aktywną pochodną fosforanową. Proces ten jest możliwy tylko przy udziale swoistej dla wirusa

kinazy tymidynowej [20, 46]. Acyklowir nie jest odpowiednim substratem dla kinaz komórkowych, dlatego lek aktywowany jest głównie w komórkach zakażonych, co z kolei związane jest z jego selektywnością [20]. Następnie monofosforan przekształcany jest przez kinazy komórkowe w difosforan (ACVDP) i dalej trifosforan. Powstały trifosforan acykloguanozyny (ACVTP) jest substratem dla wirusowej polimerazy DNA. Po wprowadzeniu przez polimerazę wirusową zmodyfikowanego nukleozydu do łańcucha DNA, dalsze jego wydłużanie staje się niemożliwe. Przyczyną tego jest współzawodnictwo ACVTP z trifosforanem deoksyguanozyny (dGTP) w trakcie replikacji genu wirusowego [18]. W konsekwencji synteza DNA zostaje zakończona. Trifosforan acyklowiru blokuje aktywność polimerazy DNA wirusów 20 razy skuteczniej niż polimerazy DNA komórek gospodarza. Z tego powodu postać czynna acyklowiru znacznie rzadziej jest wprowadzana do genomu gospodarza niż do materiału genetycznego wirusa [22, 24].

Acyklowir stosowany jest terapeutycznie do leczenia ciężkich zakażeń opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu wywołanych przez α -herpeswirusy, opryszczki noworodków, a także w zakażeniach narządu wzroku, skóry i błon śluzowych. Również w terapii pierwotnej i nawrotowej infekcji narządów płciowych o etiologii HHV-1 i HHV-2, a także do leczenia zakażeń narządowych i układowych. Podawany jest również profilaktycznie w celu zmniejszenia częstości nawrotów oraz złagodzenia przebiegu klinicznego zakażeń



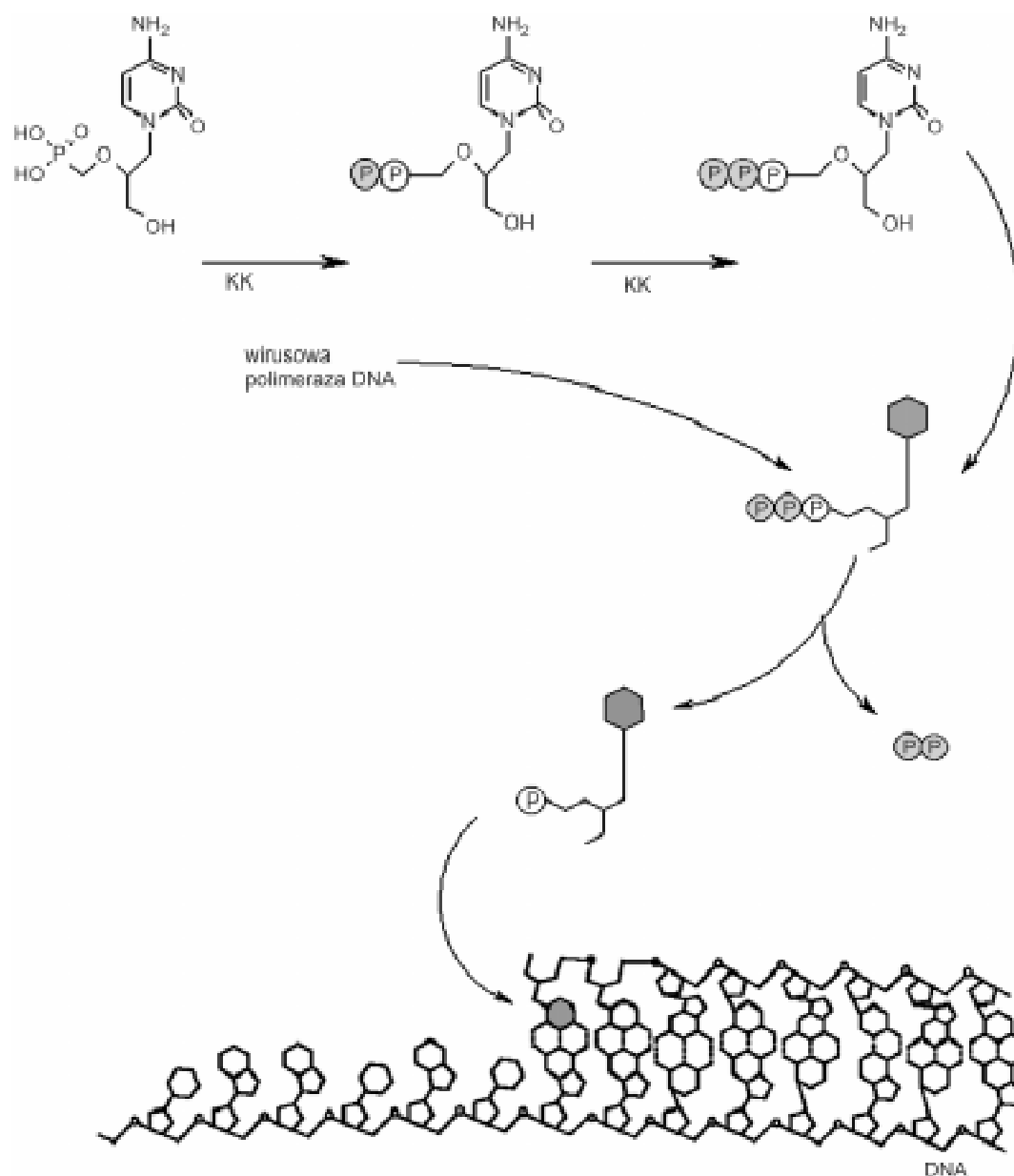
Rys. 2. Mechanizm działania analogów nukleozydów (acyklowir, gancyklowir, pencyklowir)

Wymienione związki muszą ulec fosforylacji przy udziale wirusowych enzymów: kinazy tymidynowej – TK: HHV-1 (produkt genu UL 23), HHV-3 (ORF 36) lub kinazy proteinowej – PK: HHV-5 (UL 97) do swych aktywnych form [wg 15].

wywołanych przez wirusy opryszczki pospolitej i inne ludzkie herpeswirusy. Acyklowir dostępny jest w różnych postaciach: doustnej, kremów, maści do oczu oraz proszku do sporządzania roztworu do wlewów dożylnych; w związku z tym może być stosowany zarówno w leczeniu zakażeń miejscowych jak i uogólnionych, u osób z prawidłową jak i upośledzoną funkcją układu immunologicznego. Podstawowym warunkiem skuteczności terapii jest wczesne podanie leku, najkorzystniej w pierwszej lub drugiej dobie od pojawienia się pierwszych objawów, a także zastosowanie odpowiednio wysokiej dawki terapeutycznej [52].

Acyklowir wchłania się z przewodu pokarmowego w 15–30%, co jest wartością wystarczającą aby uzy-

skać stężenie terapeutyczne w surowicy krwi. Dużą zaletą leku jest zdolność penetracji do tkanek i płynu mózgowo-rdzeniowego. Po podaniu miejscowym do spojówki oka osiąga stężenie hamujące w płynie śródgałkowym. Acyklowir uznawany jest za najbezpieczniejszy spośród dotychczas poznanych leków przeciw-wirusowych, lecz zdarzają się powikłania w wyniku jego stosowania. Do najcięższych, choć bardzo rzadkich, należą zaburzenia w pracy nerek. Wysokie dawki leku podawane dożylnie chorym odwodnionym lub z cechami niewydolności nerek mogą być przyczyną krystalizacji acyklowiru w cewkach nerkowych, prowadząc do odwracalnego podwyższenia poziomu kreatyniny w surowicy [62]. Udokumentowano rów-



Rys. 3. Mechanizm działania przeciwwirusowego cidofoviru. Związek jest fosforylowany przez kinazy komórkowe – KK [15].

niez pojedyncze przypadki zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego o charakterze drgawek lub utraty przytomności [22].

Prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji wywołanej opornym szczepem wirusa opryszczki powinno być brane pod uwagę, jeśli po 5–7 dniach terapii brak jest pozytywnych efektów leczenia lub po 3–4 dniach powstają nowe, satelitarne ogniska zakażenia [1]. Szczepy wirusa odporne na acyklowir mogą wykazywać również brak wrażliwości na inne leki o podobnej budowie takie jak: walacyklowir, famcyklowir i pencyklowir [7, 39]. Mechanizm oporności na acyklowir po raz pierwszy opisano w 1980 roku. Wiąże się on najczęściej z obecnością punktowej mutacji w obrębie

geny kinazy tymidynowej w następstwie delecji, inercji lub substytucji, często w obszarach haplomerycznych DNA. Taki rodzaj zmiany w genie kodującym kinazę tymidynową obserwowany jest u 95% szczepów opornych na acyklowir [58]. Szczepy te produkują niedostateczną ilość enzymu lub w efekcie substytucji enzym ten ma obniżoną swoistość substratową i nie jest zdolny do fosforylacji acyklowiru. Wyniki badań sugerują, że takie mutanty są znacznie mniej patogenne dla zwierząt laboratoryjnych [28], chociaż kilka szczepów opornych izolowanych klinicznie od zwierząt posiadało normalną zjadliwość, co pozwala przypuszczać, iż mogą indukować wytwarzanie dużej ilości komórkowego enzymu [5, 23, 41, 44, 53].

Tabela II
Częstość występowania szczepów opornych wirusa HHV-1 na acyklowir w zależności od przyczyny immunosupresji [45]

Przyczyna immunosupresji	Odsetek szczepów opornych
Przeszczep narządów unaczynionych	3%
Zakażenie wirusem HIV	3,5%
Alloprzeszczep szpiku kostnego	14%
Autoprzeszczep szpiku kostnego	30%

Tabela III
Rodzaje podstawników w stosowanych analogach nukleozydów [27]

Związek	Podstawnik R1	Podstawnik R2
Acyklowir*	H	O
Gancyklowir**	CH ₂ OH	O
Pencyklowir**	CH ₂ OH	CH ₂

* brak grupy 3 hydroksylowej, niezbędnej do wydłużania łańcucha DNA powoduje natychmiastową terminację tego procesu.

** obecność grupy 3-hydroksylowej powoduje spowolnienie lub ustanie wydłużania łańcucha DNA

Rzadziej przyczyną zmiany w profilu wrażliwości jest mutacja w obrębie genu kodującego polimerazę DNA [31]. Może ona wywołać krzyżową oporność na foskarnet, gancyklowir i cidofovir – leki używane alternatywnie w leczeniu zakażeń herpeswirusowych [7].

U pacjentów immunokompetentnych oporność na acyklowir nie stanowi obecnie problemu terapeutycznego, ponieważ szczepy odporne w tej grupie stanowią niespełna 1% izolatów. Brak również doniesień mówiących, że ich ilość zwiększa się w efekcie ekspozycji na lek [23, 66]. U pacjentów z obniżoną wydolnością układu immunologicznego około 3–30% (w zależności od przyczyny immunosupresji) izolowanych szczepów wirusa wykazuje odporność na acyklowir [7, 41].

4. Gancyklowir (GCV)

Przełomem w chemioterapii zakażeń wirusem HHV-5 było wprowadzenie pod koniec lat 80-tych gancyklowiru, kolejnego acyklicznego analogu guanozyny. Od acyklowiru różni się dodatkowym podstawnikiem hydroksylowym, który odpowiada grupie 3'OH występującej w deoksyrybonukleozydach [55].

Gancyklowir jest od 1994 roku lekiem z wyboru w leczeniu zakażenia wirusem cytomegalii. Wykazuje również wysoką aktywność w stosunku do wirusa Epsteina-Barra, wirusa zapalenia wątroby typu B i ludzkiego herpeswirusa typu 6 oraz przeciw zmutozowanym szczepom wirusa opryszczki, wobec których acyklowir jest nieaktywny. Gancyklowir strukturalnie

podobny jest do acyklowiru, lecz wykazuje 100 razy wyższą aktywność przeciwko wirusowi cytomegalii. Wadą gancyklowiru jest zdecydowanie większa cytotoksyczność, z silnie zaznaczonym działaniem mielosupresyjnym. Podobnie jak acyklowir należy do leków kategorii C i z tego powodu stosowanie podczas ciąży jest dopuszczalne wyłącznie wówczas, gdy potencjalne korzyści przewyższają ryzyko dla płodu. W okresie leczenia gancyklowirem kobiety w wieku rozrodczym powinny stosować skuteczne metody antykoncepcji, a mężczyźni barierowe środki antykoncepcyjne w czasie terapii i do 90 dni po jej zakończeniu. Podczas przyjmowania gancyklowu karmienie naturalne jest przeciwwskazane. Lek dostępny jest w postaci doustnej oraz wlewów dożylnych. Po podaniu dożylnym w 90% wydalany jest z moczem drogą przesączania kłębkowego i sekrecji kanalikowej w niezmienionej postaci [40].

Tylko jedna z dwóch grup hydroksylowych gancyklowiru fosforyzowana jest w sposób selektywny przez wirusową kinazę. Następnie przez kinazy komórkowe fosforyzowany jest tylko jeden enancjomer fosforanu gancyklowiru. (S)-enancjomer odpowiedniego trójfosforanu jest w stanie hamować replikację herpeswirusów, podczas gdy (R)-enancjomer pozostaje nieaktywny [2]. Mechanizm działania acyklowiru i gancyklowiru jest zbliżony – gancyklowir jest również substratem dla wirusowej kinazy deoksytymidynowej, ponadto łatwiej niż acyklowir ulega fosforylacji. Gancyklowir w komórce zakażonej HHV-5, poddany działaniu komórkowych kinaz ulega fosforylacji do di- i trójfosforanu, w takiej postaci wbudowywany jest do nici DNA komórki. Następuje spowolnienie, a następnie całkowita blokada syntezy kwasu nukleinowego, co z kolei prowadzi do zahamowania replikacji wirusa [5].

Gancyklowir podany doustnie wchłania się jedynie w 5–10%. Podany w dawce 1000 mg umożliwia osiągnięcie w surowicy stężenia hamującego replikację wirusa HHV-5. Lek nie może być podawany podskórnie i domięśniowo gdyż powoduje powstawanie odczynów miejscowych. Maksymalne stężenie w surowicy osiągane jest po 5 h od momentu podania *i.v.* Gancyklowir dobrze penetruje do tkanek i ośrodkowego układu nerwowego, niestety wykazuje interakcję z wieloma lekami. Ponieważ zidowudyna i gancyklowir powodują uszkodzenie szpiku, kojarzenie tych leków może spowodować u pacjentów neutropenię i niedokrwistość. Obniżenie klirensu nerkowego występuje po kojarzeniu gancyklowiru z probenecidem [35].

Działanie niepożądane związane jest głównie z niekorzystnym wpływem na szybko dzielące się komórki. Najpoważniejszym skutkiem ubocznym stosowania gancyklowiru jest neutropenia i trombocytopenia, która dotyczy około 20% chorych poddawanych leczeniu. U około 20–30% leczonych dochodzi do hamowania

czynności szpiku kostnego, zaburzeń czynności nerek z krwiomoczem, a także zaburzeń funkcji wątroby. Mogą pojawiać się również objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego: parestezje, zaburzenia psychiczne, śpiączka i drgawki. Opisano również zaburzenia rytmu serca, wzrost lub spadek ciśnienia tętniczego oraz objawy ze strony układu oddechowego, mięśni szkieletowych i skóry [5].

Pierwsze próby stosowania gancyklowiru prowadzone były u chorych na AIDS z wirusowym zapaleniem siatkówki oka. Poprawę stanu klinicznego zaobserwowano w 80% przypadków w tej grupie pacjentów. Natomiast dożylnie podawanie gancyklowiru chorym na AIDS z objawami wirusowego zapalenia płuc dało poprawę u 60–80% chorych. Bardzo podobnie sytuacja przedstawia się wśród chorych na AIDS z objawami żołądkowo-jelitowymi [40].

Lek ten stanowi obecnie część protokołu chemioterapii u biorców szpiku kostnego i narządów unaczynionych [29, 37]. Zastosowanie gancyklowiru we wczesnych etapach zakażenia, podwyższa jego skuteczność [29]. Gancyklowir podobnie jak i inne leki przeciwwirusowe nie działa na latentną postać wirusa. W konsekwencji u około 20–30% pacjentów po zakończeniu terapii występują nawroty choroby [34].

Coraz częściej spotyka się zjawisko oporności szczepów HHV-5 na gancyklowir. Pojawienie się opornych szczepów wirusa sprzyja długotrwałe leczenie [48]. Szczepy odporne wyizolowano z moczu od pacjentów leczonych dłużej niż 3 miesiące oraz z płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na AIDS leczonych przez okres od 3 do 30 miesięcy [23]. Oporność ta związana jest z mutacją w obrębie genu UL97, który koduje informację o syntezie swoistego białka, kinazy, kontrolującego fosforylację gancyklowiru w zakażonych komórkach [34, 48]. Czasem brak wrażliwości na gancyklowir może mieć związek ze zmianą w genie UL54, kodującym DNA polimerazę HHV-5. Polimeraza stanowi punkt uchwytu zarówno dla gancyklowiru, jak i leków używanych alternatywnie tj. foskarnetu i cidofoviru. Patogeneza zakażeń szczepami wirusa HHV-5 opornymi na gancyklowir do tej pory nie jest dobrze poznana. Wyniki badań sugerują, że szczepy takie częściej powodują wiremie, częściej i wcześniej od momentu transplantacji chorobę cytomegalowirusową oraz skracają czas przeżycia pacjenta po przeszczepie [48].

5. Pencyklowir

Pencyklowir wprowadzono do leczenia w 1994 roku. Budową zbliżony jest do acyklowiru i posiada mostek metylenowy przy acyklicznym fragmencie rybozy [6]. W związku z podobną budową mechanizmy dzia-

łania acyklowiru i pencyklowiru są do siebie zbliżone [51]. Pencyklowir, podobnie jak acyklowir ulega początkowej wewnątrzkomórkowej fosforylacji do monofosforanu pencyklowiru pod wpływem wirusowej kinazy tymidynowej, a następnie kolejnym dwóm fosforylacjom przeprowadzanym przez kinazy komórkowe. Badania kliniczne wykazały, że w leczeniu zakażeń wirusem ospy wietrznej i półpaśca jego skuteczność jest porównywalna z acyklowirem [43, 61]. Większość szczepów należących do *α-herpesvirinae* opornych na acyklowir (z powodu braku kinazy tymidynowej) jest również krzyżowo oporna na działanie pencyklowiru [35].

Po podaniu doustnym lek jest stosunkowo słabo resorbowany, a jego biodostępność wynosi około 5%. Stosowany miejscowo nie przedostaje się do surowicy, a podany we wlewie dożylnym jest szybko eliminowany (94%) w postaci niezmienionej drogą nerek. Stosowany miejscowo w stężeniu 5% powoduje u 50% leczonych powikłania w postaci rumienia [56].

6. Pochodne estrowe analogów nukleozydów

Jedną z metod poprawiania dostępności biologicznej chemioterapeutyków jest opracowanie tzw. proleków (prekursorów). Są to preparaty, które podane doustnie bądź dożylnie w krótkim czasie, prawie całkowicie są metabolizowane w organizmie i posiadają odpowiednie stężenia zapewniając działanie przeciwwirusowe. Słaba biodostępność acyklowiru po podaniu doustnym przyczyniła się do rozpoczęcia poszukiwań nowych, pochodnych, które wykazywałyby się większą skutecznością i łatwością aplikacji. Zsyntetyzowano wiele pochodnych acyklowiru, wśród których najkorzystniejsze właściwości terapeutyczne wykazał walacyklowir, będący L-walininowym estrem acyklowiru. Podawany doustnie szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i prawie całkowicie metabolizowany jest do acyklowiru i L-waliny. Mechanizm tej przemiany jest wynikiem metabolizowania do acyklowiru w wątrobie przez swoiste hydrolazy wątrobowe. Acyklowir z kolei ulega dalszym przemianom do mono-, di- i trifosforanu acyklowiru, hamując wybiórczo syntezę DNA, a co za tym idzie – replikację herpeswirusów [56].

Przyswajalność acyklowiru po dodaniu jego L-walिनowego estru wynosi 54% i jest około 4 razy wyższa niż po doustnym podaniu acyklowiru, co umożliwia osiągnięcie stężenia leku we krwi porównywalnego ze stężeniem osiągalnym w wyniku aplikacji dożylniej [44]. Walacyklowir rekomendowany jest obecnie do leczenia opryszczki narządów płciowych zarówno pierwszych epizodów jak i zakażeń wtórnych [8, 11]. Jest także lekiem alternatywnym w terapii opryszczki

jamy ustnej, w profilaktyce zakażeń wirusem cytomegalii u pacjentów po przeszczepieniu oraz u pacjentów zakażonych wirusem HIV [46]. Efekty uboczne leczenia są podobne do obserwowanych w trakcie podawania acyklowiru. Możliwe jest pojawianie się zaburzeń żołądkowo-jelitowych, odwracalnych zaburzeń neurologicznych np. pobudzenia, drżeń, czy senności [56].

Chemiczna modyfikacja pencyklowiru, polegająca na modyfikacji w ester diacetyloksylowy, doprowadziła do powstania proleku – famcyklowiru, który jest dobrze wchłaniany po dodaniu doustnym i szybko metabolizowany do pencyklowiru na drodze deacetylacji w przewodzie pokarmowym, krwi i wątrobie. Następnie – już tylko w wątrobie – jest utleniany w pozycji 6 pierścienia purynowego [46]. Biodostępność famcyklowiru po podaniu doustnym sięga 77%. Jego eliminacja odbywa się głównie przez nerki w mechanizmie przesączania i czynnego wydzielania kanalikowego [44]. Aktywność przeciwwirusową wykazuje w odniesieniu do wirusa ospy wietrznej-półpaśca oraz jest skuteczny w leczeniu i profilaktyce opryszczki narządów płciowych zwłaszcza u chorych z niedoborami immunologicznymi [63]. Działanie niepożądane famcyklowiru często dotyczy ośrodkowego układu nerwowego. Bóle głowy występują u prawie 10% leczonych. Równie często pojawiają się zawroty głowy (12%), nudności (12,5%) i biegunki (7,7%) [56].

Walgancyklowir – będący estrem L-waliny i gancyklowiru podawany doustnie przypuszczalnie zastąpi podawany dożylnie gancyklowir zarówno w profilaktyce jak i leczeniu zakażeń HHV-5 [14, 47], które występują powszechnie u biorców narządów unaczynionych i szpiku kostnego. Profilaktyczna aplikacja acyklowiru zmniejsza wprawdzie częstość reaktywacji wirusa lub łagodzi skutki infekcji, przyczyniając się jednak do zwiększenia ryzyka wystąpienia bakteryjnych zakażeń odcewnikowych. Biodostępność gancyklowiru podawanego doustnie jest bardzo niska (około 6%), natomiast walgancyklowiru wynosi 60%. Prolek ulega przemianom do gancyklowiru przy udziale esteraz jelitowych i wątrobowych [14, 65].

7. Analogi nukleotydów

Są nowymi lekami przeciwwirusowymi. Do grupy tej należy adefovir, tenofovir i wykazujący właściwości przeciwherpeswirusowe cidofovir – analog monofosforanu nukleozydu [16]. Nie wymaga on pierwszego etapu fosforylacji wewnątrzkomórkowej, hamuje więc replikację wirusów nie posiadających kinezy tymidynowej, a aktywny metabolit – difosforan, jest konkurencyjnym inhibitorem wirusowych polimeraz DNA [64]. Lek obecnie stosowany jest w leczeniu zapalenia siatkówki o etiologii HHV-5 oraz w leczeniu

zakażeń wywołanych przez szczepy wirusów opryszczki opornych na acyklowir i foskarnet [4, 57] oraz szczepów HHV-5 opornych na gancyklowir oraz foskarnet [4, 9]. Jest skuteczny przeciwko szczepom wirusa ospy wietrznej i półpaśca [11], wirusa Epsteina-Barr oraz ma ograniczone działanie przeciw ludzkim papillomawirusom [44]. Najczęściej jest stosowany w dawce 5 mg/kg masy ciała, raz w tygodniu przez pierwsze 2 tyg., a następnie co drugi tydzień. Z uwagi na nefrotoksyczność jest stosowany w osłonie probenecidu i wymaga odpowiedniego nawodnienia pacjenta. Nie powinien być podawany wraz z innymi lekami wykazującymi działanie toksyczne wobec nerek, takimi jak: amfoterycyna B, aminoglikozydy czy niesteroïdowe leki przeciwzapalne [15]. Ze względu na małą biodostępność cidofowiru, najbardziej odpowiednią drogą podania jest aplikacja miejscowa i dożylna. Cidofovir dostępny jest w postaci żelu i kremu (1–3%) oraz proszku do sporządzenia roztworów do infuzji [30]. Lipidowym prolekiem cidofowiru podawanym drogą doustną jest HDP-CIDOFOWIR (HPMPC), który być może w przyszłości okaże się skuteczny w doustnym leczeniu zakażeń herpeswirusowych [64].

8. Foskarnet

Foskarnet, będący pochodną kwasu fosfonomrówkowego, jest organicznym analogiem nieorganicznego pirofosforanu. Nie ma budowy nukleozydowej, a w zakażonych komórkach chelatuje cynk i żelazo-metale odpowiedzialne za działanie dużej grupy polimeraz i nukleaz wirusowych [5]. Odmienne od pozostałych inhibitorów DNA polimerazy, nie potrzebuje do aktywacji działania kinaz. Mechanizm jego aktywności polega na bezpośrednim oddziaływaniu z polimerazą DNA herpeswirusów. Lek wiąże się z receptorem pirofosforanu polimerazy DNA, uniemożliwiając w ten sposób odłączenie pirofosforanu z trójfosforanu nukleotydu, jednocześnie blokując wydłużenie łańcucha dezoksyrybonukleinowego [59]. Wykazano, że działanie foskarnetu na polimerazę DNA wirusów opryszczki jest prawie 30-krotnie silniejsze niż na komórkową polimerazę DNA [5]. Lek nie jest metabolizowany i w ponad 80% wydalany z moczem w postaci niezmienionej. Dobre przenikanie przez barierę krew – płyn mózgowo-rdzeniowy stwarza możliwość zastosowania go w zakażeniach ośrodkowego układu nerwowego. Wykorzystywany jest w leczeniu chorych zakażonych wirusem HIV z objawami zapalenia siatkówki o etiologii HHV-5, w takich przypadkach podawany jest dożylnie. Nie zaleca się natomiast podawania foskarnetu do ciała szklistego, z uwagi na możliwość zmniejszenia ciśnienia śródgałkowego, łagodnego zapalenia tęczówki oraz niebezpieczeństwa

odklejania siatkówki. Foskarnet stosowany jest również w terapii zakażeń wirusem HHV-5 opornym na gancyklowir oraz wirusami z podrodziny *α-herpesvirinae* opornymi na acyklowir [49, 57]. Sól sodową foskarnetu podaje się również w postaci wlewów dożylnych. Wśród reakcji niepożądanych najczęściej wymienia się zaburzenia czynności wątroby, nerek, zaburzenia czynności przewodu pokarmowego (mdłości, wymioty) oraz zaburzenia równowagi elektrolitowej, głównie wapnia, fosforu, magnezu, potasu [5, 30, 59].

9. Nowe preparaty przeciwherpeswirusowe

Fomivirsen jest trójfosforanowym antysensowym analogiem oligonukleotydu komplementarnym do regionu natychmiastowego wczesnego (IE2) mRNA HHV-5. Dwuniciowy DNA składa się z nici sensownej i komplementarnej do niej nici antysensownej. W czasie transkrypcji ta druga nić jest wykorzystywana jako wzór dla powstającego mRNA, który przemieszcza się z jądra komórki do rybosomów i stanowi matrycę dla dalszej produkcji białek. Leki antysensowne są więc fragmentami RNA komplementarnymi do powstającego w każdej zakażonej komórce wirusowego mRNA. Po ich połączeniu – hybrydyzacji – mRNA ulega degradacji, co blokuje proces translacji wirusa. Fomivirsen jest jedynym ze stosowanych leków wykazujących aktywność przeciwko HHV-5, który nie ingeruje w proces replikacji [14]. Znalazł zastosowanie w leczeniu zapalenia siatkówki o etiologii HHV-5 w postaci bezpośrednich iniekcji do gałki ocznej w sytuacjach, gdy brak jest odpowiedzi klinicznej lub w przypadku wystąpienia poważnych działań ubocznych związanych z aplikacją leków pierwszego rzutu [32, 68]. Wykazuje większą selektywność i skuteczność niż inne leki przeciwcytomegalowirusowe. Może być używany w skojarzeniu z gancyklowirem i foskarnetem [33]. Fomivirsen powoduje przejściowy spadek ciśnienia śródgałkowego i/lub stan zapalny, który ustępuje po zastosowaniu kortykosteroidów [64, 67]. Należy dodać, że pierwsza chemiczna synteza tiofosforanowych analogów oligonukleotydów została opisana przez Polaka prof. Wojciecha J. Steca w roku 1983 r. Po 15 latach badań okazało się, że związki tej klasy zostały zatwierdzone przez amerykańską agendę rządową FDA (Food and Drug Administration) jako leki przeciwwirusowe. Ponieważ pierwsza metoda syntezy tiofosforanowych analogów oligonukleotydów była niestereospecyficzna, Stec wraz z zespołem naukowym łódzkiego Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN opracowali w latach 1987–1989 nową, stereospecyficzną metodę, która została opatentowana w USA, Japonii oraz w Europejskim Urzędzie Patentowym [70].

Maribavir, będący nową pochodną benzimidazolu o działaniu przeciwwirusowym, wykazuje aktywność wobec większości laboratoryjnych i klinicznych szczepów wirusów cytomegalii, w tym również opornych na gancyklowir. Dobrze wchłania się po podaniu doustnym, a maksymalne stężenie w surowicy krwi osiąga po 1–3 godzinach [14]. Niestety, podobnie jak w przypadku gancyklowiru, mutacja w obrębie jednego genu (UL27) powoduje znaczący wzrost oporności cytomegalowirusa na działanie tego leku [10]. Doniesienia z ostatnich lat wskazują także na potencjalne działanie terapeutyczne maribaviru w stosunku do wirusa Epsteina-Barra [25, 26].

Tomeglovir jest nienukleotydowym inhibitorem późnej fazy replikacji HHV-5, który hamuje dojrzewanie cząstek wirusowych. W warunkach *in vitro* tomeglovir okazał się podobnie jak maribavir czynny wobec laboratoryjnych i klinicznych szczepów HHV-5, w tym również opornych na gancyklowir [21, 64, 69].

10. Podsumowanie

Ze względu na częstość występowania przedsatwiocieli *Herpesviridae* w populacji, analogi nukleozydów są z pewnością taką klasą związków chemicznych, która obecnie posiada najistotniejsze znaczenie w terapii zakażeń o etiologii herpeswirusowej. Wspólną ich cechą jest bardzo duża aktywność terapeutyczna oraz wysoka selektywność działania. Związki te jako środki przeciwwirusowe obciążone są także pewnymi wadami. Mimo dość wysokiej selektywności przy stosowaniu klinicznym, mogą czasami wywoływać efekty uboczne, które jak wiadomo w mniejszym lub większym stopniu, posiadają wszystkie chemioterapeutyki.

Prowadzone obecnie badania, które mają na celu syntezę nowych potencjalnych związków wykazujących aktywność przeciwwirusową postępują dwukierunkowo. Na szeroką skalę syntetyzuje się nowe pochodne już istniejących leków o potwierdzonej skuteczności, drugi zaś kierunek ma związek z poszukiwaniem leków pochodzenia naturalnego, uzyskiwanych przeważnie z roślin, grzybów czy gąbek [36]. Mimo syntetyzowania coraz większej ilości czasem bardzo skomplikowanych strukturalnie związków, tylko niewielka ich część okazuje się rzeczywiście przydatna w terapii przeciwwirusowej [36].

Postęp w rozwoju możliwości terapeutycznych oraz korzystanie z takich metod jak przeszczepianie narządów unaczynionych oraz szpiku kostnego, powoduje że w związku z głęboką immunosupresją zakażenia herpeswirusowe mogą mieć ciężki przebieg i często prowadzić do zgonu. Dodatkowo w grupie pacjentów z obniżoną wydolnością układu immunologicznego poważnym problemem staje się selekcja szczepów

opornych na dostępne preparaty przeciwwirusowe. Uwzględniając jednak częstość reaktywacji herpeswirusów w populacji oraz potencjalne koszty leczenia, zwłaszcza u chorych z immunosupresją, wskazana jest intensyfikacja prac nad opracowaniem skutecznych i powtarzalnych metod biologii molekularnej do wykrywania tych mutacji, które warunkują oporność na stosowane obecnie analogi nukleozydów.

Piśmiennictwo

- Bacon H.T., Levin J.M., Leary J.J., Starisky T.R., Sutton D.: Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 114–128 (2003)
- Balfour H.H.: Drug therapy: antiviral drugs. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1255–1268, 1999
- Banks T.A., Rouse B.T.: Herpesviruses – immune escape artists? *Clin. Infect. Dis.* **14**, 933–941, (1992)
- Beadle J.R., Hartline C., Aldern K.A., Rodriguez N., Harden E., Kern E.R., Hostetler K.Y.: Alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2381–2386 (2002)
- Bean B.: Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 146–182 (1992)
- Beauchamp L.M., Onr S.F., De Miranda P.: Amino-acid ester prodrugs of acyclovir. *Antivir. Chem. Chemoth.* **3**, 157–164 (1992)
- Boivin G., Erice A., Crane D.D., Balfour H.H.: Acyclovir susceptibilities of herpes simplex virus strains isolated from solid organ transplant recipients after acyclovir or ganciclovir prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 357–359 (1993)
- Brantley J.S., Hicks L., Sra K., Tying S.K.: Valacyclovir for the treatment of genital herpes. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **4**, 367–376 (2006)
- Cesaro S., Zhou X., Manzardo C., Buonfrate D., Cusinato R., Tridello G., Mengoli C., Palu G., Messina C.: Cidofovir for cytomegalovirus reactivation in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Virol.* **34**, 129–132 (2005)
- Chou S., Marousek G.I., Senters A.E., Davis M.G., Biron K.K.: Mutations in the human cytomegalovirus UL27 gene that confer resistance to maribavir. *J. Virol.* **78**, 7124–7130 (2004)
- Corey L. Challenges in genital herpes simplex virus management. *J. Infect. Dis.* **186**, 29–33 (2002)
- Datta A.K., Colby B.M., Shaw J.E., Pagano J.S.: Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5163–5166 (1980)
- De Clercq E.: New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1079–83 (2003)
- De Clercq E.: Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* **30**, 115–133 (2004)
- De Clercq E.: Nucleoside analogues exerting antiviral activity through a non-nucleoside mechanism. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*, **23**, 457–470 (2004)
- De Clercq E., Holy A.: Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**, 928–940 (2005)
- Dzierżanowska D., Jeljaszewicz J. (red.): Przewodnik antybiotykoterapii. Wyd. α -medica press, Bielsko-Biała 2004, s. 47
- Elion G.B., Furman P.A., Fyfe J.A.: Selectivity of action of an anti herpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5716–5720 (1977)
- Elion G.B.: The chemotherapeutic exploitation of virus-specified enzymes. *Adv. Enzym. Regul.* **18**, 53–66 (1980)
- Elion G.B.: Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.* **73**, 7–13 (1982)
- Emery V.C., Hassan-Walker A.F.: Focus on new drugs in development against human cytomegalovirus. *Drugs*, **62**, 1853–1858 (2002)
- Feldman S., Rodman J., Gregory B.: Excessive serum concentrations of acyclovir and neurotoxicity. *J. Infect. Dis.* **157**, 385–388 (1988)
- Field H.J.: Herpes Simplex Virus antiviral drug resistance-current trends and future prospects. *J. Clin. Virol.* **21**, 261–269 (2001)
- Furman P.A., St Clair M.H., Fyfe J.A., Rideout J.L., Keller P.M., Elion G.B.: Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine and its triphosphate. *J. Virol.* **32**, 72–77 (1979)
- Gershburg E., Hong K., Pagano J.S.: Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1900–1903 (2004)
- Gershburg E., Pagano J.S.: Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 277–281 (2005)
- Gilbert C., Bestman-Smith J., Boivin G.: Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms *Drug Res. Updat.* **5**, 88–114 (2002)
- Grey F., Sowa M., Collins P., Fenton R.J., Harris W., Snowden W., Efstathiou S., Darby G.: Characterization of a neurovirulent acyclovir-resistant variant of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* **84**, 1403–1410 (2003)
- Griffiths P.D.: Viral complications after transplantation. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**, 91–106 (1995)
- Gumułka W.: w: [red.] Jańca W., Krupińska J.: Farmakodynamika: podręcznik dla studentów farmacji. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2002, s. 1014–1021
- Harris W., Collins P., Fenton R.J., Snowden W., Sowa M., Darby G.: Phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates of herpes simplex virus resistant to acyclovir. *J. Gen. Virol.* **84**, 1393–1401 (2003)
- Jabs D.A., Griffiths P.D.: Fomivirsen for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Am. J. Ophthalmol.* **133**, 552–556 (2002)
- Khare M.D., Sharland M.: Cytomegalovirus treatment options in immunocompromised patients. *Expert Opin. Pharmacother.* **2**, 1247–1257 (2001)
- Kimberlin D.W., Whitley R.J.: Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance and future implications. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 403–421 (1996)
- Kimberlin D.W.: Acyclovir derivatives and other new antiviral agents. *Sem. Ped. Infect. Dis.* **3**, 224–234 (2001)
- Krawczyk E., Łuczak M.: Aktywność przeciwwirusowa substancji pochodzenia naturalnego oraz ich pochodnych. *Post. Mikrobiol.* **44**, 239–252 (2005)
- Ljungman P., Oberg G., Aschan J., Ehrnst A., Lonnqvist B., Pauksen K., Sulila P.: Foscarnet for pre-emptive therapy of CMV infection detected by a leukocyte-based nested PCR in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* **18**, 565–568 (1996)

38. Mahony W.B., Domin B.A., McConnell R.T., Zimmerman T.P.: Acyclovir transport into human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 9285–9291 (1988)
39. Majewska A., Łuczak M., Cieśluk B.: Standardy leczenia infekcji wywołanych przez herpes simplex virus (HSV) – terapia alternatywna i chemioterapia. *Zakażenia*, zesz. **2**, 58–61 (2006)
40. Markham A., Faulds D.: Ganciclovir: an update of its therapeutic use in cytomegalovirus infections. *Drugs*, **48**, 455–484 (1994)
41. McLaren C., Chen M.S., Ghazzouli I., Saral R., Burns W.H.: Drug resistance patterns of Herpes Simplex Virus isolates from patients treated with acyclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 740–744 (1985)
42. Minson A. C., Davison A., Eberle R.: Herpesviruses [w:] Virus taxonomy – classification and nomenclature of viruses. Seventh report of ICTV. Van Regenmortel M.H.V., Faquet C.M., Bishop D.H.L. (red.) Academic Press, San Diego 2000, s. 203–225
43. Moomaw M.D., Cornea P., Rathbun R.C., Wendel K.A.: Review of antiviral therapy for herpes labialis, genital herpes and herpes zoster. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **1**, 283–295 (2003)
44. Morfin F., Thouvenot D.: Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J. Clin. Virol.* **26**, 29–37 (2003)
45. Morfin F., Bilger K., Boucher A., Thiebaut A., Najioullah F., Bleyzac N., Raus N., Bosshard S., Aymard M., Michallet M., Thouvenot D.: HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *J. Clin. Virol.* **30**, 341–345 (2004)
46. Naesens L., De Clercq E.: Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes*, **8**, 12–16 (2001)
47. Pereyra F., Rubin R.H.: Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**, 357–361 (2004)
48. Razonable R.R., Paya C.V.: Herpesvirus infections in transplant recipients: current Challenges in the Clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes*, **10**, 60–65 (2003)
49. Reusser P., Einsele H., Lee J., Volin L., Rovira M., Engelhard D., Finke J., Cordonnier C., Link H., Ljungman P.: Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **99**, 1159–1164 (2002)
50. Roizman B.: The Family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425–449 (1992)
51. Safrin S., Phan L.: In vitro activity of penciclovir against clinical isolates of acyclovir-resistant and foscarnet-resistant herpes simplex virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2241–2243 (1993)
52. Schaeffer H.J., Beauchamp L., de Miranda P., Elion G.B., Bauer D., Collins J.P.: 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, **272**, 583–585 (1978)
53. Schnipper L.E., Crumpacker C.S.: Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine: role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2270–2273 (1980)
54. Singh N., Yu V.L., Micles L., Wagener M.M., Miner R.C., Gayowski T.: High-dose acyclovir compared with short-course preemptive ganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. A randomized trial. *Ann. Inter. Med.* **120**, 375–381 (1994)
55. Smee D.F., Martin J.C., Verheyden J.P., Matthews T.R.: Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 676–682 (1983)
56. Snell N.J.C.: New treatment for viral respiratory tract infections-opportunities and problems. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 251–259 (2001)
57. Stránská R., Schuurman R., Nienhuis E., Goedegebuure I.W., Polman M., Weel J.F., Wertheim-Van Dillen P.M., Berkhout R.J.M., Van Loon A.M.: Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J. Clin. Virol.* **32**, 7–18 (2005)
58. Suzutani T., Ishioka K., De Clercq E., Ishibashi K., Kaneko H., Kira T., Hashimoto K., Ogasawara M., Ohtani K., Wakamiya N., Saijo M.: Differential mutation patterns in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1707–1713 (2003)
59. Wagstaff A.J., Bryson H.M.: Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs*, **48**, 199–226 (1994)
60. Waugh S.M.L., Pillay D., Carrington D., Carman W.F.: Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). *J. Clin. Virol.* **25**, 241–266 (2002)
61. Weinberg A., Bate B.J., Masters H.B., Schneider A.: In vitro activities of penciclovir and acyclovir against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 2037–2038 (2002)
62. Whitley R.S., Gnann J.W. Jr: Acyclovir. A decade later. *N. Engl. J. Med.* **327**, 782–789 (1992)
63. Whitley R.: New approaches to the therapy of HSV infections. *Herpes*, **13**, 53–55 (2006)
64. Wiater E., Jędrzejczak W.W.: Nowe leki przeciwwirusowe. *Współczes. Onk.* **2**, 65–69 (2004)
65. Wiltshire H., Zuideveld K.P., Hirankarn S., Farrell C., Paya C., Pescovitz M.D., Humar A., Dominguez E., Washburn K., Blumberg E., Alexander B., Freeman R., Heaton N.: Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, **79**, 1477–1483 (2005)
66. Wolf R., Wolf D., Orion E., Matz H.: Long-term Prophylactic antiviral therapy for recurrent herpes simplex: the controversy goes on. *Clin. Dermat.* **21**, 164–167 (2003)
67. Bassett Healthcare Website 25.10.2006 (online): <http://www.bassett.org/pharmacy/drugInfo/showMono.aspx?cpnum=2105&name=Fomivirsen&pid=1015>
68. ISIS Pharmaceuticals 25.10.2006 (online): <http://www.sispharm.com/vitravene.html>
69. US National Institute of Health 25.10.2006 (online): <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00223925>
70. Nauka w Polsce 25.10.2006 (online): http://www.nauka.wpolsce.pap.pl/nauka/index.jsp?place=J03&news_cat_id=168&news_id=8946&layout=0&forum_id=3031&page=text

**Informacja dla Autorów prac drukowanych
w *Postęпах Mikrobiologii***

Uprzejmie informujemy PT Autorów *PM*, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku nastąpi zmiana w zasadach przyjmowania prac do druku w naszym piśmie. Autorzy manuskryptów proszeni są (od zeszytu numer 1/2008) o wnoszenie opłat (za każdy artykuł 250 PLN) na konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów: Bank BPH S.A. 53 1060 0076 0000 3200 0105 5596.

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z kopią potwierdzenia wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. Do dowodu wpłaty należy dołączyć (na osobnej kartce) informacje zawierające tytuł pracy, nazwisko autora korespondencyjnego oraz dane do wystawienia faktury VAT (NIP, adres instytucji lub osoby fizycznej).

W przypadku niedopuszczenia pracy do druku zwrot opłaty dokonany będzie przez księgowość PTM.

Redakcja

INFORMACJE

Fundacja na Rzecz Polskiej Mikrobiologii

przypomina, że

termin składania wniosków o przyznanie naukowego stypendium wyjazdowego mija z końcem grudnia każdego roku. Regulamin przyznawania stypendium wyjazdowego opublikowany został w *Postęпах Mikrobiologii* w roku 2002 (tom **39**, zeszt 4).

Anna Maria Łasica, Anna Staroń, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka*

Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

Wpłynęło w grudniu 2006 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka elementów systemu Dsb *E. coli*. 2.1. Szlak utleniania – DsbA i DsbB. 2.2. Szlak redukcji/izomeryzacji – DsbC, DsbD i DsbG. 2.3. Dodatkowe elementy szlaku redukcji/izomeryzacji – CcmG (DsbE) i DsbF. 3. Wprowadzanie mostków dwusiarczkowych do białek bakterii gramdodatnich. 3.1. *Bacillus subtilis* i *Bacillus brevis*. 3.2. *Staphylococcus aureus*. 3.3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. Podsumowanie

Characterization of prokaryotic Dsb proteins

Abstract: Many periplasmic proteins of Gram-negative pathogens which contain two or more cysteine residues gain their proper structure as a result of an insertion of disulfide bridges. The process is facilitated by a Dsb (disulfide bond) family of the redox proteins. In eukaryotes, disulfide bond formation and isomerization is catalyzed in the endoplasmic reticulum by protein disulphide isomerase (PDI) and related proteins, whereas in Gram-negative prokaryotes the process takes place in the bacterial periplasm. Among the disulfide oxidoreductases the most extensively studied are those of *E. coli* which generate two separate, non-interacting pathways functioning in the periplasmic space: oxidative pathway (DsbA, DsbB) and isomerization pathway (DsbC, DsbD, DsbE, DsbG). They have been characterized through a combination of genetic and biochemical approaches. This review focuses on the pathways of disulfide bond formation and isomerization in bacteria, taking *Escherichia coli* as a general model. It also describes recent findings concerning disulfide bond formation in Gram-positive bacteria, which do not have a periplasm.

1. Introduction. 2. Characterization of *E. coli* Dsb proteins. 2.1. Oxidation pathway – DsbA and DsbB. 2.2. Reduction/isomerization pathway – DsbC, DsbD and DsbG. 2.3. Additional elements of the reduction/isomerization pathways – CcmG (DsbE) and DsbF. 3. Disulfide bond formation in Gram-positive bacteria. 3.1. *Bacillus subtilis* and *Bacillus brevis*. 3.2. *Staphylococcus aureus*. 3.3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. Summary

Słowa kluczowe: dsb, fałdowanie białek, mostki dwusiarczkowe, szlaki utleniania i redukcji/izomeryzacji

Key words: dsb, protein folding, disulfide bonds, oxidation and reduction/isomerization pathways

1. Wstęp

Białka, powstające jako liniowy łańcuch polipeptydowy, aby osiągnąć swoją docelową funkcjonalną strukturę przestrzenną muszą ulec licznym przekształceniom konformacyjnym. Bardzo często dochodzi do dalszych modyfikacji potranslacyjnych, polegających na dołączaniu do łańcucha białkowego dodatkowych elementów takich jak grupy węglowodanowe, fosforanowe czy reszty kwasów tłuszczowych. Procesy te muszą odbywać się w stosownym czasie oraz odpowiednich przedziałach komórkowych, dlatego też nie-raz warunkowane są obecnością białek opiekuńczych odpowiedzialnych za ochronę protein przed zbyt wczesnym nieswoistym zwijaniem lub nieprawidłowymi interakcjami z innymi cząsteczkami. Dodatkowo molekularne chaperoniny zarówno cyto- jak i peryplazmatyczne, zdolne do hydrofobowych oddziaływań z białkami sekrecyjnymi, utrzymują je w formie strukturalnej odpowiedniej do transportu. Struktury przestrzenne białek są ściśle zależne od ich składu aminokwasowego. Poprzez wytworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami NH i CO w szkieletce peptydowym białka zwijają się w charakterystyczne układy: α -helisy, β -harmonijki, zwrotu β lub pętli Ω , uzyskując tzw.

strukturę drugorzędową. Kolejnymi etapami na drodze do uzyskania przez białka konformacji natywnej są struktury trzeciorzędowe (przestrzenne ułożenie łańcucha białkowego) – powstające poprzez oddziaływanie łańcuchów bocznych aminokwasów, wiązanie jonów metali lub specyficznych jednostek niebiałkowych (grup prostetycznych) oraz czwartorzędowe, wytwarzane jako skutek oddziaływań pomiędzy białkowymi podjednostkami [6].

Najrzadziej występującym aminokwasem w białkach większości przebadanych organizmów jest cysteina [59], która jeśli pozostaje konserwowana w obrębie sekwencji aminokwasowej homologicznych białek, pełni kluczową rolę w ich strukturze i funkcji. Cysteina zawiera w łańcuchu bocznym grupę tiolową (hydro-sulfidową) SH uważaną za najbardziej reaktywną grupę istniejącą w białkach. Może ona podlegać różnym odwracalnym modyfikacjom takim jak: S-nitrozylacja (S-NO) [24], S-glutationylacja (S-SG) [25], S-hydroksylacja (S-OH, tworzenie kwasu sulfenowego) [67] oraz tworzenie mostków dwusiarczkowych (disulfidowych, S-S) [6]. Przykładem białka podlegającego wszystkim wymienionym modyfikacjom jest białko OxyR (rodzina LysR czynników transkrypcyjnych) *E. coli* [46]. Reszty cysteinowe są również istotnymi

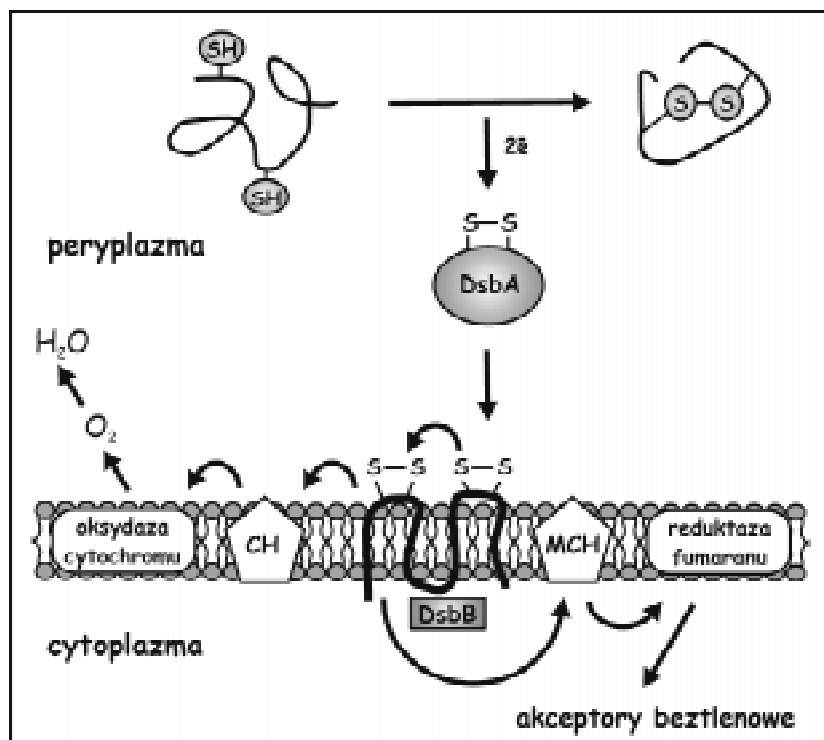
składnikami kompleksów białkowych łańcucha oddechowego, gdzie biorą udział w tworzeniu centrów żelazo-siarkowych (Fe-S).

Uzyskiwanie struktury trzecio- i czwartorzędowej przez białka zawierające więcej niż jedną cysteinę wymaga często wprowadzania poprzecznych mostków dwusiarczkowych. Proces ten przebiega w środowisku utleniającym. W komórkach eukariotycznych zachodzi w retikulum endoplazmatycznym i katalizowany jest przez izomerazę PDI (*protein disulfide isomerase*) oraz białko Ero1 (*ER oxidoreductin 1*) [71, 76], a w komórkach prokariotycznych przeprowadzany jest poza cytoplazmą – u bakterii Gram-ujemnych na terenie przestrzeni peryplazmatycznej. Początkowo sądzono, że w komórkach drobnoustrojów przebiega on samistnie (pod wpływem utleniającego potencjału środowiska), jednak w 1991 roku w komórkach *E. coli* odkryto pierwsze z siedmiu białek odpowiedzialnych za katalizę wiązań dwusiarczkowych i nazwano je DsbA [5]. W następnych latach zidentyfikowano i scharakteryzowano przy użyciu różnorodnych metod genetycznych i biochemicznych kolejne proteiny oznaczone literami od B do G, tworząc rodzinę oksydoreduktaz Dsb (*disulfide bond formation*). Wszystkie białka Dsb zawierają ściśle konserwowany motyw aktywnych cystein CXXC znajdujący się w domenie o trzeciorzędowej strukturze typowej dla białek nadrodziny tioredok-

ksyny I (*thioredoxin-like fold*). Fragment ten zbudowany jest z czterech β -harmonijek otoczonych trzema helisami typu α [3]. Wyjątek stanowi białko DsbB, w którym brak jest układu przestrzennego charakterystycznego dla tioredoksyny.

Białka Dsb uczestniczą w dwóch odrębnych szlakach metabolicznych: w szlaku utleniania (DsbA i DsbB) (Rys. 1) oraz izomeryzacji/redukcji (DsbC-G) (Rys. 2) [61]. Głównym białkiem *E. coli* wprowadzającym wiązania dwusiarczkowe jest peryplazmatyczne białko DsbA. Za jego reoksydację (regenerację aktywnej utlenionej formy) odpowiedzialne jest białko DsbB, będące integralnym składnikiem błony cytoplazmatycznej a elektrony przekazywane są na ostateczne akceptory przez kompleksy białkowe wchodzące w skład łańcucha oddechowego. DsbC i DsbD odgrywają rolę w izomeryzacji nieprawidłowych mostków dwusiarczkowych. Źródłem elektronów w szlaku redukującym jest cytoplazmatyczny szlak tioredoksyny. Rola trzech pozostałych białek szlaku izomeryzacji (DsbE-G) nie jest do końca wyjaśniona, przypuszcza się, że również biorą udział w naprawie „błędnie” utworzonych mostków dwusiarczkowych oraz uczestniczą w wytwarzaniu aktywnej, zredukowanej formy apocytochromu *c* zdolnej do wiązania grupy prostetycznej.

Uszkodzenie systemu Dsb wywołuje w komórkach *E. coli* efekt plejotropowy i ma wpływ na stabilność



Rys. 1. Wprowadzanie mostków dwusiarczkowych w komórkach *E. coli* – szlak utleniania (reprodukowano z *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, Pathways of disulfide bond formation in *E. coli*. Messens J., Collet J.F. 1052 γ 2006 za zgodą wydawcy – Elsevier [54]).

CH – chinon; MCH – menachinon, pozostałe objaśnienia w tekście.

i aktywność w komórce wielu pozacytoplazmatycznych białek. Mutanty *E. coli* w genach *dsb* wyróżniają się akumulacją niewłaściwie sfałdowanych białek, z których część jest degradowana (np. OmpA czy alkaliczna fosfataza), obniżonym tempem wzrostu na podłożach minimalnych, zwiększoną wrażliwością na benzylpenicylinę, związki redukujące (np. DTT) i jony Cd^{2+} i Hg^{2+} , a także utratą zdolności do wytwarzania funkcjonalnych rzęsek, fimbrii adhezyjnych oraz pili płciowych [5, 56, 73]. Mutanty wielu gatunków bakterii patogennych z uszkodzonym systemem Dsb np. *Bordetella pertussis*, *Shigella flexnerii* czy *Vibrio cholerae*, charakteryzują się obniżoną zjadliwością.

Jak wspomniano wyżej, zjawisko uzyskiwania prawidłowej konformacji białek poprzez wprowadzanie wiązań dwusiarczkowych znane jest również w komórkach eukariotycznych (izomeraza PDI). W 1998 roku J o l y i wsp. udowodnili, że nadekspresja genów *dsbA* i *dsbC* zwiększa dwukrotnie poziom wytwarzanego w komórkach *E. coli* insulionopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I, *insulin-like growth factor-I*) [38]. Odkrycie to zainicjowało szerokie zastosowanie białek Dsb w biotechnologii do nadprodukcji białek eukariotycznych w ekspresyjnych układach prokariotycznych.

2. Charakterystyka elementów systemu Dsb *E. coli*

2.1. Szlak utleniania – DsbA i DsbB

Peryplazmatyczne białko **DsbA**, będące głównym katalizatorem reakcji formowania wiązań dwusiarczkowych (disiarczków) zostało zidentyfikowane niezależnie w dwóch laboratoriach. B a r d w e l l i wsp. do badań wykorzystali sztucznie skonstruowaną fuzję β -galaktozydazy z białkiem błony wewnętrznej MalF. W szczepie dzikim *E. coli* β -galaktozydaza, składnik fuzji, częściowo wintegrowana w błonę wewnętrzną ulegała nieprawidłowemu zwinięciu skutkiem wprowadzenia mostków dwusiarczkowych do fragmentu białka znajdującego się na terenie peryplazmy, co powodowało utratę aktywności enzymatycznej. W szczepie *dsbA*⁻ mostki disulfidowe nie były tworzone i cytoplazmatyczny fragment białka fuzyjnego wykazywał zdolność do hydrolizy wiązania β -1,4-glikozydowego [5]. Druga grupa badawcza poddała analizie mutanty defektywne w prawidłowym fałdowaniu alkalicznej fosfatazy, białka zawierającego dwa mostki dwusiarczkowe [42].

DsbA to białko o masie cząst. 21 kDa, obecne na terenie peryplazmy *in vivo* w formie utlenionej, zawiera charakterystyczny motyw CXXC oraz domenę tioredoksynową [47]. Prolina 151 w konfiguracji *cis* zlokalizowana w natywnym białku blisko centrum katalitycznego odgrywa kluczową rolę w tworzeniu

przejściowych, mieszanych kompleksów pomiędzy DsbA *E. coli* a białkami substratowymi jak również DsbA i DsbB [41]. Wysoki potencjał redox wynoszący -120 mV sprawia, że DsbA jest niezwykle reaktywne i wiązania disulfidowe wprowadzane są do substratów bardzo szybko po ich przetransportowaniu na teren peryplazmy [78]. Krystalograficzna analiza rentgenowska białka DsbA w obu stanach redox oraz analiza jego oddziaływań z substratem (spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – NMR) wykazały, że DsbA specyficznie wiąże niezwiniete białka w zawierającym hydrofobowe aminokwasy zagłębieniu (*groove*) za pomocą wiązań niekowalencyjnych [14, 29]. W początkowej fazie reakcji dochodzi do utworzenia przejściowego kompleksu pomiędzy substratem a pierwszą cysteiną motywu CXXC DsbA (Cys30) a następnie do przeniesienia całego wiązania dwusiarczkowego na substrat i uwolnienia zredukowanego DsbA [78]. Za przywrócenie mu aktywnej formy (utlenienie cystein centrum katalitycznego) odpowiada błonowe białko **DsbB**, co potwierdziły liczne analizy biochemiczne i genetyczne. Doświadczenia te wykazały m.in. istnienie przejściowych kompleksów DsbA-DsbB, akumulację DsbA w zredukowanej formie w komórkach mutantu *dsbB*⁻ oraz niezdolność mutantów *dsbB*⁻ do wytwarzania funkcjonalnych rzęsek i wzrostu w obecności DTT. Plejotropowy efekt mutacji *dsbB*⁻ pokrywa się z fenotypem mutacji w genie *dsbA* i może być komplementowany przez obecność cystyny w podłożu hodowlanym [4, 15, 30, 49, 56].

Białko DsbB o masie cząst. 20 kDa zbudowane jest z czterech helis transbłonowych (TM) wbudowanych w błonę wewnętrzną. W każdej z dwóch pętli peryplazmatycznych znajduje się para aktywnych cystein, z których pierwsza (Cys41-Cys44) tworzy charakterystyczny motyw CXXC. Mutacja punktowa tripletu nukleotydowego kodującego którąkolwiek z cystein prowadzi do utraty aktywności enzymu. W przeciwieństwie do pozostałych elementów systemu białko DsbB nie posiada domeny tioredoksynowej [30, 37, 48].

Mechanizm utrzymujący elementy szlaku utleniania w aktywnej formie ma charakter kaskadowy i działa w powiązaniu z przekaźnikami elektronów łańcucha oddechowego. Tiolowe oksydoreduktazy *E. coli* należące do nadrodziny tioredoksyny charakteryzują się różnymi potencjałami redox: od -270 mV (tioredoksyna) do -122 mV (DsbA). Po wprowadzeniu wiązania dwusiarczkowego do białka substratowego DsbA ulega redukcji. Jego reoksydacja następuje poprzez interakcję pomiędzy Cys30 DsbA i Cys104 DsbB znajdującą się w drugiej pętli peryplazmatycznej. Początkowo, proponowany układ przepływu elektronów z DsbA na DsbB budził kontrowersje ze względu na zbyt niski potencjał redox pary Cys104-Cys130 (-186 mV) białka DsbB w stosunku do pary Cys30-Cys33 DsbA

(−120 mV). Jednak obecność drugiej pary reszt cysteinowych (Cys41-Cys44) w białku DsbB o potencjale −69 mV powoduje, że jest ono najsilniejszym utleniaczem w komórce bakteryjnej. W efekcie, po uwolnieniu utlenionego DsbA z przejściowego kompleksu grupy tiolowe z drugiej pętli DsbB są utleniane przez parę reszt cysteinowych z pętli pierwszej (Cys41-Cys44), a elektrony przekazywane są na chinon (ubichinon w warunkach tlenowych lub menachinon w warunkach beztlenowych). Następnie pompy protonowe łańcucha oddechowego katalizują przeniesienie elektronów do końcowych akceptorów [28]. Częsteczką chinonu oddziałuje bezpośrednio z regionem NH₂-HTMLQLY białka DsbB znajdującym się na początku drugiej pętli peryplazmatycznej (pozycje 91–97) [77]. Do wyjaśnienia pozostaje oznaczenie liczby cząsteczek wiązanego chinonu (pojedyncza lub dwie, z których jedna jest wymienna) [35, 62]. Dodatkowo do prawidłowego funkcjonowania układu chinon-DsbB niezbędna jest również obecność reszty argininowej w pozycji 48 (ostatnia reszta aminokwasowa pierwszej pętli peryplazmatycznej) konserwowanej we wszystkich białkach DsbB [40]. Ostatecznymi akceptorami elektronów są: tlen (warunki tlenowe), fumaran (z wykorzystaniem FAD) lub azotan (warunki beztlenowe) [2]. Reakcje te katalizowane są odpowiednio przez oksydazę cytochromową, reduktazę fumaranu lub reduktazę azotanową. Schemat szlaku utleniania przedstawiono na rysunku 1.

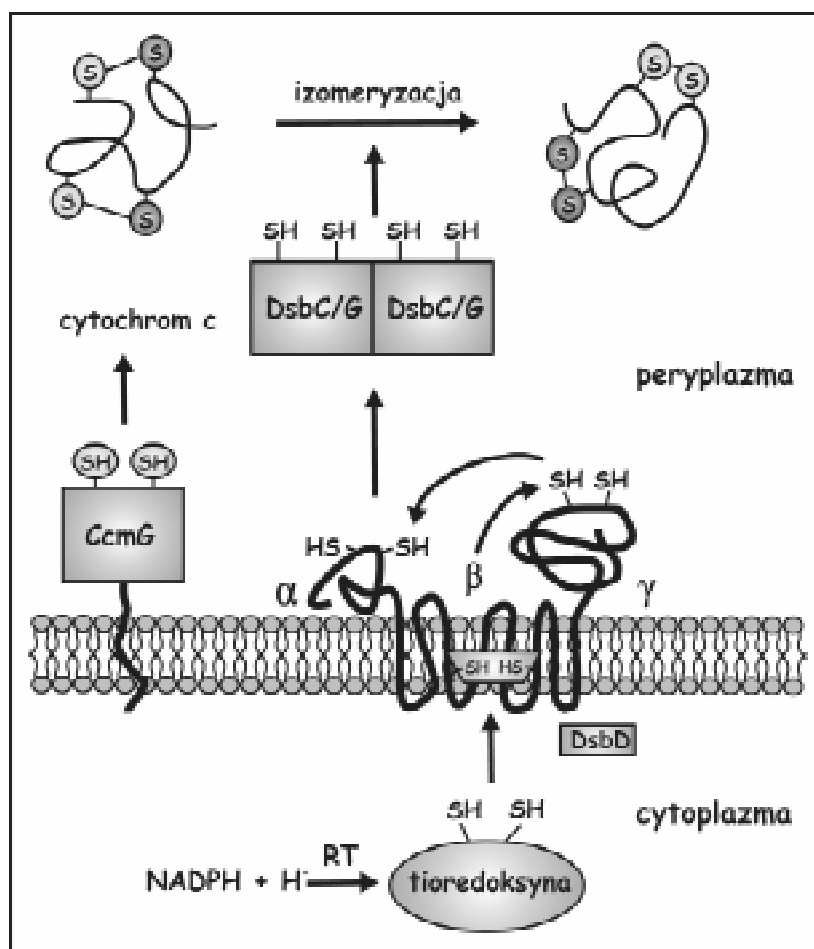
2.2. Szlak redukcji/izomeryzacji – DsbC, DsbD i DsbG

DsbA wprowadza mostki dwusiarczkowe niezwykle szybko, co dla białek zawierających więcej niż jedną parę cystein często oznacza uzyskanie niewłaściwej konformacji poprzez utworzenie nieprawidłowych disiarczków. Najczęściej dotyczy to białek, których cysteiny w strukturze pierwszorzędowej są położone blisko siebie (*consecutive disulfide bonds*). Białkiem, które posiada aktywność umożliwiającą naprawę błędnie wstawionych mostków dwusiarczkowych jest **DsbC**. W wyniku jego działania nieprawidłowe pary cystein mogą ulec reorganizacji do pożądanego natywnego układu. W procesie tym nazwanym izomeryzacją, DsbC będące w aktywnej zredukowanej formie, tworzy przejściowy kompleks ze źle zwiniętym białkiem substratowym, a następnie dokonuje rearanżacji par cysteinowych uwalniając prawidłowo zwinięte białko jednocześnie samo pozostając w formie zredukowanej [63]. Bader i wsp. udowodnili, że DsbA całkowicie utlenia RNazę A (4 mostki disulfidowe), ale pozostaje ona nieaktywna i dopiero izomeryzacja wiązań dwusiarczkowych przez DsbC prowadzi do uzyskania aktywnego enzymu [2]. *E. coli* posiada homolog DsbC – białko **DsbG** (24% podobieństwo

sekwencji aminokwasowej [51]), którego funkcja nie jest do końca poznana. Wiadomo, że nadprodukcja tej proteiny może komplementować brak DsbC w procesie zwijania niektórych białek np. bydłowego inhibitora trypsyny trzustkowej (BPTI) [7]. Jak dotąd jednak nie odnaleziono żadnych naturalnych substratów DsbG. RNaza A czy białko MepA – substraty DsbC *in vivo* nie podlegają izomeryzacji przez DsbG [34].

DsbC jest homodimerycznym (2×23 kDa) białkiem peryplazmatycznym zawierającym dwie pary cystein, z których pierwsza (Cys98 i Cys101) tworzy aktywny motyw centrum katalitycznego CXXC, a druga (Cys141 i Cys163) pełni rolę strukturalną i nie jest ściśle konserwowana wśród DsbC innych gatunków bakterii, jak również w homodimerze DsbG (2×25 kDa). Analiza krystalograficzna wykazała, że DsbC posiada strukturę przestrzenną w kształcie litery V. Podjednostki łączą się N-terminalnymi domenami ulegającymi dimeryzacji (aminokwasy 1–61), podczas gdy skierowane do wewnątrz katalityczne domeny C-terminalne (aminokwasy 78–216), o strukturze tioredoksynowej i zawierające grupy tiolowe, tworzą centrum katalityczne o charakterze hydrofobowym [51]. Choć ogólny schemat budowy przestrzennej białek DsbC i DsbG jest podobny to krystalograficzna analiza DsbG wykazała kilka różnic w ich strukturze. Główną z nich jest budowa kieszeni wiążącej substrat zawierającej centrum aktywne, która jest znacznie większa niż w DsbC oraz zawiera regiony negatywnie naładowane, co może wyjaśniać rozbieżność substratową obu białek i uzasadniać obecność dwóch izomeraz siarczkowych na terenie komórki [32]. DsbC i DsbG, oprócz aktywności izomerazy, posiadają również cechy białek opiekuńczych (*chaperon-like activity*), gdyż aby zapewnić dostęp centrum katalitycznego do mostków dwusiarczkowych zwiniętego już białka substratowego muszą dokonać lokalnej lub nawet całościowej relaksacji jego struktury trzeciorzędowej. Fakt ten potwierdziły doświadczenia *in vitro*, w których udokumentowano, że DsbG opóźnia agregację zdenaturowanych i zredukowanych cząsteczek lucyferazy i syntazy cytrynianowej [72], a DsbC dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) i lizozymu, nawet z większą wydajnością niż jego eukariotyczny odpowiednik – izomeraza PDI [10].

Rezultatem aktywności DsbC/DsbG, obok izomeryzacji wiązań disulfidowych, może być również zredukowanie błędnie wprowadzonych mostków i przywrócenie białka substratowego do szlaku utleniania, w wyniku czego substrat zostaje zredukowany a DsbC/DsbG utlenione. Ponadto utleniający charakter peryplazmy również nie sprzyja utrzymaniu DsbC/DsbG w formie zredukowanej. Za utrzymanie obu izomeraz w ich aktywnych zredukowanych formach odpowiedzialne jest duże białko błonowe **DsbD (DipZ)**.



Rys. 2. Wprowadzanie mostków dwusiarczkowych w komórkach *E. coli* – szlak redukcji/izomeryzacji (zmodyfikowany), (reproduковано z *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, Pathways of disulfide bond formation in *E. coli*. Messens J., Collet J.F. 1056 γ 2006 za zgodą wydawcy – Elsevier [54, 75]) RT – reduktaza tioredoksyny.

Pozostałe objaśnienia w tekście

Białko DsbD o masie cząst. ok. 59 kDa zbudowane jest z 3 domen: N-terminalnej – o strukturze immunoglobuliny, zawierającej nietypowy motyw aktywnych cystein CX₅C (α ; nDsbD), środkowej – z ośmioma helisami transbłonowymi i dwoma cysteinami (β ; tDsbD) oraz C-terminalnej zawierającej klasyczny motyw CXXC oraz strukturę tioredoksynową (γ ; cDsbD). Domeny α i γ położone są na terenie peryplazmy, a β wbudowana jest w błonę cytoplazmatyczną. Mutacja punktowa w genie kodującym DsbD doprowadzająca do substytucji którejkolwiek cysteiny na inny aminokwas prowadzi do utraty aktywności enzymu [11, 57, 74]. Substratami DsbD są trzy peryplazmatyczne białka należące do nadrodziny tioredoksynowej: DsbC, DsbG i CcmG. To ostatnie bierze udział w procesie dojrzewania cytochromu *c* (patrz niżej, podrozdział 2.3). DsbD jest jedynym białkiem systemu Dsb *E. coli* dla którego znane są struktury kryształów zarówno w stanie wolnym jak i związanym z trzema ligandami [75].

Mechanizm przekazywania elektronów z cytoplazmy do peryplazmy w celu utrzymania zredukowanych

form białek DsbC, DsbD i DsbG był szczegółowo analizowany w badaniach *in vitro* i *in vivo*. W przeprowadzonych doświadczeniach zmutowanie genu *dsbD* prowadzące do zmian sekwencji aminokwasowych poszczególnych domen białka lub zamiany cystein na inny aminokwas doprowadzało do przerwania przepływu elektronów na konkretnych etapach szlaku co skutkowało obecnością utlenionej formy DsbC lub utlenionych konkretnych domen DsbD. Izolowano również przejściowe kompleksy pomiędzy białkami szlaku redukcijnego, co potwierdzało bezpośredni kontakt konkretnych domen DsbD i jego substratów. Określono także potencjał redox wszystkich białek i poszczególnych domen DsbD, wyznaczając termodynamiczny kierunek reakcji. Ustalono wówczas, że siła redukcyjna czerpana jest z NADPH i tioredoksyny 1 (*trxA*) (z udziałem reduktazy tioredoksyny TrxB) znajdujących się na terenie cytoplazmy. W drugim etapie redukowane są kolejno domeny białka DsbD: $\beta \rightarrow \gamma \rightarrow \alpha$, następnie domena α przekazuje elektrony na DsbC, DsbG lub CcmG, w wyniku czego redukcji

lub izomeryzacji ulegają ostatecznie białka substratowe [13, 44, 50, 64, 65]. Schemat szlaku redukcji przedstawiono na rysunku 2.

Najwięcej kontrowersji wzbudza etap transportu elektronów z cytoplazmy poprzez błonę wewnętrzną komórki. Cysteiny w domenie α białka DsbD niezbędne do zajścia tego procesu są znacznie od siebie oddalone a ponadto zlokalizowane są w innych helisach transbłonowych (Cys163 TM1 i Cys285 TM4) [60]. A więc pierwszym problemem do wyjaśnienia było zbadanie, czy cysteiny te mogą tworzyć mostek dwusiarczkowy, co ostatecznie zostało potwierdzone przez K a t z e n' a i B e c k w i t h' a [43]. Kolejnym problemem było rozstrzygnięcie w jaki sposób powstały disiarczek jest dostępny dla cytoplazmatycznej tioredoksyny, a później zredukowane już grupy tiolowe dla domeny γ białka DsbD, gdyż taka kolejność przepływu elektronów została udowodniona w poprzednich badaniach. Jak dotąd kwestia ta nie została rozstrzygnięta, przypuszcza się, że DsbD musi przechodzić wiele rearanżacji konformacyjnych podczas zmian stanu redox [60].

W komórkach wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych i gramodatnich wstępuje też skrócona forma DsbD – białko CcdA. Najprostsza jego wersja zbudowana jest tylko z membranowej domeny β , składającej się z różnej liczby TM (6–8). CcdA to najprawdopodobniej starsza ewolucyjnie forma DsbD występująca także u Archeobacteria, podczas gdy obecność „pełnego” DsbD ogranicza się do proteomów Beta- i Gammaproteobacteria, z wyjątkiem *C. jejuni* (*cj0603c*), drobnoustroju który jest przedstawicielem klasy Epsilonproteobacteria. Ewolucja przebiegała w kierunku modyfikacji zarówno N- jak i C-końca białka, charakteryzujących się różną długością i strukturą przestrzenną, aż do osiągnięcia struktury tioredoksynowej (domena γ) oraz zwinięcia charakterystycznego dla immunoglobulin (domena α). Obie te struktury przestrzenne występują razem tylko w białkach DsbD. Doświadczenia wykonane z wykorzystaniem DsbD *E. coli* i CcdA *Rhodobacter capsulatus* wykazały, że białka te mogą się funkcjonalnie zastępować, ale tylko w procesie biosyntezy cytochromu *c*, czerpiąc siłę redukcyjną z tych samych donorów elektronów (NADPH, TrxA/B). Druga funkcja DsbD, polegająca na redukowaniu izomeryzy DsbC nie była komplementowana przez CcdA. Fakt ten sugeruje, iż nabycie dodatkowych domen przez DsbD skutkuje rozszerzeniem jego specyficzności substratowej [45].

2.3. Dodatkowe elementy szlaku redukcji/izomeryzacji – CcmG (DsbE) i DsbF

DsbD *E. coli* posiada jeszcze jeden (oprócz DsbC i DsbG) zidentyfikowany substrat, również zaliczany do systemu Dsb, a mianowicie białko CcmG/DsbE [75].

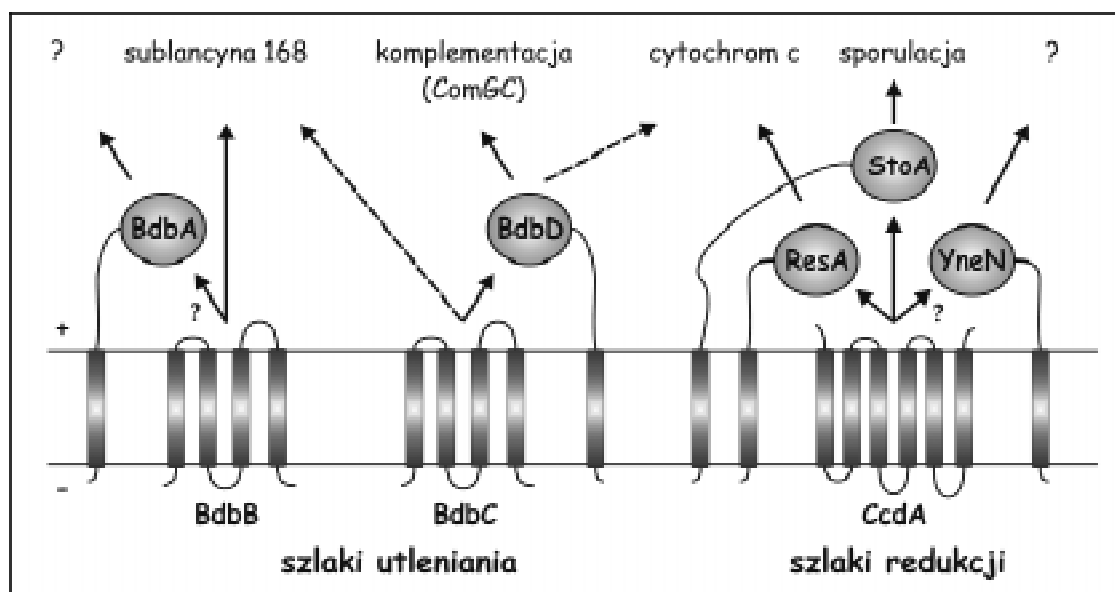
Jest ono jedną z ośmiu protein kodowanych przez operon *ccmA-H*, biorących udział w syntezie cytochromu typu *c* w warunkach beztlenowych w obecności azotanów jako ostatecznych akceptorów elektronów [22].

DsbE o masie cząst. 18 kDa jest białkiem błonowym (IM) z C-terminalnym fragmentem zlokalizowanym na terenie peryplazmy. W odróżnieniu od pozostałych peryplazmatycznych reduktaz Dsb (DsbC i DsbG), DsbE jest monomerem. Podobnie jak inne tiolowe oksydoreduktazy zawiera domenę tioredoksynową z charakterystycznym motywem CXXC. Bezpośrednim substratem DsbE jest liaza hemowa CcmH (białko wbudowane w błonę wewnętrzną komórki) również zawierająca motyw CXXC. Utrzymuje ona cysteiny w miejscu wiązania hemu w cytochromach typu *c* w stanie zredukowanym. Cytochromy *c* bezpośrednio po transporcie przez błonę cytoplazmatyczną ulegają utlenieniu przez DsbA. Do stanu zredukowanego, koniecznego do wytworzenia wiązań tioeterowych pomiędzy grupami sulfhydrylowymi reszt cysteinowych a grupami winylowymi hemu, przywraca je aktywność układu CcmG/CcmH. Przejście tych zmian konformacyjnych jest konieczne do wytworzenia aktywnych cząsteczek cytochromu *c* [22, 23].

Dodatkowych informacji o strukturze DsbE dostarczyła praca dotycząca systemu Dsb *Bradyrhizobium japonicum*. Analiza krystalograficzna wykazała, że centrum aktywne DsbE tego drobnoustroju posiada strukturę zagłębienia (*groove*), które oprócz cystein charakterystycznych dla wszystkich białek Dsb zawiera nietypową dla domen tioredoksynowych insercję 24 aminokwasów. Również na N-końcu białka występuje dodatkowe 30 aminokwasów. Ta nietypowa budowa oraz konserwowane kwaśne aminokwasy w centrum katalitycznym enzymu odpowiadają za jego dużą specyficzność substratową oraz powinowactwo do DsbD (prawdopodobnie wykluczając tym samym niepożądane interakcje z DsbA) [18].

Najmniej poznanym ze wszystkich białek rodziny Dsb jest DsbF. Gen *dsbF* zidentyfikowano w eksperymentach globalnej transpozonowej (Tn10) mutagenyzy *E. coli* analizując zmiany w genomie mutantów o podwyższonej wrażliwości na DTT [56]. M e t h e r i n g h a m i wsp. analizowali fenotyp mutantu *dsbF*⁻ i wykazali, że badany szczep nie jest wrażliwy na podwyższone stężenie jonów Cu²⁺ oraz, że DsbF nie ma wpływu na aktywność reduktazy azotynowej Nrf ani na proces biosyntezy cytochromu *c* [55].

Analiza mechanizmów działania obu przedstawionych szlaków stawia pytanie, jak przeciwstawne szlaki utleniania oraz redukcji/izomeryzacji przebiegają jednocześnie w tym samym przedziale komórkowym? Czy nie zakłócają one nawzajem swoich funkcji poprzez bezpośrednie interakcje między białkami stanowiącymi ich składniki np. czy DsbA/DsbB nie utle-



Rys. 3. Schematyczny układ oksydoreduktaz tiolowych oraz ich funkcje w komórkach *B. subtilis* [58] (zmodyfikowany)

Strzałki przerywane oznaczają dodatkową aktywność. Na rysunku nie uwzględniono lokalizacji białek substratowych, niektóre z nich zakotwiczone są w błonie cytoplazmatycznej. (-) – wewnętrzna strona błony cytoplazmatycznej; (+) – zewnętrzna strona błony cytoplazmatycznej

niąją DsbC/DsbD lub same nie ulegają redukcji? Wykazano, że za separację szlaków odpowiada m.in. bariera kinetyczna. Domena α DsbD nie może przekazać elektronów na DsbA *in vitro* [13] a DsbA/DsbB utleniają DsbC *in vitro* z tak niską wydajnością, że *in vivo* taka reakcja nie zachodzi [2, 79]. Bader i wsp. wykazali, że dodatkowym elementem chroniącym DsbC przed interakcjami z DsbA/DsbB jest jego dimeryzacja. Wprowadzenie kilku mutacji w genie *dsbC* doprowadzających do wytwarzania DsbC w formie monomeru udokumentowało, że DsbB wydajnie utlenia tylko monomer DsbC oraz, że monomeryczna proteina DsbC może komplementować delecyjną mutację w genie *dsbA* [1]. Segatori i wsp. zidentyfikowali aminokwasy odpowiedzialne za blokadę interakcji DsbC z DsbB. Są one zlokalizowane w strukturze α -helisy łączącej N-terminalną domenę dimeryzacyjną z C-terminalną domeną tioredoksynową [70].

3. Wprowadzanie mostków dwusiarczkowych do białek bakterii Gram-dodatnich

Wprowadzanie mostków dwusiarczkowych w komórkach bakterii Gram-ujemnych związane jest ściśle z przestrzenią peryplazmatyczną, gdzie utleniający potencjał środowiska zapewnia dogodne warunki do tworzenia i trwałego utrzymania wiązań disulfidowych. Wiadomo jednak, że także w proteomach bakterii Gram-dodatnich, pozbawionych typowej przestrzeni peryplazmatycznej, obecne są białka które do

powstania aktywnej, natywnej konformacji wymagają wytworzenia poprzecznych wiązań dwusiarczkowych. W komórkach bakterii Gram-dodatnich przedział komórkowy o warunkach podobnych do tych panujących na terenie peryplazmy ogranicza się do obszaru zlokalizowanego pomiędzy błoną cytoplazmatyczną a grubą ścianą komórkową [53].

W ostatnich latach podjęto próby identyfikacji systemów Dsb w komórkach bakterii Gram-dodatnich.

3.1. *Bacillus subtilis* i *Bacillus brevis*

Bacillus jest najdokładniej scharakteryzowanym rodzajem spośród bakterii Gram-dodatnich pod względem funkcjonowania systemu Dsb. Pierwsza zidentyfikowana tiolowa oksydoreduktaza rodzaju *Bacillus* pochodziła z gatunku *B. brevis* [36]. Dalsze prace przeprowadzone były z wykorzystaniem komórek *B. subtilis*, gatunku stosunkowo szczegółowo rozpracowanego pod względem genetycznym. W genomie tego drobnoustroju odnaleziono jak dotąd osiem genów kodujących oksydoreduktazy Dsb, w skrócie nazwane TDOR (*membrane-bound thiol-disulfide oxidoreductases*) (Rys. 3). Wszystkie zawierają charakterystyczny motyw aktywnych cystein CXXC i związane są z błoną cytoplazmatyczną – za pomocą N-końca po odcięciu sekwencji sygnałnej (BdbA, BdbD, ResA, StoA i YneN) lub wbudowane w błonę kilkoma helisami transbłonowymi podobnie do DsbD *E. coli* (BdbB, BdbC i CcdA). Podobnie jak w komórkach *E. coli* białka Dsb *B. subtilis* funkcjonują w dwu szlakach: utleniania (dwie pary

białek: BdbA/BdbB i BdbC/BdbD) i redukcji (CcdA, ResA, StoA i YneN). W kolejnych akapitach zostaną omówione: budowa i funkcje poszczególnych białek TDOR *B. subtilis* oraz białka Bdb *B. brevis*.

B d b *B. brevis* o masie cząst. 10 kDa (po odcięciu sekwencji sygnałnej) to proteina pozacytoplazmatyczna o nieokreślonej dokładnie lokalizacji. Badania *in vitro* oczyszczonego białka nie określiły czy Bdb jest utleniaczem czy reduktantem, gdyż białko katalizowało zarówno proces fałdowania RNazy A jak i do redukcji wiązań disulfidowych insuliny. Ostatecznie utleniający charakter Bdb *B. brevis* potwierdzono w testach komplementacji mutacji w genie *dsbA E. coli*. Dostarczenie *in trans* genu *bdb* skutkowało przywróceniem szczepowi mutanta ruchliwości oraz aktywności alkalicznej fosfatazy. Próby unieczynnienia genu *bdb B. brevis* zakończyły się niepowodzeniem, tak więc rola białka w komórkach naturalnego gospodarza pozostaje niewyjaśniona [36].

B d b A i **B d b B** białka o masie cząst. ok. 16 kDa, zostały zidentyfikowane *in silico* jako homologi Bdb *B. brevis* (BdbA) oraz DsbB *E. coli* (BdbB). Mutacja w *bdbB*, w przeciwieństwie do unieczynnienia *bdbA* prowadzi do destabilizacji alkalicznej fosfatazy i β -laktamazy [8]. Analiza genomu *B. subtilis* 168 wykazała, że geny *bdbA/B* są fragmentem DNA profagowego i razem z genami *sunA/sunT* tworzą jednostkę transkrypcyjną. SunA to sublacyna 168 – antybiotyk peptydowy należący podobnie jak subtilina do klasy lantibiotyków, natomiast SunT to białko wiążące ATP biorące udział w transporcie sublacyny 168 [33]. Skoordynowana ekspresja genów kodujących białka odpowiadające za wprowadzanie mostków dwusiarczkowych oraz SunA wymagającego do osiągnięcia aktywnej konformacji obecności dwóch wiązań disulfidowych zasugerowało potencjalną rolę BdbA/B w procesie dojrzewania antybiotyku. Jednak tylko BdbB oraz w niewielkim stopniu BdbC (patrz opis BdbC niżej) wymagane są do wytworzenia aktywnej sublacyny 168. Rola i substraty BdbA w komórkach *B. subtilis* pozostają nieokreślone [16].

B d b C / D białka o masach cząst. ok. 15 i 25 kDa zostały zidentyfikowane *in silico* jako homologi odpowiednio DsbB oraz DsbA *E. coli*. Geny *bdbC/D* tworzą dwucistronowy operon i kodują białka stanowiące funkcjonalną parę utleniającą grupy tiolowe (BdbD utlenia substrat a regenerowane jest przez BdbC). **M e i m a** i wsp. wykazali, że aktywność obu protein jest niezbędna do wytworzenia stanu naturalnej kompetencji komórek *B. subtilis*, poprzez modyfikację pseudopiliny ComGC, białka wykazującego podobieństwo do pilin typu IV i pseudopiliny budującej aparat sekrecyjny typu II. Do powstania funkcjonalnego pilusa zapewniającego kontakt DNA z odpowiednim receptorem (ComEA) konieczne jest wytworzenie wiązań

dwusiarczkowych [9]. Mutacja w genie *bdbC* nie jest komplementowana przez paralogiczne białko BdbB, choć odwrotna zależność była częściowo obserwowana w analizach aktywności alkalicznej fosfatazy (patrz opis BdbB wyżej) [52].

R e s A o masie cząst. ok. 20 kDa, to białko zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, a jego C-koniec zawiera domenę tioredoksynową, i motyw aktywnych cystein w formie zredukowanej (-340 mV) [12]. Gen *resA* jest jednym z genów dużego operonu *resABCDE* odpowiedzialnego za syntezę cytochromu typu *c*. ResA utrzymuje cysteiny apocytochromu w formie tiolowej, aby mogły one uczestniczyć w wiązaniu grupy hemoowej. Redukcyjna aktywność ResA jest niezbędna, gdyż apocytochrom *c* jest substratem BdbD. Udowodniono, że mutacja w genie *resA* może podlegać supresji poprzez mutacje w genach *bdbD/C* [19]. ResA, proteina uznawana za funkcjonalny odpowiednik domeny γ DsbD *E. coli*, utrzymywana jest w aktywnej zredukowanej formie przez białko CcdA, funkcjonalny odpowiednik domeny β DsbD (patrz opis CcdA niżej) [19].

S t o A o masie cząst. ok. 18 kDa, to kolejny z reduktantów zakotwiczonego w błonie z C-końcem, posiadającym tioredoksynową strukturę przestrzenną Gen *stoA* tworzy dwucistronowy operon z genem *YkvU* o nieznannej funkcji. Sekwencja aminokwasowa YkvU jest podobna do sekwencji aminokwasowej SpoVB, białka biorącego udział w biosyntezie spor *B. subtilis* (synteza korteksu). Wspólna transkrypcja genów zasugerowała udział StoA w procesie sporulacji. Przebieg procesu formowania endospor jest regulowany przez kolejno uwalniane czynniki sigma. Operon *YkvU-stoA* jest także transkrybowany z dwóch promotorów zależnych od różnych czynników sigma, co umożliwia prawidłową lokalizację StoA, w zależności od stanu fizjologicznego komórki. W komórkach macierzystych jest on transkrybowany przez RNAP z czynnikiem sigma E, a w przetrwalnikach przez RNAP z czynnikiem sigma G. Mutacja w genie *stoA* prowadzi do zaburzeń w formowaniu korteksu, co powoduje wzrost wrażliwości spor na podwyższoną temperaturę, lizozym i chloroform. Bezpośrednie substraty tej tiolowej oksydoreduktazy nie zostały zidentyfikowane. StoA, podobnie jak ResA utrzymywane jest w aktywnej zredukowanej formie przez białko CcdA [21, 58].

C c d A o masie cząst. 26 kDa, to białko wykazujące podobieństwo do domen β białek DsbD *E. coli* czy *M. tuberculosis* oraz do protein CcdA obecnych w proteomach innych gatunków drobnoustrojów. Zbudowane jest z 6 helis transbłonowych, które zawierają parę niezbędnych cystein, ale podobnie do innych białek typu β -DsbD/CcdA nie tworzą one motywu CXXC. Gen *ccdA* leży w operonie z dwoma innymi genami o niepowiązanych z *ccdA* funkcjach. Analiza mutacyjna wykazała, że aktywność CcdA jest niezbędna

w końcowej pozacytoplazmatycznej fazie dojrzewania cytochromu *c* i stąd nazwa genu – *ccd* (*cytochrome c defective*). Cytochrom typu *b* nie podlega działaniu CcdA [68, 69]. Dodatkowo udokumentowano, że białko to bierze udział również w procesie sporulacji [21]. CcdA jest membranowym reduktantem, podobnie do homologicznego DsbD ale pozbawione jest jego domen α i γ . Przypuszczano zatem, że jego udział w szlaku redukcji przebiega przy udziale dodatkowych białek, zawierających brakującą domenę tioredoksynową a w niej motyw aktywnych cystein CXXC. Odnaleziono 3 białka substratowe współpracujące z CcdA – dwa o udokumentowanej eksperymentalnie aktywności (ResA i StoA; patrz wyżej) oraz jedno hipotetyczne (YneN; patrz niżej). Razem tworzą one szlaki o charakterze redukcyjnym. Mutacja w genie *ccdA* może podlegać supresji poprzez mutacje w genach szlaku utleniania *bdbD/C* [20], podobnie do mutacji w genie *resA*.

YneN o masie cząst. 19 kDa, to białko najslabiej poznane wśród wszystkich TDOR. Podobnie do kilku innych białek *B. subtilis* zakotwiczone jest w błonie cytoplazmatycznej, a N-koniec ma strukturę przestrzenną domeny tioredoksynowej. YneN nie bierze udziału w procesie sporulacji choć najprawdopodobniej podobnie do ResA i StoA tworzy bifunkcyjny układ z CcdA o nieokreślonym szczegółowo mechanizmie działania [20, 21].

Podsumowując, wszystkie oksydoreduktazy tiolowe *B. subtilis* charakteryzują się nietypową w porównaniu z białkami Dsb *E. coli* specyficznością substratową. W szczególnych przypadkach ich funkcje mogą się pokrywać, ale tylko częściowo. Wynika to najprawdopodobniej z faktu, że *B. subtilis* posiada stosunkowo niedużą liczbę białek, które wymagają do osiągnięcia natywnej konformacji wprowadzenia mostków dwusiarczkowych. Mutanty *bdb* nie są wrażliwe na podwyższone stężenie związków redukujących obecnych w podłożu [8]. Także analiza subproteomów sekrecyjnych nie wykazała różnic w profilach białek izolowanych z komórek mutantów (pojedynczych *bdbA-D* oraz mutantu pozbawionego wszystkich tych genów) w stosunku do szczepu dzikiego *B. subtilis* 168 [66].

3.2. *Staphylococcus aureus*

Przeszukanie genomów kilku szczepów *S. aureus* wykazało obecność zaledwie jednego białka homologicznego do białek Dsb *E. coli* i Bdb *B. subtilis*. Białko to charakteryzuje się 41% podobieństwem sekwencji aminokwasowej do sekwencji aminokwasowej BdbD (homolog DsbA *E. coli*), dlatego też nazwano ją **SaDsbA**.

SaDsbA to lipoptoteina o masie cząst. ok. 20 kDa zakotwiczona w błonie cytoplazmatycznej i zawiera-

jąca motyw aktywnych cystein CXXC oraz konserwowaną cis-prolinę w pozycji 154, odpowiednik proliny 151, kluczowej dla aktywności DsbA *E. coli* (patrz pkt 1.1. Wstępu). Gen *dsbA* *S. aureus* kotranskrybowany jest z poprzedzającą go otwartą ramką odczytu SA2198, potencjalnie kodującą 120 aminokwasową lipoproteinę. Analogiczny układ tych dwóch genów zachowany jest we wszystkich zsekwencjonowanych, jak dotąd, genomach *S. aureus* oraz w materiale genetycznym spokrewnionego gatunku *S. epidermidis*.

Funkcjonalna charakterystyka SaDsbA wykazała, iż białko to częściowo przywraca zdolność ruchu komórkom *E. coli dsbA*⁻, a więc pełni rolę oksydoreduktazy. Aktywność ta wymagająca obecności cystyny w podłożu hodowlanym, nie jest jednak zależna od białka DsbB, co koreluje z brakiem w komórkach *S. aureus* pozostałych protein systemu Dsb. W proteomie *S. aureus* występuje wiele białek pozacytoplazmatycznych zawierających mostki dwusiarczkowe, niektóre z nich jak np. enterotoksyna czy hemolizyna pełnią istotną rolę w procesie patogenezy. Pomimo przeanalizowania wielu cech fizjologicznych mutantu *S. aureus dsbA*⁻ nie udało się ustalić roli *in vivo* białka SaDsbA. Przeanalizowano większość typowych cech fenotypowych mutantu *dsbA*⁻ *E. coli*, takich jak: wrażliwość na związki redukujące (DTT), benzylpenicylinę i inne antybiotyki blokujące różne szlaki metaboliczne komórki. Sprawdzone przebieg procesu fałdowania substratów wymagających do swej aktywności obecności ugrupowań dwusiarczkowych na przykładzie β -hemolizyny. Dodatkowo zbadano wpływ mutacji w genie *dsbA* na patogenezę (infekcja *Caenorhabditis elegans* i myszy). We wszystkich eksperymentach szczep mutantu „zachowywał się” identycznie jak szczep dziki, dlatego też przebieg procesu wprowadzania wiązań disulfidowych na terenie komórek *S. aureus* pozostaje nadal słabo scharakteryzowany. Przypuszcza się, że istnieją inne elementy badanego szlaku niewystępujące w komórkach innych gatunków drobnoustrojów lub też, alternatywnie, *S. aureus* jako ludzki patogen mający częsty kontakt z osoczem krwi czerpie potencjał utleniający dla SaDsbA z cystyn, znajdujących się w osoczu. Rola produktu genu SA2198 (kotranskrybowany z *dsbA*) w analizowanym procesie również pozostaje do wyjaśnienia. Białko to nie posiadające w sekwencji aminokwasowej cystein nie może brać bezpośredniego udziału w reakcjach redox [17].

3.3. *Mycobacterium tuberculosis*

Genom *Mycobacterium tuberculosis* koduje 161 potencjalnie sekrecyjnych białek. Ponad połowa z nich zawiera w swojej sekwencji co najmniej dwie cysteiny, a więc może wymagać utworzenia mostków dwusiarczkowych do osiągnięcia funkcjonalnej konformacji.

Eksperymentalnie scharakteryzowane zostały dwie proteiny Dsb tego gatunku, a mianowicie *Mtb DsbE* (inaczej Rv2878c lub MPT53) oraz *Mtb DsbD* (Rv2874 lub DipZ). Przeszukanie genomu szczepu H37Rv (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis) wykazało również obecność trzech innych genów kodujących białka prawdopodobnie należące do rodziny oksydoreduktaz tiolowych. Są to: *dsbF* (Rv1677), którego produkt jest lipoproteiną o sekwencji aminokwasowej wykazującej podobieństwo do sekwencji aminokwasowej *Mtb DsbE* i *DsbE E. coli*, *ccaA* (Rv0527 lub *ccaA*), którego produkt jest białkiem błonowym wykazującym podobieństwo do *CcdA B. subtilis* i *Mtb DsbD* oraz **Rv2877c** (znajdujący się w operonie z *Mtb dsbE*), którego produkt jest białkiem błonowym zawierającym domenę z aktywnymi cysteinami podobną do *CcdA*. Produkty dwóch ostatnich genów prawdopodobnie biorą udział w biogenezie cytochromu typu *c*.

Mtb DsbE jest zewnątrzkomórkowym, wydzielanym do środowiska białkiem o masie ok. 15 kDa (po odcięciu sekwencji sygnałnej 1–29 aminokwasów). Gen Rv2878c tworzy bicistronowy operon z genem Rv2877c, którego sekwencja promotorowa rozpoznawana jest przez czynnik sigma – SigL RNAP. RNAP z tym czynnikiem sigma inicjuje między innymi transkrypcję genów kodujących białka warunkujące posttranslacyjne modyfikacje protein [31]. Analiza krystalograficzna *Mtb DsbE* wykazała obecność domeny tioredoksynowej zawierającej charakterystyczny motyw cysteinowy CXXC. Porównanie struktury przestrzennej *Mtb DsbE* z innymi dostępnymi w bazach danych wykazało największe podobieństwo do białek CcmG/DsbE i TlpA gramujemnej bakterii *Bradyrhizobium japonicum* (patrz pkt. 2.3 Wstępu), choć brak w N-regionie białka *Mtb DsbE* charakterystycznego dla *DsbE B. japonicum* zagłębienia biorącego udział w oddziaływaniach białko-białko sugeruje różnice w substratach obu protein. Pomiedzy *Mtb DsbE* a homologicznymi do niego białkami (również *DsbE E. coli*) istnieje zasadnicza różnica co do ich potencjału redox. Podczas, gdy typowe *DsbE* są słabymi reduktazami, *Mtb DsbE* jest silnym utleniaczem (–128 mV) o potencjale redox zbliżonym do *DsbA E. coli* (–120 mV). Cysteiny obu białek stabilniejsze są w formie zredukowanej, a więc „aktywnie” uczestniczą w tworzeniu wiązania dwusiarczkowego w białkach substratowych. Porównanie pierwszych 50 aminokwasów dojrzałej proteiny *M. tuberculosis* z *DsbA E. coli* wykazało obecność kilku konserwowanych regionów. Aktywność utleniająca *Mtb DsbE* została potwierdzona eksperymentalnie *in vitro* w teście związania hirudyny *Hirudo medicinalis* (inhibitor trombiny), białka, zawierającego trzy mostki dwusiarczkowe. Natomiast istnienia aktywności izomeryzacyjnej badanego białka (brak jest odpowiednika *DsbC* w genomie *M. tubercu-*

losis) jak dotąd nie udało się potwierdzić i jeśli ona istnieje, to prawdopodobnie wobec wąskiej puli substratów [27].

Mtb DsbD to białko o masie cząst. ok. 74 kDa składające się z 3 domen: N-terminalnej (115 aminokwasów), centralnej (232 aminokwasów) silnie hydrofobowej domeny tworzącej 8 helis transbłonowych i zawierającej dwie konserwowane cysteiny oraz C-terminalnej (348 aminokwasów) domeny hydrofilowej, zawierającej parę aktywnych cystein CXXC wchodzących w skład przestrzennej struktury tioredoksynowej. W domenie tej występuje w porównaniu i innymi białkami *DsbD* 150 dodatkowych aminokwasów. Gen Rv2874 wchodzi w skład pięciogenowego operonu (Rv2871–Rv2875/*mpt70*). Transkrybowany jest z dwu promotorów: pierwszy z nich znajduje się przed 5' końcem pierwszego genu operonu (Rv2871), drugi – promotor genu Rv2874, rozpoznawany jest przez RNAP z czynnikiem sigma E. RNAP zawierająca czynnik sigma E transkrybuje geny odpowiedzialne za odpowiedź na stres oksydacyjny i temperaturowy. Funkcja *Mtb DsbD* nie była eksperymentalnie potwierdzana [26, 39].

4. Podsumowanie

W przedstawionej pracy przeglądowej skoncentrowano się głównie na charakterystyce mechanizmu wprowadzania mostków dwusiarczkowych do białek peryplazmatycznych w najdokładniej pod tym względem scharakteryzowanych komórkach *E. coli*. Przeprowadzone w ostatnich latach sekwencjonowania genomów prokariotycznych zapoczątkowały badania procesów wprowadzania mostków dwusiarczkowych do białek w komórkach innych gatunków drobnoustrojów. Wykazały one, że procesy te są często bardzo złożone. Wiele gatunków drobnoustrojów zawiera kilka paralogów genów *dsbA* lub *dsbB*. Poznanie sieci ich wzajemnych powiązań wymaga jeszcze wielu badań. Przeprowadzane analizy *in silico* oraz analizy proteomiczne pozwalają na identyfikację substratów białek Dsb. Ponieważ uszkodzenie systemów Dsb wpływa na wirulencję drobnoustrojów chorobotwórczych a nadekspresja genów *dsb* umożliwia prawidłowe fałdowanie niektórych białek eukariotycznych w komórkach bakterii badania te mają aspekt zarówno poznawczy jak i aplikacyjny.

Piśmiennictwo

1. Bader M.W., Hiniker A., Regeimbal J., Goldstone D., Haebel P.W., Riemer J., Metcalf P., Bardwell J.C.: Turning a disulfide isomerase into an oxidase: *DsbC* mutants that imitate *DsbA*. *EMBO J.* **20**, 1555–1562 (2001)

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. Bardwell J.C.: PDI and thredoxin-related proteins – an overview. (w) Guidebook to molecular Chaperons and protein-folding catalysts, red. M.J. Gething, A Sambrook & Tooze Publications at Oxford University Press, Oxford, 1997, s. 311–313
4. Bardwell J.C., Lee J.O., Jander G., Martin N., Belin D., Beckwith J.: A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1038–1042 (1993)
5. Bardwell J.C., McGovern K., Beckwith J.: Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell*, **67**, 581–589 (1991)
6. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: Struktura i funkcja białek. (w) Biochemia, PWN SA, Warszawa, 2005, s. 41–76
7. Bessette P.H., Cotto J.J., Gilbert H.F., Georgiou G.: *In vivo* and *in vitro* function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J. Biol. Chem.* **274**, 7784–7792 (1999)
8. Bolhuis A., Venema G., Quax W.J., Bron S., van Dijl J.M.: Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 24531–24538 (1999)
9. Chen I., Provvedi R., Dubnau D.: A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 21720–21727 (2006)
10. Chen J., Song J.L., Zhang S., Wang Y., Cui D.F., Wang C.C.: Chaperone activity of DsbC. *J. Biol. Chem.* **274**, 19601–19605 (1999)
11. Chung J., Chen T., Missiakas D.: Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulphide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol. Microbiol.* **35**, 1099–1109 (2000)
12. Colbert C.L., Wu Q., Erbel P.J., Gardner K.H., Deisenhofer J.: Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome *c* maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4410–4415 (2006)
13. Collet J.F., Riemer J., Bader M.W., Bardwell J.C.: Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J. Biol. Chem.* **277**, 26886–26892 (2002)
14. Couprie J., Vinci F., Dugave C., Quemeneur E., Moutiez M.: Investigation of the DsbA mechanism through the synthesis and analysis of an irreversible enzyme-ligand complex. *Biochemistry*, **39**, 6732–6742 (2000)
15. Dailey F.E., Berg H.C.: Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1043–1047 (1993)
16. Dorenbos R., Stein T., Kabel J., Bruand C., Bolhuis A., Bron S., Quax W.J., van Dijl J.M.: Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. *J. Biol. Chem.* **277**, 16682–16688 (2002)
17. Dumoulin A., Grauschopf U., Bischoff M., Thony-Meyer L., Berger-Bachi B.: *Staphylococcus aureus* DsbA is a membrane-bound lipoprotein with thiol-disulfide oxidoreductase activity. *Arch. Microbiol.* **184**, 117–128 (2005)
18. Edeling M.A., Guddat L.W., Fabianek R.A., Thony-Meyer L., Martin J.L.: Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure*, **10**, 973–979 (2002)
19. Erlendsson L.S., Acheson R.M., Hederstedt L., le Brun N.E.: *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 17852–17858 (2003)
20. Erlendsson L.S., Hederstedt L.: Mutations in the thiol-disulfide oxidoreductases BdbC and BdbD can suppress cytochrome *c* deficiency of CcdA-defective *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **184**, 1423–1429 (2002)
21. Erlendsson L.S., Moller M., Hederstedt L.: *Bacillus subtilis* StoA Is a thiol-disulfide oxidoreductase important for spore cortex synthesis. *J. Bacteriol.* **186**, 6230–6238 (2004)
22. Fabianek R.A., Hennecke H., Thony-Meyer L.: The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome *c* maturation *in vivo*. *J. Bacteriol.* **180**, 1947–1950 (1998)
23. Fabianek R.A., Hofer T., Thony-Meyer L.: Characterization of the *Escherichia coli* CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome *c* maturation. *Arch. Microbiol.* **171**, 92–100 (1999)
24. Foster M.W., McMahon T.J., Stamler J.S.: S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol. Med.* **9**, 160–168 (2003)
25. Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Colombo R., Dalle-Donne I.: S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell Mol. Med.* **8**, 201–212 (2004)
26. Goldstone D., Baker E.N., Metcalf P.: Crystallization and preliminary diffraction studies of the C-terminal domain of the DipZ homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallograph. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 243–245 (2005)
27. Goulding C.W., Apostol M.I., Gleiter S., Parseghian A., Bardwell J., Gennaro M., D. E.: Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 3516–3524 (2004)
28. Grauschopf U., Fritz A., Glockshuber R.: Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **22**, 3503–3513 (2003)
29. Guddat L.W., Bardwell J.C., Zander T., Martin J.L.: The uncharged surface features surrounding the active site of *Escherichia coli* DsbA are conserved and are implicated in peptide binding. *Protein Science*, **6**, 1148–1156 (1997)
30. Guilhot C., Jander G., Martin N.L., Beckwith J.: Evidence that the pathway of disulfide bond formation in *Escherichia coli* involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9895–9899 (1995)
31. Hahn M.Y., Raman S., Anaya M., Husson R.N.: The *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic-function sigma factor SigL regulates polyketide synthases and secreted or membrane proteins and is required for virulence. *J. Bacteriol.* **187**, 7062–7071 (2005)
32. Heras B., Edeling M.A., Schirra H.J., Raina S., Martin J.L.: Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8876–8881 (2004)
33. Higgins C.F.: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113 (1992)
34. Hiniker A., Bardwell J.C.: *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **279**, 12967–12973 (2004)
35. Inaba K., Takahashi Y.H., Fujieda N., Kano K., Miyoshi H., Ito K.: DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation. *J. Biol. Chem.* **279**, 6761–6768 (2004)

36. Ishihara T., Tomita H., Hasegawa Y., Tsukagoshi N., Yamagata H., Udaka S.: Cloning and characterization of the gene for a protein thiol-disulfide oxidoreductase in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **177**, 745–749 (1995)
37. Jander G., Martin N.L., Beckwith J.: Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *EMBO J.* **13**, 5121–5127 (1994)
38. Joly J.C., Leung W.S., Swartz J.R.: Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2773–2777 (1998)
39. Juarez M.D., Torres A., Espitia C.: Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the mpt83 and mpt70 genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 95–102 (2001)
40. Kadokura H., Bader M., Tian H., Bardwell J.C., Beckwith J.: Roles of a conserved arginine residue of DsbB in linking protein disulfide-bond-formation pathway to the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10884–10889 (2000)
41. 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)
42. Kamitani S., Akiyama Y., Ito K.: Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *EMBO J.* **11**, 57–62 (1992)
43. Katzen F., Beckwith J.: Role and location of the unusual redox-active cysteines in the hydrophobic domain of the transmembrane electron transporter DsbD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10471–10476 (2003)
44. Katzen F., Beckwith J.: Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, **103**, 769–779 (2000)
45. Katzen F., Deshmukh M., Daldal F., Beckwith J.: Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD. *EMBO J.* **21**, 3960–3969 (2002)
46. Kim S.O., Merchant K., Nudelman R., Beyer W.F.J., Keng T., DeAngelo J., Hausladen A., Stamler J.S.: OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell*, **109**, 383–396 (2002)
47. Kishigami S., Akiyama Y., Ito K.: Redox states of DsbA in the periplasm of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **364**, 55–58 (1995)
48. Kishigami S., Ito K.: Roles of cysteine residues of DsbB in its activity to reoxidize DsbA, the protein disulfide bond catalyst of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, **1**, 201–208 (1996)
49. Kishigami S., Kanaya E., Kikuchi M., Ito K.: DsbA-DsbB interaction through their active site cysteines. Evidence from an odd cysteine mutant of DsbA. *J. Biol. Chem.* **270**, 17072–17074 (1995)
50. Krupp R., Chan C., Missiakas D.: DsbD-catalyzed transport of electrons across the membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 3696–36701 (2001)
51. McCarthy A.A., Haebel P.W., Torronen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P.: Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 196–199 (2000)
52. Meima R. i wsp.: The *bdbDC* operon of *Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development. *J. Biol. Chem.* **277**, 6994–7001 (2002)
53. Merchante R., Pooley H.M., Karamata D.: A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**, 6176–6183 (1995)
54. Messens J., Collet J.F.: Pathways of disulfide bond formation in *E. coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1050–1062 (2006)
55. Metheringham R., Tyson K.L., Crooke H., Missiakas D., Raina S., Cole J.A.: Effects of mutations in genes for proteins involved in disulfide bond formation in the periplasm on the activities of anaerobically induced electron transfer chains in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 95–102 (1996)
56. Missiakas D., Georgopoulos C., Raina S.: Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7084–7088 (1993)
57. Missiakas D., Schwager F., Raina S.: Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**, 3415–3424 (1995)
58. Moller M., Hederstedt L.: Role of membrane-bound thiol-disulfide oxidoreductases in endospore-forming bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 823–833 (2006)
59. Pe'er I., Felder C.E., Man O., Silman I., Sussman J.L., S. B.J.: Proteomic signatures: amino acid and oligopeptide compositions differentiate among phyla. *Proteins*, **54**, 20–40 (2004)
60. Porat A., Cho S.H., Beckwith J.: The unusual transmembrane electron transporter DsbD and its homologues: a bacterial family of disulfide reductases. *Res. Microbiol.* **155**, 617–622 (2004)
61. Raina S., Missiakas D.: Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 179–202 (1997)
62. Regeimbal J., Gleiter S., Trumppower B.L., Yu C.A., Diwakar M., Ballou D.P., Bardwell J.C.: Disulfide bond formation involves a quinhydrone-type charge-transfer complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13779–13784 (2003)
63. Rietsch A., Belin D., Martin N., Beckwith J.: An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13048–13053 (1996)
64. Rietsch A., Bessette P., Georgiou G., Beckwith J.: Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* **179**, 6602–6608 (1997)
65. Rozhkova A., Stirnimann C.U., Frei P., Grauschopf U., Brunisholz R., Grutter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J.* **23**, 1709–1719 (2004)
66. Sarvas M., Harwood C.R., Bron S., van Dijk J.M.: Post-translational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 311–327 (2004)
67. Saurin A.T., Neubert H., Brennan J.P., Eaton P.: Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17982–17987 (2004)
68. Schiott T., Throne-Holst M., Hederstedt L.: *Bacillus subtilis* CcdA-defective mutants are blocked in a late step of cytochrome *c* biogenesis. *J. Bacteriol.* **179**, 4523–4529 (1997)
69. Schiott T., von Wachenfeldt C., Hederstedt L.: Identification and characterization of the *ccdA* gene, required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 1962–1973 (1997)
70. Segatori L., Murphy L., Arredondo S., Kadokura H., Gilbert H., Beckwith J., Georgiou G.: Conserved role of the linker alpha-helix of the bacterial disulfide isomerase DsbC in the

- avoidance of misoxidation by DsbB. *J. Biol. Chem.* **281**, 4911–4919 (2006)
71. Sevier C.S., Kaiser C.A.: Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 836–847 (2002)
72. Shao F., Bader M.W., Jakob U., Bardwell J.C.: DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 13349–13352 (2000)
73. Stafford S.J., Humphreys D.P., Lund P.A.: Mutations in *dsbA* and *dsbB*, but not *dsbC*, lead to an enhanced sensitivity of *Escherichia coli* to Hg²⁺ and Cd²⁺. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 179–184 (1999)
74. Stewart E.J., Katzen F., Beckwith J.: Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 5963–5971 (1999)
75. Stirnimann C.U., Rozhkova A., Grauschopf U., Grutter M.G., Glockshuber R., Capitani G.: Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome *c* maturation. *Structure*, **13**, 985–993 (2005)
76. Tu B.P., Weissman J.S.: Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* **164**, 341–346 (2004)
77. Xie T., Yu L., Bader M.W., Bardwell J.C., Yu C.A.: Identification of the ubiquinone-binding domain in the disulfide catalyst disulfide bond protein B. *J. Biol. Chem.* **277**, 1649–1652 (2002)
78. Zapun A., Bardwell J.C., Creighton T.E.: The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry*, **32**, 5083–5092 (1993)
79. Zapun A., Missiakas D., Raina S., Creighton T.E.: Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **34**, 5075–5089 (1995)
- Praca była finansowana w ramach dwóch grantów przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji (Nr 2 P05A 016 26) oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Nr 401 183 31/3968).

XXVI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW
„Drobnoustroje – wyzwania i nadzieje”

4–7 września 2008 r.

Miejsce obrad:

SZCZECIN

Rektorat Pomorskiej Akademii Medycznej, Zamek Książąt Pomorskich

Program Naukowy Zjazdu:

Przewiduje się wykłady plenarne i wykłady w sesjach tematycznych oraz doniesienia ustne i plakatowe.

Sesje tematyczne:

- A. Mikrobiologia Ogólna
- B. Mikrobiologia Medyczna
 - B.1 Bakteriologia
 - B.2 Wirusologia
 - B.3 Mikologia
 - B.4 Parazytologia
 - B.5 Antybiotyki i oporność
 - B.6 Zakażenia szpitalne
 - B.7 Immunologia infekcyjna
- C. Mikrobiologia Weterynaryjna
- D. Mikrobiologia Przemysłowa
- E. Mikrobiologia Środowiskowa
- F. Mikrobiologia Żywności
- G. Mikrobiologia Molekularna
- E. Forum Probiotyczne

Informacje dla Autorów, zgłoszenie uczestnictwa, wykładu, streszczenia (do 1.12.2007)

– szczegóły na stronie internetowej Zjazdu:

www.zjazdptm.konferencja.org oraz stronie internetowej: www.microbiology.pl

Warunki uczestnictwa:

Oплата rejestracyjna obejmuje materiały zjazdowe, uczestnictwo w obradach, poczęstunki, udział w imprezach towarzyszących

	do	po
	1.12.2007	
członkowie PTM	400 zł	500 zł
pozostałe osoby	500 zł	600 zł
osoby towarzyszące	200 zł	250 zł

Wpłaty prosimy dokonywać na konto:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów. Bank: BPH S.A.
53 1060 0076 0000 3200 0105 5596 z dopiskiem „Zjazd PTM”

Organizatorzy nie pokrywają kosztów delegacji i noclegów.
Proponowane hotele w pobliżu miejsc obrad będą podane na stronie internetowej zjazdu.

ROLA DWUSKŁADNIKOWYCH SYSTEMÓW REGULACYJNYCH W CHOROBTWÓRCZOŚCI I LEKOOPORNOŚCI BAKTERII

Marek Juda, Ewa Dadas, Anna Malm*

* Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. Prof. F. Skubiszewskiego
ul. dr. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: anna.malm@am.lublin.pl

Wpłynęło w lipcu 2006 r.

1. Wstęp. 2. Budowa dwuskładnikowych systemów regulacyjnych u bakterii. 3. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-dodatnich. 3.1. System AgrC/AgrA u *Staphylococcus* sp. 3.2. System BacR/BacS u *Bacillus* sp. 3.3. System VanS/VanR u *Enterococcus faecalis*. 3.4. System Kin/SpoOA u *Bacillus subtilis* 4. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-ujemnych. 4.1. Systemy AlgB/KinB i AlgR/AlgZ u *Pseudomonas aeruginosa*. 4.2. System BvgS/BvgA u *Bordetella pertussis*. 4.3. System EnvZ/OmpR u *Escherichia coli* 5. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii jako nowe potencjalne miejsca działania leków przeciwdrobnoustrojowych. 5.1. Naturalne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych. 5.2. Syntetyczne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych. 6. Podsumowanie

Significance of two-component regulatory systems in pathogenicity and drug resistance of bacteria

Abstract: Two-component regulatory systems are central elements of bacterial cell metabolism which recognize and respond to a variety of environmental stimuli like temperature, pH, osmolarity, Fe^{3+} concentration. This is accompanied by expression of genes including those encoding virulence factors and antibiotic resistance. These systems are composed of two basic elements – a histidine kinase and a response regulator. Histidine kinase, the integral membrane protein which recognizes environmental signals, catalyzes an ATP-dependent autophosphorylation of histidine residue (His). Subsequently the phosphoryl group is transferred to asparagine residue (Asp) of the cognate response regulator being a cytoplasmic protein. This is followed by activation or repression of genes being under the control of a given two-component regulatory system. Moreover, some of these systems are composed of additional proteins sequentially phosphorylated (His → Asp → His → Asp) between histidine kinase and response regulator. The integral role of two-component regulatory systems in bacterial cells suggests that these systems may be novel, promising targets for antibacterial agents. Two steps – the autophosphorylation of histidine kinase and the interaction between histidine kinase and response regulator can be considered as targets for action of chemical compounds. The conserved domains of the response regulator may represent the best target for inhibition. In recent years, various chemical compounds showing potential ability to inhibit two-component regulatory systems have been described.

1. Introduction. 2. Structure of two-component regulatory systems in bacteria. 3. Two-component regulatory systems in Gram-positive bacteria. 3.1. AgrC/AgrA system in *Staphylococcus* sp. 3.2. BacR/BacS system in *Bacillus* sp. 3.3. VanS/VanR system in *Enterococcus faecalis*. 3.4. Kin/SpoOA system in *Bacillus subtilis* 4. Two-component regulatory systems in Gram-negative bacteria. 4.1. AlgB/KinB and AlgR/AlgZ systems in *Pseudomonas aeruginosa*. 4.2. BvgS/BvgA system in *Bordetella pertussis*. 4.3. EnvZ/OmpR system in *Escherichia coli*. 5. Two-component regulatory systems as new, potential targets for antimicrobial agents. 5.1. Natural inhibitors of two-component regulatory systems. 5.2. Synthetic inhibitors of two-component regulatory systems. 6. Summary

Słowa kluczowe: dwuskładnikowy system regulacyjny, kinaza histydynowa, regulator odpowiedzi, regulacja ekspresji genów
Key words: two-component regulatory systems, histidine kinase, response regulator, regulation of gene expression

1. Wstęp

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne występują powszechnie w komórkach bakterii i odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji procesów życiowych, takich jak: kompetencja, koniugacja, sporulacja, bioluminescencja, synteza antybiotyków, ruchliwość, tworzenie biofilmu oraz synteza czynników chorobotwórczości; uczestniczą również w regulacji szlaków metabolicznych oraz transportu substancji odżywczych i jonów [27]. Systemy te umożliwiają adaptację komórek do zmieniających się warunków środowiskowych (temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, stęże-

nie jonów Fe^{3+}), regulując ekspresję określonych genów [8, 30]. Dotychczas opisano kilkaset tego typu systemów, przy czym funkcja wielu z nich nie została jeszcze poznana [21].

Badania ostatnich lat wykazały, że dwuskładnikowe systemy regulacyjne mogą stanowić nowe potencjalne miejsca dzielenia leków przeciwdrobnoustrojowych, co potwierdziły pierwsze próby ingerencji w ich funkcje [2, 10, 55, 56, 59]. Ma to szczególne znaczenie w erze narastającej lekooporności drobnoustrojów i pojawiania się szczepów wielolekoopornych, niewrażliwych na wszystkie obecnie znane antybiotyki i chemioterapeutyki.

2. Budowa dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

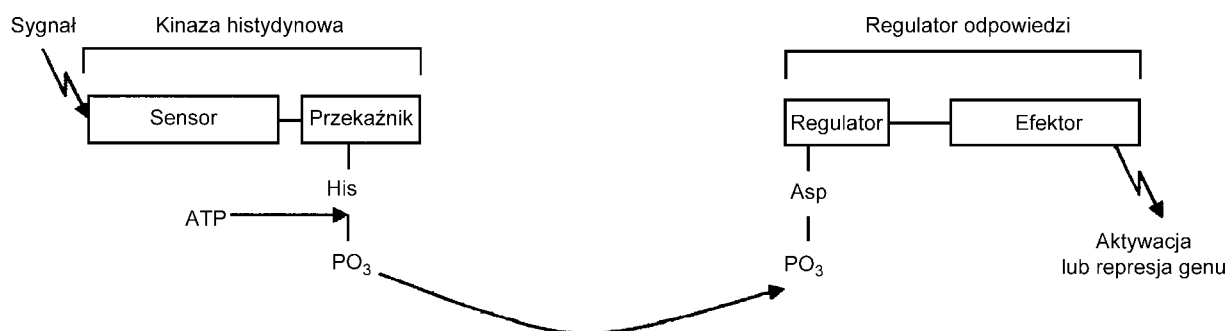
Dwuskładnikowe systemy regulacyjne tworzą dużą rodzinę spokrewnionych białek. Systemy te składają się z dwóch elementów: kinazy histydynowej i regulatora odpowiedzi. Ogólny schemat budowy dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w komórkach bakterii przedstawia się podobnie (Rys. 1). Kinaza histydynowa jest białkiem wbudowanym w błonę cytoplazmatyczną bakterii, natomiast regulator odpowiedzi jest białkiem znajdującym się w cytoplazmie komórki. W budowie kinazy histydynowej wyróżnia się domenę N-kończową, zwaną sensorem i domenę C-kończową o aktywności kinazy, zwaną przekaźnikiem [8, 16, 24, 47]. Sygnały ze środowiska zewnętrznego są odbierane bezpośrednio przez część sensorową kinazy histydynowej, co powoduje autofosforylację pierścienia imidazolowego reszty histydyny (His) w obrębie domeny przekaźnika przy udziale ATP z wytworzeniem wysokoenergetycznego wiązania fosforoamidowego. Należy dodać, że domena przekaźnika może mieć również aktywność fosfatazy, a więc odpowiadać za defosforylację His [8, 16, 24].

Dokładna analiza budowy kinaz histydynowych pozwoliła na wyodrębnienie dwóch klas tych białek w oparciu o organizację przestrzenną poszczególnych elementów, takich jak: H-box (akceptor reszty fosforanowej) i region wiązania ATP – CA (catalytic ATP-binding domain) [12, 16]. Należy zaznaczyć, że sekwencje aminokwasowe w obrębie regionu H-box są wysoce konserwatywne, charakterystyczne dla całej rodziny kinaz histydynowych. Pierwszą grupę tworzą kinazy typu EnvZ, najbardziej rozpowszechnione wśród dwuskładnikowych systemów regulacyjnych [12, 16, 24, 47, 55]. Region H-box znajduje się w bardzo bliskim sąsiedztwie regionu CA. Bardzo często domena przekaźnikowa może być związana z dodatkową podjednostką, tzw. Hpt (histidine phosphotransfer). Stanowi

ona donor grupy fosforanowej dla reszty asparaginowej regulatora odpowiedzi [12, 16]. W niektórych kinazach podjednostka Hpt może funkcjonować jako osobne białko pośredniczące w przekazywaniu reszty fosforanowej [16].

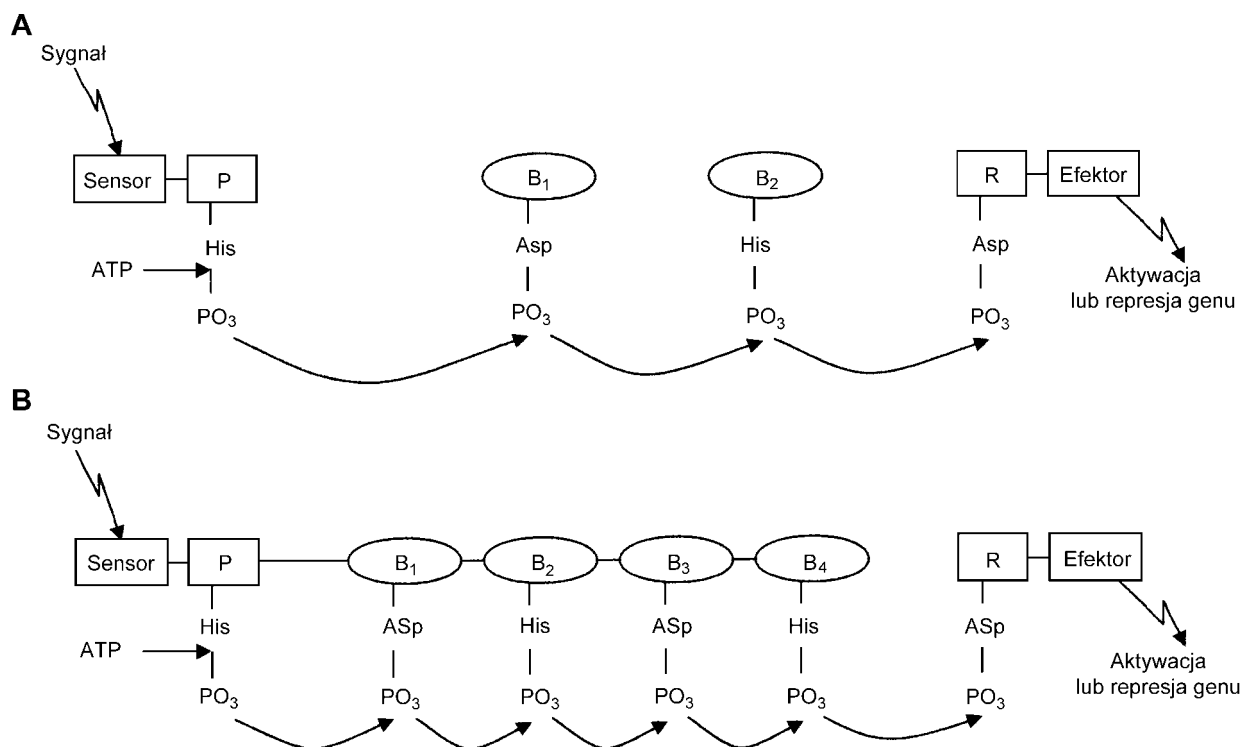
W kinazach typu CheA, stanowiących drugą klasę enzymów, regiony H-box oraz CA znajdują się w większej odległości od siebie i są oddzielone dodatkowymi domenami, a podjednostka Hpt zlokalizowana jest w bezpośrednim sąsiedztwie H-box. Kinaza histydynowa zbudowana z wielu takich domen nosi nazwę kinazy hybrydowej [12].

W następnym etapie przepływu informacji w obrębie dwuskładnikowego systemu regulacyjnego dochodzi do przeniesienia grupy fosforanowej z reszty His z domeny przekaźnikowej kinazy histydynowej na resztę asparaginową (Asp) regulatora odpowiedzi z wytworzeniem wysokoenergetycznego wiązania acylofosforanowego. To ufosforylowane białko funkcjonując jako regulator transkrypcji, decyduje o ekspresji genów, a tym samym o stopniu nasilenia produkcji białek zarówno strukturalnych jak i enzymatycznych [8, 16, 24]. W budowie regulatora odpowiedzi można wyróżnić część N-kończową i C-kończową. Część N-kończowa, zwana również domeną regulatorową lub odbiornikiem zawiera resztę Asp ulegającą fosforylacji. Domena efektorowa zlokalizowana w części C-końcowej posiada zdolność wiązania się z sekwencjami promotorowymi łańcucha DNA odpowiednich genów wpływając na poziom ich ekspresji. Przykładem takiej podjednostki jest sekwencja HTH (helix-turn-helix) [18]. Należy zaznaczyć, że po utworzeniu kompleksu pomiędzy regulatorem odpowiedzi a miejscem jego docelowego działania dochodzi do defosforylacji tego białka [16]. Różne regulatory odpowiedzi w swojej strukturze zawierają domenę akceptorową dla reszty fosforanowej typu CheY [18]. Podobnie jak w przypadku kinaz histydynowych również w obrębie regulatora odpowiedzi możemy wyodrębnić różne klasy



Rys 1. Schemat przedstawiający ogólny mechanizm działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Sygnały ze środowiska odbierane przez część N-kończową kinazy histydynowej (sensor), przekazywane są na część C-kończową (przeźnik), powodując autofosforylację reszty histydyny w domenie przekaźnikowej. Następnie reszta fosforanowa przenoszona jest na resztę asparaginy w części N-końcowej regulatora odpowiedzi, co powoduje łączenie się części C-końcowej, czyli efektora z sekwencjami promotorowymi odpowiednich genów wpływając na poziom ich transkrypcji (szczegóły w tekście).



Rys. 2. Schemat działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych działających w tzw. systemie sztafetowym

- A) przykład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego, w skład którego wchodzi dodatkowo, oddzielne białka przenoszące resztę fosforanową z kinazy histydynowej na regulator odpowiedzi,
 B) przykład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego zbudowanego z kinazy histydynowej oraz kompleksu białek przenoszących resztę fosforanową z kinazy na regulator odpowiedzi (szczegóły w tekście).

P – przekaźnik, R – regulator, B₁₋₄ – kolejne białka stanowiące dodatkowe elementy dwuskładnikowych systemów regulacyjnych.

białek, różniących się budową regionu odpowiedzialnego za wiązanie z DNA [55]. Najczęściej występują regulatory odpowiedzi należące do klasy OmpR, NarL i NtrC, obejmujące prawie 60% wszystkich opisanych regulatorów [18].

Niektóre dwuskładnikowe systemy regulacyjne wykazują nieco bardziej złożoną budowę. Charakteryzuje je obecność wielu białek przekazujących sobie kolejno grupę fosforanową. Poszczególne elementy tego ciągu mogą stanowić indywidualne białka (Rys. 2A) lub być połączone w wielodomenowe układy (Rys. 2B) [16]. Przenoszenie grup fosforanowych przebiega w porządku: His → Asp → His → Asp. Białka przenoszące grupy fosforanowe pełnią funkcję jedynie pośredniczącą, a właściwym regulatorem odpowiedzi w tym systemie jest ostatnie białko tego szeregu. Taki wielobiałkowy układ nosi nazwę „sztafety” i reguluje ekspresję genów białek uczestniczących w bardziej skomplikowanych szlakach metabolicznych [18]. Zidentyfikowano je m.in. w komórkach *Bacillus subtilis*, gdzie regulują ekspresję genów, odpowiedzialnych za wytwarzanie form przetrwalnych. Ponadto decydują o ekspresji genów kodujących czynniki chorobotwórczości u wielu drobnoustrojów, jak np. u *Bordetella pertussis*, *Candida albicans* czy *Aspergillus fumigatus* [53].

Zarówno w przypadku prostych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, jak i tzw. „sztafet”, regulator odpowiedzi jest czynnikiem regulującym transkrypcję, bezpośrednio kontrolując ekspresję genów pojedynczych lub zorganizowanych w operony. Pobudzenie dwuskładnikowego systemu regulacyjnego prowadzi do „włączenia” lub „wyłączenia” transkrypcji odpowiednich genów. Istotny jest fakt, że efekt kontroli pobudzonego systemu prowadzi zawsze do optymalnej modyfikacji metabolizmu bakterii w określonym środowisku, np. w organizmie gospodarza [53]. Należy dodać, że regulator odpowiedzi może również bezpośrednio uczestniczyć w regulacji innych procesów życiowych komórek bakterii. Przykładem jest regulator odpowiedzi CheY, który w połączeniu z kinazą CheA oraz fosfatazą CheZ, reguluje proces chemotaksji u *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica*, uwarunkowany ukierunkowanym ruchem bakterii; najprawdopodobniej białko CheY wchodzi w interakcję z „motorami” rzęsek [18, 50].

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne wykryto u licznych gatunków bakterii chorobotwórczych, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych oraz prątków. Dotychczas nie wykazano występowania tych systemów u mykoplazm [17, 18]. Lista kinaz histydynowych i regulatorów odpowiedzi dostępna w bazie

danych National Center for Biotechnology Information (NCBI) jest prezentowana na stronie internetowej http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes [22].

3. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-dodatnich

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne wykryto m.in. u *Staphylococcus* sp. (systemy ArlS/ArlR, AgrC/AgrB), *Streptococcus pneumoniae* (systemy ComD/ComE i CiaH/CiaR), *Enterococcus faecalis* (system kodowany przez operon *fsrABC*), *Lactococcus lactis* (system NisK/NisR), *Streptomyces lividans* (system CutS/CutR) czy *Bacillus subtilis* (system Kin/SpoOA) [15, 35, 43]. Należy wspomnieć, że *B. subtilis* jest obiektem intensywnych badań nad tego typu systemami. Możliwe jest to dzięki poznaniu sekwencji całego genomu tego drobnoustroju [13].

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne w komórkach bakterii Gram-dodatnich biorą udział w tzw. systemie *quorum sensing*, regulującym ekspresję genów w populacji bakterii w odpowiedzi na zmiany liczby komórek (gęstości populacji) żyjących w określonej niszy. Komórki bakterii wytwarzają specyficzne cząsteczki sygnałowe wydzielane do środowiska, które wiążą się ze specyficznymi sensorami w błonie cytoplazmatycznej, co powoduje transmisję sygnału na odpowiednie białko efektorowe i w konsekwencji skoordynowaną zmianę ekspresji genów kontrolujących ważne procesy życiowe w całej populacji komórek. W przypadku bakterii Gram-dodatnich funkcję takich cząsteczek sygnałowych pełnią oligopeptydy, np. peptyd AIP (autoinducing peptide), związany z dwuskładnikowym systemem regulacyjnym AgrC/AgrA u *S. aureus* [27].

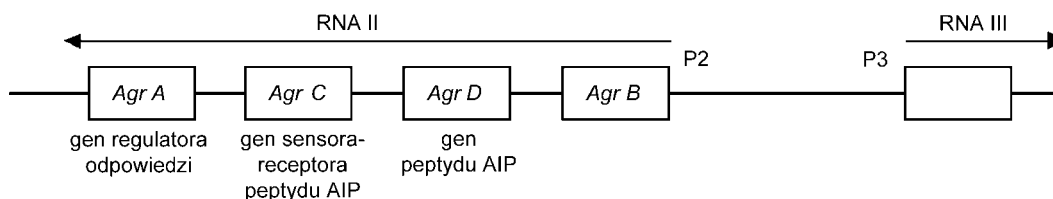
Poniżej opisane są przykłady dwuskładnikowych systemów regulacyjnych biorących udział w regulacji ekspresji genów warunkujących chorobotwórczość oraz lekooporność wybranych gatunków bakterii Gram-dodatnich, jak również system Kin/SpoOA u *B. subtilis*.

3.1. System AgrC/AgrA u *Staphylococcus* sp.

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne zostały opisane u *S. aureus*, a ostatnio również u *S. epidermidis* [41, 57, 63]. Jednym z pierwszych opisanych jest system AgrC/AgrA, który wpływa na ekspresję genów warunkujących syntezę egzotoksyn m. in. takich jak: hemolizyny a, b, d i g, czy toksyna wstrząsu toksycznego TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1); które stanowią ważne czynniki chorobotwórczości *S. aureus* [26, 31, 41, 60, 63]. Jest to, jak wspomniano, przykład systemu zaangażowanego w proces *quorum sensing* [63]. Region *agr* składa się z dwóch operonów, P2 i P3. Operon P2 koduje dwuskładnikowy system regulacyj-

ny i jednocześnie stanowi jednostkę tzw. autoindukcji, a operon P3 odpowiada za syntezę transkrypty RNA III. W skład operonu P2 wchodzi cztery geny, kolejno oznaczane jako *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA*. Gen *agrD* koduje peptyd sygnałowy AIP w postaci propeptydu pro-AIP, *agrB* – białko odpowiedzialne za przetwarzanie pro-AIP i jego sekrecję na zewnątrz komórki bakteryjnej w postaci o pełnej aktywności (AIP), *agrC* – transbłonową kinazę histydynową, stanowiącą jednocześnie receptor dla peptydu AIP, *agrA* – regulator odpowiedzi. Peptyd AIP, wydzielany na zewnątrz komórki bakteryjnej, łączy się z kinazą sensora AgrC, co prowadzi do autofosforylacji tego białka [26, 31, 41, 57, 63]. Prawdopodobnie możliwa jest również fosforylacja regulatora odpowiedzi bez udziału połączenia receptor/AIP. W następnym etapie dochodzi do fosforylacji regulatora odpowiedzi AgrA. Białko to wraz z białkiem SarA (staphylococcal accessory regulator) aktywuje promotory operonów P2 i P3 [60, 63]. W momencie aktywacji dwuskładnikowego systemu regulacji AgrC/AgrA, obok wzrostu ekspresji i w konsekwencji biosyntezy białek operonu P2, dochodzi również do wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego efektor RNAIII – produktu transkrypcji operonu P3, który działa jako efektor aktywujący transkrypcję wielu genów determinujących czynniki chorobotwórczości, w tym genu *hld* kodującego δ -hemolizynę oraz genów odpowiedzialnych za syntezę TSST-1 [26, 27, 38, 41, 50, 52, 63]. Rys. 3 przedstawia regulację operonów P2 i P3 przez system AgrC/AgrA u bakterii *Staphylococcus aureus*.

System AgrC/AgrA u *S. epidermidis* wpływa na zdolność tworzenia biofilmu, jednego z bardzo ważnych czynników chorobotwórczości tego drobnoustroju, „ubogiego” w produkcję zewnątrzkomórkowych enzymów. Okazało się, że mutanty w regionie *agr* mają znacznie większą zdolność do tworzenia tej struktury niż szczepy z prawidłową funkcją tych genów [41, 60, 63]. Jednocześnie stwierdzono, iż izolaty *S. epidermidis* O-47 (drobnoustrój wzorcowy w badaniu zdolności tworzenia struktury biofilmu), posiadają zmutowane i tym samym nieaktywne geny *agr*. V u o n g i wsp. [41, 60] wykazali, że system AgrC/AgrA nie wpływa na zdolność do szybkości podziałów komórkowych oraz kształt komórek bakteryjnych, a jedynie może mieć znaczenie we wczesnym etapie tworzenia struktury biofilmu, jakim jest adhezja drobnoustrojów do powierzchni biomateriałów. Dalsze badania wykazały, iż ekspresja genów *agr* nie ma żadnego wpływu na ekspresję regionu *icaADBC* warunkującego syntezę komórkowego antygeny PIA (polysaccharide intracellular antigen) – ważnego czynnika chorobotwórczości gronkowców koagulazo-ujemnych, biorącego udział w tworzeniu struktury biofilmu na etapie oddziaływań swoistych drobnoustrojów/biomateriał. Jednocześnie stwierdzono, że nawet wysoki poziom białka PIA nie



Rys. 3. Schemat regulacji operonów P2 i P3 przez system AgrC/AgrA u bakterii *Staphylococcus aureus*

Aktywacja systemu AgrC/AgrA powoduje zwiększenie syntezy peptydu AIP (produkt genu *agrD*, modyfikowany przez białko genu *agrB*); AIP po sekrecji na zewnątrz komórki bakteryjnej łączy się z sensorem, co prowadzi do aktywacji kinazy histydynowej AgrC i w konsekwencji regulatora odpowiedzi AgrA. Białko AgrA wraz z białkiem SarA aktywuje promotory operonów P3 i P2 (szczegóły w tekście).

jest wystarczający do tworzenia struktury biofilmu w przypadku braku mutacji w regionie *agr* [41, 60]. Uzyskane wyniki wskazują, że mutacje w obrębie genów *agr* i ekspresja regionu *ica* może doprowadzić do utworzenia szczepów o silnych właściwościach tworzenia struktury biofilmu [41, 60, 61, 63].

3.2. System BacR/BacS u *Bacillus* sp.

Bacytracyna należąca do grupy antybiotyków polipeptydowych jest wytwarzana przez szczepy *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*, a operonem odpowiedzialnym za syntezę tego antybiotyku jest *bacABC* [29, 39]. Jednocześnie komórki syntetyzujące ten lek wykazują na niego oporność. Związane jest to m.in. z obecnością operonu *bcrABC*, który koduje białka transportowe BcrABC odpowiedzialne za aktywny transport antybiotyku poza komórkę macierzystą. W obrębie genomu *B. licheniformis*, pomiędzy operonem *bacABC* i *bcrABC*, zidentyfikowano dodatkowe geny *bacRS*, które kodują typowy dwuskładnikowy system regulujący ekspresję genów *bcrABC*. System ten składa się z regulatora odpowiedzi BacR (gen *bacR*) i kinazy histydynowej BacS (gen *bacS*) [39].

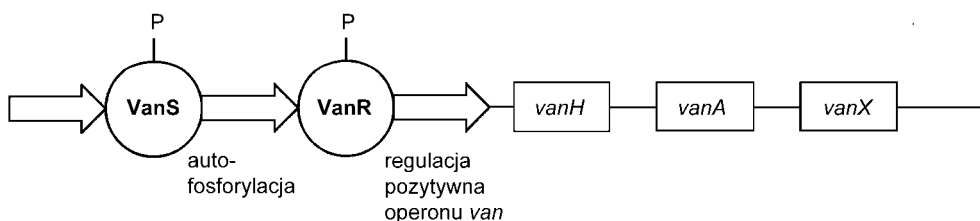
Badania poparte analizami Western-bloTT wykazały, że produkcja jednego z białek transportujących (BacA) jest regulowana w dodatnim sprzężeniu zwrotnym w stosunku do ilości wytwarzanej bacytracyny [39, 44]. Szczepy posiadające zmutowane geny *bacRS* wykazywały produkcję tego białka transportowego na stałym, wysokim poziomie, niezależnie od stężenia antybiotyku w środowisku, ale były wrażliwe na bacytracynę

[39, 44, 45]. Sugeruje to, iż ekspresja białek BcrABC może pozostawać pod ścisłą kontrolą genów *bacRS*, a prawidłowo działający system BacRS jest niezbędnym czynnikiem w autooporności bakterii z rodzaju *Bacillus* na wytwarzaną bacytracynę [39].

3.3. System VanS/VanR u *Enterococcus faecalis*

Pierwsze szczepy wykazujące niewrażliwość na wankomycynę pojawiły się wśród drobnoustrojów z rodzaju *Enterococcus* [46]. Wyróżnia się kilka typów oporności na antybiotyki glikopeptydowe wśród tej grupy bakterii. Jednym z nich jest fenotyp VanA charakteryzujący się wysoką opornością enterokoków zarówno na wankomycynę jak i teikoplaninę [9, 36, 46]. Geny *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA* i *vanX* tworzą operon *vanA* [8]. Zlokalizowany on jest na plazmidach lub transpozonach [9, 46]. Oporność na antybiotyki glikopeptydowe związana jest z zamianą jednego z końcowych elementów mostków pentapeptydowych peptydoglikanu, D-ala-D-ala (miejsce wiązania antybiotyków glikopeptydowych poprzez utworzenie pięciu wiązań wodorowych), na D-ala-D-lactate i tym samym zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do peptydoglikanu około 1000-krotnie [9, 36, 48]. Za utratę wrażliwości komórek enterokoków na antybiotyki glikopeptydowe odpowiada kilka enzymów:

- ligaza (gen *vanA*), która odpowiada za syntezę D-ψ-peptydów z prekursorów D-ala-D-lac,
- dehydrogenaza (gen *vanH*), która redukuje pirogronian, w wyniku czego dochodzi do utworzenia D-mleczanu,



Rys. 4. Schemat regulacji operonu *van* u *Enterococcus* sp.

Sygnal środowiskowy (wankomycyna) powoduje autofosforylację kinazy histydynowej (VanS), a w dalszej kolejności regulatora odpowiedzi (VanR). W konsekwencji prowadzi to do aktywacji genów dla białek odpowiedzialnych za fenotyp oporności typu VanA, takich jak: ligaza (*vanA*), dehydrogenaza (*vanH*), dipeptydaza (*vanX*) (szczegóły w tekście).

- dipeptydaza (gen *vanX*), odpowiadająca za hydrolizę wiązań amidowych D-ala-D-ala,
- karboksypeptydaza (gen *vanY*), która odczepia C-końcowe reszty D-alaniny (D-ala) od późniejszych prekursorów peptydoglikanu [1, 9, 36, 48, 49].

W dalszych badaniach prowadzonych głównie u *E. faecalis*, udowodniono, iż za ekspresję fenotypu oporności VanA odpowiada dwuskładnikowy system regulacyjny, kodowany przez geny *vanR* i *vanS*, również zlokalizowane w operonie *van*. Kinaza histydynowa VanS w odpowiedzi na obecność antybiotyku w środowisku ulega autofosforylacji, co w następnym etapie prowadzi do fosforylacji regulatora odpowiedzi VanR [9]. W konsekwencji powoduje to aktywację ekspresji genów *vanHAX* oraz syntezę wyżej opisanych enzymów, warunkujących oporność typu VanA szczepów *E. faecalis* na antybiotyki glikopeptydowe [36]. Schemat regulacji operonu *van* u *Enterococcus* sp. przedstawia Rys. 4.

3.4. System Kin/SpoOA u *Bacillus subtilis*

W niekorzystnych warunkach środowiska laseczki z rodzaju *Bacillus* są zdolne do tworzenia przetrwalników (endospor). Badania nad mechanizmem tworzenia endospor u *Bacillus subtilis* wykazały, jak bardzo złożony jest to proces. W tym procesie istotną rolę odgrywa m.in. dwuskładnikowy system regulacyjny Kin/SpoOA, kontrolujący ekspresję genów odpowiedzialnych za proces sporulacji oraz syntezę tzw. czynników sigma – białek, będących podjednostkami polimerazy RNA, które po połączeniu się z rdzeniem enzymu umożliwiają prawidłowe rozpoznanie sekwencji promotorowej [13, 28].

W skład dwuskładnikowego systemu regulacyjnego wchodzi cztery kinazy histydynowe: KinA (gen *kinA*), KinB (gen *kinB*), KinC (gen *kinC*) i ComP (gen *comP*). Aktywacja odpowiedniej kinazy powoduje proces fosforylacji reszty Asp kolejno trzech regulatorów odpowiedzi: SpoOF, SpoOB i SpoOA. Jest to przykład wielobiałkowego dwuskładnikowego systemu regulacyjnego – „sztafety”. Poziom ufosforylowanej formy białka SpoOA jest istotnym czynnikiem regulującym wzrost form wegetatywnych lub też inicjację procesu sporulacji, a tym samym warunkującym „decyzję” komórki, czy ma zacząć sporulację. To ufosforylowane białko hamuje ekspresję genu *abrB*, kluczowego w procesie inicjacji sporulacji, którego produkt – białko AbrB jest represorem genów odpowiedzialnych za sporulację. Zatem zahamowanie ekspresji genu *abrA* powoduje aktywację transkrypcji genów zaangażowanych w proces sporulacji [23, 54]. Należy dodać, że ufosforylowane białko SpoOA odpowiada również za aktywację genów zaangażowanych w późniejsze fazy procesu sporulacji, takich jak: *spoIIA*, *spoIIE*, *spoIIG*.

Produktami ekspresji tych genów są odpowiednio czynniki sigma: s^F , s^E i s^G . Te alternatywne czynniki są syntetyzowane tylko wtedy, gdy istnieje zapotrzebowanie na produkty będące pod ich kontrolą [13, 24, 28].

4. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii Gram-ujemnych

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne są również rozpowszechnione wśród bakterii Gram-ujemnych. Wykazano ich obecność m.in. u: *Neisseria meningitidis* (system MisS/MisR), *Salmonella enterica* (system BarA/SirA), *Pseudomonas aeruginosa* (systemy CbrA/CbrA, PhoP/PhoQ), *E. coli* (system EnvZ/OmpR) czy *Agrobacterium tumefaciens* (system VirA/VirS).

Najlepiej poznany dwuskładnikowy system regulacyjny wśród bakterii Gram-ujemnych jest system EnvZ/OmpR u *E. coli*, warunkujący syntezę białek porynowych w odpowiedzi na zmieniające się ciśnienie osmotyczne środowiska zewnętrznego (omówienie w rozdz. 4.3). Budowa kinazy sensora (EnvZ) oraz regulatora odpowiedzi (OmpR) stały się jednocześnie „wzorcowymi” modelami do wyodrębnienia różnych klas w obrębie tych białek (rozdz. 2). Stwierdzono homologię pomiędzy regulatorami odpowiedzi klasy OmpR wśród takich drobnoustrojów jak, np. *B. subtilis* (SpoOF), *S. pneumoniae* (Spy), *E. faecalis* (Efa), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu) i *Salmonella* Typhimurium (Sty) [55]. Podobną homologię możemy odnaleźć wśród kinaz sensora typu EnvZ u *Enterococcus* sp. (VanA), *B. subtilis* (KinA), *E. coli* (ArcB) [47].

Poniżej opisane są przykłady dwuskładnikowych systemów regulacyjnych warunkujących chorobotwórczość wybranych gatunków bakterii Gram-ujemnych oraz system EnvZ/OmpR u *E. coli*.

4.1. System AlgB/KinB i AlgR/AlgZ u *Pseudomonas aeruginosa*

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u *P. aeruginosa* należą do jednych z najlepiej poznanych. Do dnia dzisiejszego opisano około 60 takich systemów u tego drobnoustroju, m.in. system CbrA/CbrB, zaangażowany w regulację ekspresji genów kodujących szlaki metaboliczne wykorzystujące argininę, histydyne, prolinę jako źródła węgla i azotu (podobnie jak system NtrB/NtrC); system PprB/PprA, regulujący przepuszczalność błony komórkowej i wrażliwość na antybiotyki jak również wytwarzanie laktonu N-acylohomoseryny, biorącego udział w systemie *quorum sensing* u bakterii Gram-ujemnych; system PhoP/PhoQ, zaangażowany w regulację oporności na polimiksynę w odpowiedzi na stężenie jonów Mg^{2+} w środowisku zewnętrznym [11, 34, 37, 40].

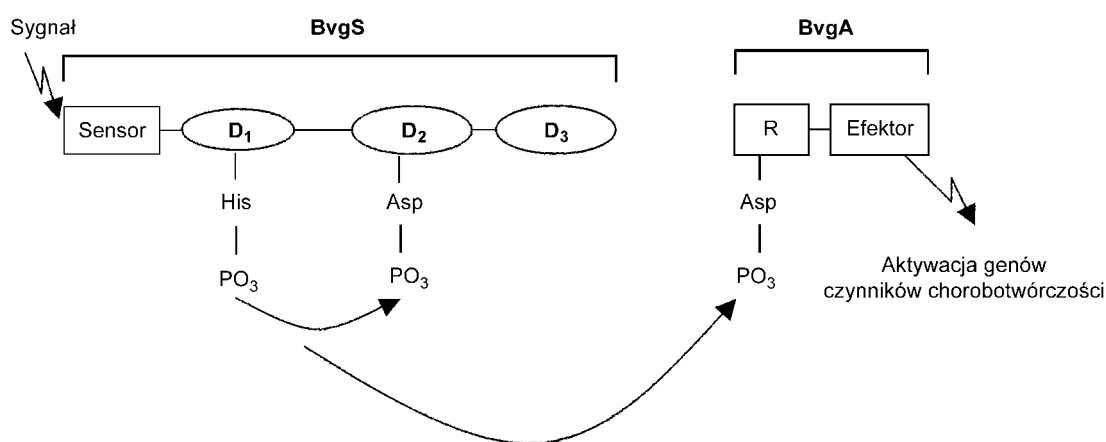
P. aeruginosa jest jednym z czynników etiologicznych przewlekłych zakażeń płuc, przede wszystkim u chorych z mukowiscydozą (CF – cystis fibrosis) [32, 33, 62]. Większość szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z CF są to izolaty posiadające zdolność wytwarzania egzopolisacharydu, zwanego alginianem, sprzyjającego tworzeniu biofilmu [32, 33]. Wysoki poziom syntezy alginianu związany jest z syntezą alternatywnego czynnika sigma (σ^{22}) kodowanego przez gen *algT* (*algU*). Czynniki te indukują ekspresję co najmniej 4 genów lub operonów niezbędnych w syntezie alginianu, m.in. takich jak: gen *algD*, warunkujący syntezę kluczowego enzymu – dehydrogenazy GDP-mleczanowej, czy też operonów *algB* i *algR*, kodujących dwuskładnikowe systemy regulacyjne [32, 33, 62, 64].

W systemach tych rolę kinaz histydynowych spełniają białka KinB i AlgZ, a regulatorów odpowiedzi białka AlgB (dla kinazy KinB) i AlgR (dla kinazy AlgZ). Oba te systemy kontrolują syntezę alginianu, poprzez aktywację procesu transkrypcji genu *algD* [32, 33, 62, 64]. Okazuje się jednak, iż w przypadku tych systemów kontrola ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę egzopolisacharydu nie może być rozpatrywana jako klasyczny proces zależny od reakcji fosforylacji poszczególnych domen [32]. Badania przeprowadzone przez Ma i wsp. [32] wskazują, że w warunkach *in vitro* defekt w fosforylacji regulatora odpowiedzi AlgB nie wpływa na syntezę alginianu i komórki te nadal produkują ten związek. W przypadku systemu AlgZ/AlgR wysunięto hipotezę, iż nieufosforylowana forma regulatora odpowiedzi AlgR może odgrywać rolę w nasileniu syntezy alginianu, natomiast postać ufosforylowana może mieć wpływ na inne funkcje komórki [32]. Przypuszcza się, że proces autofosforylacji kinaz histydynowych KinB i AlgZ może być uzależniony od obecności pewnych czynni-

ków *in vivo*, jakie występują m.in. u pacjentów z CF, np.: odwodnienie, wysoka osmolalność, zmniejszona zawartość związków odżywczych czy też obecność antybiotyków [33]. W konsekwencji może to pobudzać komórki do syntezy alginianu. Dlatego też zahamowanie procesów fosforylacji zachodzących w tych systemach może zapobiegać syntezie egzopolisacharydu w komórkach *P. aeruginosa* inicjując proces zasiedlenia organizmu gospodarza [32].

4.2. System BvgS/BvgA u *Bordetella pertussis*

B. pertussis jest czynnikiem etiologicznym krztuśca. Chorobotwórczość tego drobnoustroju jest uwarunkowana syntezą toksyn (toksyna krztuścowa, cyklaza adenylowa, cytotoksyna tchawicza, endotoksyna) oraz adhezyn (fimbrie otoczkowe). Synteza tych czynników, kontrolowana jest przez dwuskładnikowy system regulacyjny BvgS/BvgA. Białko BvgS (gen *bvgS*) spełnia rolę kinazy histydynowej, a białko BvgA (gen *bvgA*) – regulatora odpowiedzi. Kinaza BvgS stanowi przykład kinazy hybrydowej. Zbudowana jest z czterech podjednostek: sensora, przekaźnika, odbiornika zwanego regulatorem kinazy oraz części C-końcowej o nieznannej funkcji, oddzielonych krótkim i fragmentami bogatymi w reszty alanina/prolina. Część C-końcowa nie wykazuje homologii do innych znanych kinaz [58]. W przypadku kinazy BvgS dochodzi do autofosforylacji reszty His w domenie przekaźnika, a następnie reszty Asp w domenie odbiornika. Każda z tych ufosforylowanych reszt aminokwasowych może być donorem grup fosforanowych dla białka BvgA [58]. Białko to powoduje aktywację genu *ptx* kodującego toksynę krztuścową oraz genów *vir*, takich jak: gen *cyoA* – kodujący cyklazę adenylanową, czy geny *fim-1*, *fim-2*, *fimX*, kodujące fimbrie [6]. Należy dodać, iż w przypadku *Bordetella bronchoseptica* w odróżnieniu



Rys. 5. Schemat działania systemu BvgS/BvgA u *Bordetella pertussis*

Sygnał środowiskowy powoduje autofosforylację hybrydowej kinazy histydynowej (BvgS), a w dalszej kolejności regulatora odpowiedzi (BvgA).

W konsekwencji prowadzi to do aktywacji genów dla białek warunkujących chorobotwórczość tego drobnoustroju (szczegóły w tekście).

D₁ – domena przekaźnika, D₂ – domena odbiornika (regulatora kinazy), D₃ – część C-końcowa, R – regulator.

od *B. pertussis*, proces fosforylacji systemu BvgS/BvgA prowadzi do zahamowania wydzielania toksyn [55]. Rys. 5 przedstawia działanie systemu BvgS/BvgA u *B. pertussis*.

4.3. System EnvZ/OmpR u *Escherichia coli*

Jednym z najlepiej zbadanych dwuskładnikowych systemów regulatorowych jest wspomniany system EnvZ/OmpR u *E. coli*, odpowiedzialny za regulację syntezy białek porynowych w błonie zewnętrznej w odpowiedzi na zmieniające się ciśnienie osmotyczne środowiska zewnętrznego. Białko EnvZ (gen *envZ*) w systemie tym spełnia rolę kinazy histydynowej, a białko OmpR (gen *ompR*) – regulatora odpowiedzi. Ufosforylowana forma białka OmpR odpowiada za poziom ekspresji genów *ompC* i *ompF*, warunkujących syntezę białek porynowych w błonie zewnętrznej [5, 7, 20]. Białka te odpowiedzialne są za dyfuzję małych cząstek o masie cząsteczkowej mniejszej niż 650 Da i posiadających charakter hydrofilny. Regulacja odpowiednich białek porynowych uzależniona jest od wartości ciśnienia osmotycznego w środowisku życia bakterii. Stwierdzono, że niska osmoralność lub wysokie pH powodują fosforylację tylko ok. 3,5% białka OmpR w stosunku do całej jego zawartości w komórce bakteryjnej, a w konsekwencji powoduje to aktywację genu białka porynowego OmpF. W przypadku wysokich wartości ciśnienia osmotycznego lub niskiego pH, dochodzi do procesu fosforylacji ponad 10% całkowitego poziomu regulatora odpowiedzi i aktywacji syntezy białka porynowego OmpC oraz represji syntezy poriny OmpF [5, 7, 20].

5. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne u bakterii jako nowe potencjalne miejsca działania dla leków przeciwdrobnoustrojowych

Sprawne funkcjonowanie dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w komórkach bakterii pozwala im odpowiednio reagować na czynniki środowiska zewnętrznego. Również w sytuacji zasiedlania tkanek organizmu gospodarza, drobnoustroje są poddawane działaniu szeregu jego mechanizmów obronnych [57]. Obecność w komórkach bakterii dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, umożliwia patogenom pokonać te bariery, sprzyja podziałom komórkowym w tkankach gospodarza, prowadząc w ten sposób do rozwoju infekcji, obejmujących czasem cały organizm. Badania dwuskładnikowych systemów potwierdziły ich integralną rolę w patogenezie chorób infekcyjnych. Od kilku lat trwają więc w laboratoriach próby syntezy związków hamujących ich aktywność [2, 3, 56].

Skuteczny i bezpieczny środek przeciwdrobnoustrojowy powinien ingerować specyficznie w procesy życiowe bakterii, tzn. powinien wykazywać możliwie niską toksyczność w stosunku do komórek człowieka (gospodarza), a tym samym maksymalną wybiórczość działania. Powinien niszczyć komórkę bakteryjną i nie być toksyczny dla komórek gospodarza. Niektóre cechy dwuskładnikowych systemów czynią z nich godne uwagi potencjalne miejsca działania leków przeciwdrobnoustrojowych [56]. Ważnymi cechami tych systemów są:

- powszechne występowanie, czasami nawet w dużych ilościach, w komórkach patogenów, jak to ma miejsce w komórkach bakterii, na przykład *P. aeruginosa* gdzie zidentyfikowano ich ok. 60,
- funkcjonowanie jako integralna część mechanizmów odpowiedzialnych za metabolizm komórki drobnoustroju,
- nieobecność podobnych systemów w komórkach organizmów należących do królestwa zwierząt, a więc również i człowieka,
- wysoka konserwatywność kinaz sensora i regulatora odpowiedzi, zwłaszcza w obrębie miejsc aktywnych, co nasuwa wniosek, że środek przeciwdrobnoustrojowy ingerujący w dwuskładnikowe systemy regulacyjne decydujące o zjadliwości, wykazywać będzie szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego [56].

Mechanizm działania dwuskładnikowego systemu regulacyjnego wskazuje na kilka potencjalnych punktów dla ingerencji inhibitora: etap odbioru sygnału, autofosforylacja sensora, interakcja pomiędzy sensorem a regulatorem oraz wiązanie regulatora do promotora regulowanego genu [2, 56].

Ponadto, jeśli określone dwuskładnikowe systemy regulacyjne odpowiadają za antybiotykooporność, to ingerencja w ich działanie pozwoli zwiększyć wrażliwość szczepów na antybiotyki. Jeśli systemy te warunkują właściwości chorobotwórcze bakterii, to zahamowanie ich aktywności może przeciwdziałać kolonizacji organizmu gospodarza i rozwojowi choroby infekcyjnej.

5.1. Naturalne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Drobnoustroje z rodzaju *Streptomyces* mają zdolność produkcji wtórnych metabolitów o dużej aktywności przeciwbakteryjnej. W procesie fermentacji przebiegającej z udziałem *Streptomyces rimosus* otrzymano serię halogenowanych pirolo-benzoksazyn, tzw. streptopiroli [56]. Charakteryzują się szerokim zakresem działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego, a co istotne wykazują aktywność przeciwko wieloopornym szczepom *S. aureus* i *E. coli*. Mechanizm ich

działania polega na hamowaniu procesu autofosforylacji kinazy histydynowej. Jednocześnie sugeruje się, że obserwowana aktywność streptopiroli może być skutkiem również innych niespecyficznych efektów, takich jak proces agregacji [55, 56].

Wśród naturalnych inhibitorów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych znane są nienasycone kwasy tłuszczowe, które są inhibitorami zależnej od ATP autofosforylacji kinazy histydynowej, biorącej udział w tworzeniu form przetrwalnych przez *B. subtilis*. Znana jest też zdolność bromowych pochodnych związków fenolowych do hamowania aktywności systemu dwuskładnikowego u *A. tumefaciens* pozwalającego na infekowanie rośliny w miejscach zranienia [2].

5.2. Syntetyczne inhibitory dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Do syntetycznych inhibitorów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych możemy zaliczyć takie związki jak: salicylanilidy, sole imidazolu, bis-fenole, halo-fenylotiazolony, trityl czy benzimidazole i diarylotriazole [56].

Badania mechanizmu działania wykazały, że niektóre spośród najsilniej działających inhibitorów, jak na przykład salicylanilid czy benzimidazol, powodują hemolizę erytrocytów, nie naruszając jednocześnie błon komórkowych *S. aureus*. Fakt, iż wpływają destrukcyjnie na komórki zarówno prokariotyczne, jak i eukariotyczne, świadczy o tym, że obserwowana inhibicja wzrostu niektórych szczepów bakterii nie jest skutkiem wybiórczego hamowania systemów regulatorowych, ale również zaburzeń o innym charakterze [56]. Nie eliminuje to jednak znanych już syntetycznych inhibitorów jako potencjalnych skutecznych leków hamujących dwuskładnikowe systemy regulacyjne. Bis-fenole wykazują działanie hamujące kinazę histydynową VanS u enterokoków i metycylinoopornych szczepów gronkowca złocistego. Podobne właściwości wykazują izotiazolony, hamując system VanS/VanR [3, 56, 59].

Otrzymano również syntetyczne inhibitory systemu AgIR/AlgZ w komórkach *P. aeruginosa* kontrolujących syntezę alginianu. Substancje te nie działają bakterio-bójczo, ale hamują wytwarzanie alginianu przez mukoidalne szczepy *P. aeruginosa*, zwiększając tym samym wrażliwość tej bakterii na działanie antybiotyków i aktywność systemu immunologicznego gospodarza [2].

Przeglądanie bibliotek związków chemicznych umożliwia odnalezienie inhibitorów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych ale o niskiej selektywności i różnych mechanizmach działania. W poszukiwaniu skutecznych inhibitorów tych systemów korzystniejsze jest projektowanie nowych związków z uwzględnieniem struktury kinazy sensora i regulatora odpowiedzi jako punktu uchwytu [56].

6. Podsumowanie

Badania prowadzone w celu poznania działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, potwierdziły ich integralną rolę w adaptacji bakterii do zmieniających się czynników środowiskowych, w tym również skutecznej kolonizacji organizmu człowieka. Systemy te są też zaangażowane w regulację produkcji czynników chorobotwórczości bakterii oraz ekspresję oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki. Ten właśnie fakt czyni je godnymi zainteresowania elementami w komórkach bakterii z punktu widzenia medycznego i farmakologicznego.

W dobie narastającej lekooporności drobnoustrojów i pojawiania się szczepów wielolekoopornych, wykazujących oporność na obecnie dostępne antybiotyki i chemioterapeutyki, ważnym staje się zagadnienie poszukiwania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych. Poznanie działania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, ich funkcji dla życia komórki bakteryjnej oraz pierwsze badania nad związkami hamującymi ich działanie, stwarza nowe możliwości w poszukiwaniu nowych i skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych.

Piśmiennictwo

1. Arthur M., Depardieu F., Cabanié L., Reynolds P., Courvalin P.: Requirements of the VanY and VanX D, D-peptidase for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* **30**, 819–830 (1998)
2. Baj J.: Perspektywy walki z bakteriami chorobotwórczymi (w:) Z. Markiewicz, Z. Kwiatkowski, Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 199–228
3. Barrett J.F., Hoch J.A.: Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1529–1536 (1998)
4. Beier D., Schwarz B., Thilo M., Gross R.: *In vivo* characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* **248**, 596–610 (1995)
5. Bergstrom L.C., Qin L., Harlocker S.L., Egger L.A., Inouye M.: Hierarchical and co-operative binding of OmpR to a fusion construct containing the *ompC* and *ompF* upstream regulatory sequences of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, **3**, 777–788 (1998)
6. Bogdan J.A., Nazario-Larrieu J., Sarwar J., Alexander P., Blake M.S.: *Bordetella pertussis* autoregulates toxin production through the metabolism of cysteine. *Infect. Immun.* **69**, 6823–6830 (2001)
7. Cai S.J., Inouye M.: EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 24155–24161 (2002)
8. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P.: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacteria biofilm. *Science*, **280**, 295–298 (1998)

9. Depardieu F., Bonora M.G., Reynolds P.E., Courvalin P.: The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol. Microbiol.* **50**, 937–948 (2003)
10. Domagala J.M., Wold S. i wsp.: Bacterial two-component signalling as a therapeutic target in drug design. Inhibition of NRII by the diphenolic methanes (bisphenoles). *Adv. Exp. Med. Biol.* **456**, 269–286 (1998)
11. Dong Y.H., Zhang X.F., Soo H.M., Grenberg E.P., Zhang L.H.: The two-component regulatory PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **56**, 1287–1301 (2005)
12. Dutta R., Qin L., Inouye M.: Histidine kinase: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**, 633–640 (1999)
13. Fabret C., Feher V.A., Hoch J.A.: Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**, 1975–1983 (1999)
14. Fournier B., Hooper D.C.: A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, 3955–3964 (2000)
15. Fournier B., Klier A., Rapoport G. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 247–261 (2001)
16. Foussard M., Cabantous S., Pédelacq J.D., Guillet V., Tranier S., Mourey L., Birck C., Samama J.P.: The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* **3**, 417–424 (2001)
17. Galperin M.Y.: A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**, 35, <http://www.biomedcentral.com.1471-2180/5/35> (27 lipca 2006 r.)
18. Galperin M.Y.: Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**, 4169–4182 (2006)
19. Galperin M.Y., Niskolskaya A.N., Koonin E.V.: Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction system. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11–21 (2001)
20. Heyde M., Laloli P., Portalier R.: Involvement of karbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 198–202 (2000)
21. <http://www.expasy.org/cgi-bin/get-entries?KW=Two-component%20regulatory%20system> (27 lipca 2006 r.)
22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes (27 lipca 2006 r.)
23. Hoch J.A.: Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev. Microbiol.* **47**, 441–465 (1993)
24. Hoch J.A.: Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000)
25. Iuschi S.: Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 23972–23980 (1993)
26. Jaworski A., Dobrowolska A., Stączek P.: RNA kontroluje aktywność wielu ważnych genów i procesów życiowych w komórkach bakterii. *Post. Mikrobiol.* **44**, 89–98 (2005)
27. Jaworski A., Serwecińska L., Stączek P.: Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacji bakterii przy udziale chemicznych cząsteczek sygnałowych. *Post. Biol. Kom.* **32**, 231–256 (2005)
28. Koide A., Peregó M., Hoch J.A.: ScoC regulates peptide transport and sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**, 4114–4117 (1999)
29. Konz D., Klens A., Schörgendorfer K., Marahiel M.A.: The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthesis. *Chem. Biol.* **4**, 927–937 (1997)
30. Krajewska-Pietrasik D., Różalska B.: Znaczenie czynników środowiska zewnętrznego w regulacji ekspresji właściwości chorobotwórczych bakterii. *Post. Mikrobiol.* **34**, 435–451 (1995)
31. Lina G., Jarraud S., Ji G., Greenland T., Pedraza A., Etienne J., Novick R.P., Vandenesch F.: Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **28**, 655–662 (1998)
32. Ma S., Selvaraj U., Ohman D.E., Quarless R., Hassett D.J., Wozniak D.J.: Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**, 956–968 (1998)
33. Ma S., Wozniak D.J., Ohman D.E.: Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator AlgB. *J. Biol. Chem.* **272**, 17952–1960 (1997)
34. Macfarlane E.L., Kwasnicka A., Ochs M.M., Hancock R.E.: PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* **34**, 305–316 (1999)
35. Mascher T., Zähler D., Merai M., Balelle N., de Saizieu A.B., Hakenbeck R.: The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulation: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 60–70 (2003)
36. McKessar S.J., Berry A.M., Bell J.A., Turindge J.D., Paton J.C.: Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3224–3228 (2000)
37. McPhee J.B., Bains M., Winsor G., Lewenza S., Kwasnicka A., Brazas M.D., Brinkman F.S., Hancock R.E.: Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺ induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 3995–4006 (2006)
38. Morfeldt E., Panova-Sapundijeva I., Gustafsson B., Arvidsson S.: Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 195–201 (1996)
39. Neumüller A.M., Konz D., Marahiel M.A.: The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin “self-resistance” of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3180–3189 (2001)
40. Nishijyo T., Haas D., Itoh Y.: The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **40**, 917–731 (2001)
41. Novick R.P.: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**, 1429–1449 (2003)
42. Papakyriacou H., Vaz D., Sikor A., Louie M., McGavin M.J.: Molecular analysis of the accessory gene regulatory (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **181**, 990–1000 (2000)
43. Peregó M., Hoch J.A., Barrett J.F.: Functional genomics of Gram-positive microorganisms. *J. Bacteriol.* **186**, 903–909 (2004)
44. Podlessek Z., Comino A., Herzog-Valikonja B., Grabnar M.: The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resi-

- stance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 103–106 (2000)
45. Podlessek Z., Herzog B., Comino A.: Amplification of bacitracin transporter genes in the bacitracin producing *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 201–205 (1997)
46. Plessis P., Lamy T., Donnio P.Y., Autuly F., Grulois I., Le Prise P.Y., Avril J.L.: Epidemiologic analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus* strains in neutropenic patients receiving prolonged vancomycin administration. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 959–963 (1995)
47. Pirrung M.C.: Histidine kinases and two-component signal transduction systems. *Chem. Biol.* **6**, R167–R175 (1999)
48. Reynolds P.E.: Control of peptidoglycan synthesis in vancomycin-resistant enterococci: D, D-peptidase and D, D-carboxypeptidase. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 325–331 (1998)
49. Reynolds P.E., Depardieu F., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P.: Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon *Tn1546* requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* **13**, 1065–1070 (1994)
50. Sagi Y., Khans S., Eisenbach M.: Binding of the chemotaxis response regulator CheY of the isolated, intact switch complex of the bacterial flagellar motor. *J. Biol. Chem.* **278**, 25867–25871 (2003)
51. Schwan W.R., Langhorne M.H., Ritchie H.D., Stover C.K.: Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **38**, 23–28 (2003)
52. Shenkman B., Varon D., Tamarin I., Dardik R., Peisachov M., Savion N., Rubinstein E.: Role of *agr* (RNAIII) in *Staphylococcus aureus* adherence to fibrinogen, fibronectin, platelets and endothelial cells under static and flow conditions. *J. Med. Microbiol.* **51**, 747–754 (2002)
53. Soncini F.C., Groisman E.A.: Two-component regulatory system can interact to process multiple environmental signals. *J. Bacteriol.* **178**, 6796–6801 (1996)
54. Stephens C.: Bacterial sporulation: A question of commitment? *Curr. Biol.* **8**, R45–R48 (1998)
55. Stephenson K., Hoch J.A.: Two-component and phosphorelay signal-systems as therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 1–6 (2002)
56. Stephensen K., Hoch J.A.: Virulence- and antibiotic resistance associated signal transduction system of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol. Ther.* **93**, 293–305 (2002)
57. Tegmark K., Karlsson A., Arvidson S. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **37**, 398–409 (2000)
58. Uhl M.A., Miller J.F.: Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1163–1167 (1994)
59. Ulijasz A.T., Weisblum B.: Dissecting the VanRS signal transduction pathway with specific inhibitors. *J. Bacteriol.* **181**, 627–631 (1999)
60. Vuong C., Gerke C., Somerville G.A., Fidcher E.R., Otto M.: Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **188**, 706–718 (2003)
61. Vuong C., Götz F., Otto M.: Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **68**, 1048–1053 (2000)
62. Wozniak D.J., Ohman D.E.: Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J. Bacteriol.* **176**, 6007–6014 (1994)
63. Yarwood J.M., Schlievert P.M.: Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **112**, 1920–1925 (2003)
64. Yu H., Mudd M., Boucher J.C., Schurr M.J., Deretic V.: Identification of the *algZ* gene upstream of the response regulator *algR* and its participation in control of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **197**, 187–193 (1997)

Agnieszka Cisowska¹, Dorota Tichaczek-Goska¹, Waldemar Goska²

¹Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Akademii Medycznej
ul. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-367 Wrocław, tel. (071) 784-15-23, e-mail: dgoska@biolog.am.wroc.pl

²ZOZ MSWiA we Wrocławiu, Oddział Internistyczny z Salą Intensywnego Nadzoru Kardiologicznego
i Wczesnej Rehabilitacji Kardiologicznej, ul. Ołbińska 32, 50-233 Wrocław

Wpłynęło w listopadzie 2006 r.

1. Charakterystyka biochemiczna i genetyczna MBL. 2. Udział MBL w aktywacji dopełniacza. 3. Wiązanie się MBL do mikroorganizmów. 4. Znaczenie występowania niedoborów MBL w różnych chorobach. 5. Inne funkcje MBL. 6. Podsumowanie

Anti-infectious activity of human mannose-binding lectin (MBL)

Abstract: Mannose-binding lectin (MBL) is an important constituent of the innate immune system. It belongs to the collectin family of proteins which are characterized by the presence of both a collagenous region and a carbohydrate recognition domain. In humans the proteins of this family are encoded by a cluster of genes located on the long arm of the chromosome 10. Low levels of MBL are caused by single nucleotide polymorphisms within exon 1 or in the promoter region of the *MBL-2* gene. Such mutations have been shown to be associated with an increased susceptibility to many infections. Absence or extremely low concentration of serum MBL seems to be a risk factor for occurrence of some disorders, in particular autoimmune diseases.

MBL can bind through multiple sites to a range of sugars including mannose, N-acetylglucosamine and interact with a wide spectrum of bacteria, viruses, yeasts, fungi, and protozoa decorated with such sugars. MBL bound to microbial surfaces is able to activate complement system via the lectin pathway. This protein may also interact directly with cell surface receptors and thereby promote opsonophagocytosis by a complement-independent pathway. There have been a number reports that MBL can modulate the inflammatory response, but it is likely that the nature of the response is different for various organisms or group of organisms.

1. Biochemistry and genetics of MBL. 2. MBL as a complement activator. 3. MBL binding to microorganisms. 4. MBL deficiency and associated diseases. 5. Other functions of MBL. 6. Summary

Słowa kluczowe: dopełniacz, białko wiążące mannozę, niedobory MBL, opsonofagocytoza
Key words: complement, mannose-binding lectin, MBL deficiency, opsonophagocytosis

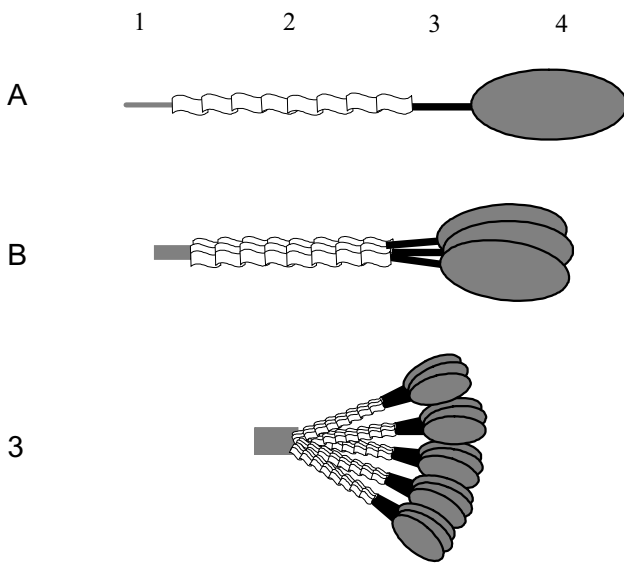
1. Charakterystyka biochemiczna i genetyczna MBL

Białko wiążące mannozę (MBL, *mannose-binding lectin*) jest kolektyną należącą do lektyn zwierzęcych typu C [63, 86]. Oprócz MBL do grupy kolektyń zaliczane są również: białka surfaktantu płucnego A i D (SP-A i SP-D), kolektyna wątroby 1 (CL-L1), kolektyna łożyska 1 (CL-P1), konglutynina, kolektyna 43 (CL-43) i kolektyna 46 (CL-46) [86]. Białka te, będąc elementami wrodzonej odporności, odgrywają kluczową rolę jako pierwsza linia obrony organizmu wyższego przed zakażeniem. Ważną cechą tej grupy białek jest zdolność rozpoznawania patogenów, co wymaga odróżnienia węglowodanowych struktur powierzchniowych komórek własnych i obcych.

MBL należy do białek ostrej fazy i jego produkcja w organizmie stymulowana jest przez czynniki zapalenia. MBL jest glikoproteiną osocza, produkowaną głównie w wątrobie. Stwierdzono także jej obecność na powierzchni błon śluzowych np. układu pokarmowego [86, 88]. MBL występuje w osoczu w postaci oligomerów składających się z 3 do 6 jednostek. Najczęściej są to heksamery o strukturze podobnej do bukietu kwiatów. Każda z tych jednostek jest tripletem

32 kDa łańcuchów polipeptydowych. Pojedynczy łańcuch, składający się z 228 aminokwasów, zawiera cztery domeny: N-końcową sekwencję bogatą w reszty cysteinowe, region kolagenowy, region „szyjny” i C-końcową domenę wiążącą węglowodany (CRD, *carbohydrate-recognition domain*) (Rys. 1) [63, 83].

Region N-końcowy zbudowany jest z 21 aminokwasów i zawiera cząsteczki cysteiny, dzięki którym tworzą się mostki disiarczkowe (SS) pomiędzy pojedynczymi łańcuchami peptydowymi i tripletami MBL [63, 83, 86]. Mostki SS oraz oddziaływanie hydrofobowe stabilizują strukturę tripletu. Domena kolagenowa (59 reszt aminokwasowych) zawiera 19 powtarzających się sekwencji Gly-X-Y, gdzie X i Y są dowolnymi aminokwasami, ale często są to O-glikozylowane prolina lub hydroksyprolina [63]. Region ten tworzy w triplecie MBL strukturę heliksu, która jest stosunkowo oporna na działanie proteaz [86]. Domena kolagenowa jest odpowiedzialna za wiązanie się MBL z proteazami serynowymi MASP-1 i MASP-2, co prowadzi do aktywacji układu dopełniacza. Łączy się ona także z receptorem dla składowej C1q dopełniacza (kalretikulina, cC1qR) [58]. Hydrofobowy region „szyjny” (30 aminokwasów – aa) ma strukturę α -helisy, która



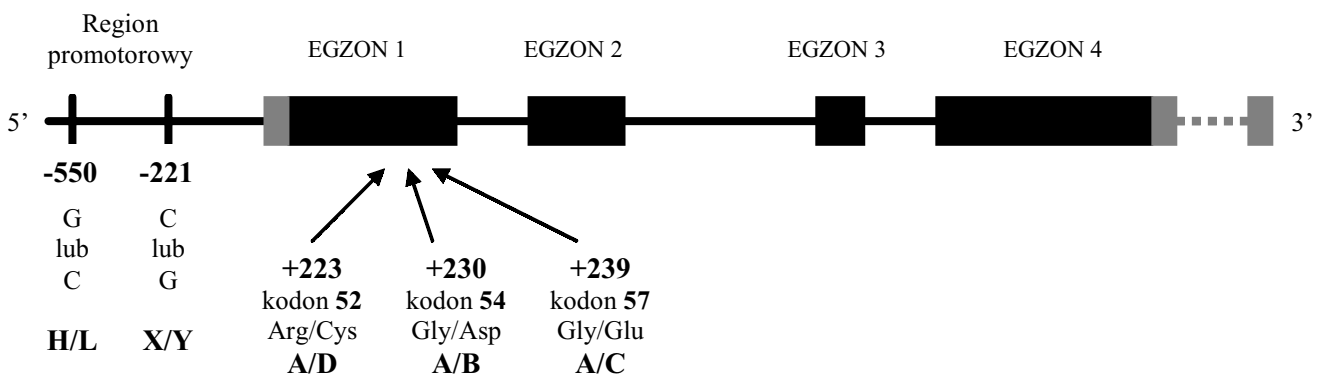
Rys. 1. Budowa MBL

A. pojedynczy łańcuch MBL: 1 – domena bogata w reszty cysteinowe, 2 – region kolagenowy, 3 – „szyjka”, 4 – domena CRD. B. trimer MBL. C. Struktura białka MBL obecnego w surowicy (za zgodą Wydawcy, wg [83]; zmodyfikowany)

najprawdopodobniej wymusza tworzenie tripletów MBL. Rekombinanty białkowe zawierające tylko region CRD i „szyjny” są zdolne do tworzenia trimerów, natomiast pozbawione regionu „szyjnego” ulegają jedynie dimeryzacji. Region CRD (118 aa) zawiera 22-aminokwasowe konserwatywne sekwencje, posiadające cztery cysteiny. Reszty cysteinowe zdolne są do tworzenia wewnątrzłańcuchowych mostków SS, niezbędnych do prawidłowego fałdowania domeny CRD. Domeny CRD mają zdolność łączenia się z węglowodanami. Oligomeryzacja powoduje zwielokrotnienie ilości domen CRD w jednej cząsteczce MBL, co zwiększa zdolność wiązania się tego białka do ligandów węglowodanowych. Cząsteczki MBL z mniejszą ilością tripletów łączą się mniej efektywnie ze strukturami cukrowymi i słabiej aktywują układ dopełniacza [7].

Domeny CRD posiadają także miejsca wiązania jonów wapnia. Jony Ca^{2+} są bezpośrednio zaangażowane w interakcję cząsteczki MBL z ligandami cukrowymi poprzez tworzenie wiązań koordynacyjnych z ekwatorialnie położonymi grupami hydroksylowymi trzeciego i czwartego węgla danego cukru. Takie ułożenie grup -OH jest wymuszone obecnością wiązań wodorowych pomiędzy aminokwasami w polipeptydzie i zawiąza wiązanie się MBL do określonych cukrów, takich jak: N-acetylo-D-glukozamina, mannoza, N-acetylomannozamina, L-fukoza i glukoza [28, 89]. Jony Ca^{2+} mogą ponadto wpływać na tworzenie prawidłowej struktury przestrzennej CRD [56].

Gen kodujący białko MBL (*MBL-2*) zlokalizowany jest u człowieka na długim ramieniu chromosomu 10 (10q11.2-q21) i zawiera cztery egzony [69]. Egzon 1 koduje region N-terminalny bogaty w cysteinę oraz część regionu kolagenowego. Egzon 3 koduje hydrofobowy region „szyjny”, natomiast C-terminalna domena CRD kodowana jest przez egzon 4. Promotor zlokalizowany jest powyżej egzonu 1 genu *MBL-2* (Rys. 2) [44]. W egzonie 1 genu *MBL-2* opisano polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP – *single nucleotide polymorphism*) i w związku z tym wyróżniono: dziki allel A genu oraz trzy jego warianty oznaczone jako allele B, C i D. Pierwsza opisana mutacja punktowa (allel B) dotyczy nukleotydu 230 w kodonie 54 [79]. Polega ona na substytucji GGC na GAC, czego skutkiem jest zamiana glicyny na kwas asparaginowy w polipeptydzie. Tranzycja guaniny na adeninę w 239 pozycji kodonu 57, czego wynikiem jest zamiana glicyny na kwas glutaminowy, jest określana jako wariant C [41]. Allele B i C zaburzają ilość powtórzeń sekwencji Gly-X-Y w regionie kolagenowym, czego efektem jest nieprawidłowe formowanie struktury helisy w triplecie tej domeny. Trzecią opisaną mutacją w egzonie 1 (allel D) jest podstawienie cytozyny przez tyminę w pozycji 223 kodonu 52, czego skutkiem jest zamiana argininy na cysteinę [43]. Zwięk-



■ - regiony nie podlegające translacji

■ - regiony kodujące

Rys. 2. Struktura genu *MBL-2*
(za zgodą Wydawcy, wg [83]; zmodyfikowany)

szona ilość cząsteczek cysteiny może zaburzać formowanie oligomeru poprzez tworzenie dodatkowych mostków disiarczkowych. Mutacje w egzonie 1 występują z niejednakową częstością w różnych grupach etnicznych. Wariant B spotykany jest u 22–28% Euroazjatów. Wariant C jest charakterystyczny dla Murzynów subsaharyjskich i może występować w tej populacji u 50–60% ludzi. Mutacja D spotykana jest u 14% Europejczyków, natomiast w innych populacjach jest znacznie rzadsza [84].

SNPs wykryto także w regionie promotorowym genu *MBL-2* w pozycjach –550 (wariant H/L), –221 (wariant X/Y) oraz pozycji +4 (wariant P/Q). Mają one wpływ na ekspresję tego genu. Najczęściej występujące haplotypy, wynikające z różnych kombinacji opisanych polimorfizmów, to: HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYPB, LYQC i HYPD [45, 85]. Występowanie dzikiego allelu A oraz haplotypów HY i LY związane jest z wysokim poziomem MBL w osoczu, podczas gdy LX z niskim [44, 45].

Stężenie MBL w osoczu zależy od wieku. U noworodków wynosi ono około 2/3 poziomu osoby dorosłej i w ciągu kilku tygodni po porodzie osiąga ilość obserwowaną u dorosłych [1]. Stężenie tej lektyny w osoczu jest bardzo zróżnicowane w populacji ludzkiej i wynosi od <10 ng/ml do 10 µg/ml. Determinowane jest to głównie przez polimorfizm genu MBL. Niedobór MBL jest obserwowany u około 5% populacji i jest związany z ostrymi i nawracającymi infekcjami u dzieci. K a k k a n a i a h i wsp. [32] znacznie częściej obserwowali bardzo niskie stężenie MBL (<5 ng/ml) u dzieci i dorosłych z nawracającymi infekcjami niż u osób zdrowych, czego wynikiem była słaba zdolność opsonizacyjna surowicy tych pacjentów.

2. Udział MBL w aktywacji dopełniacza

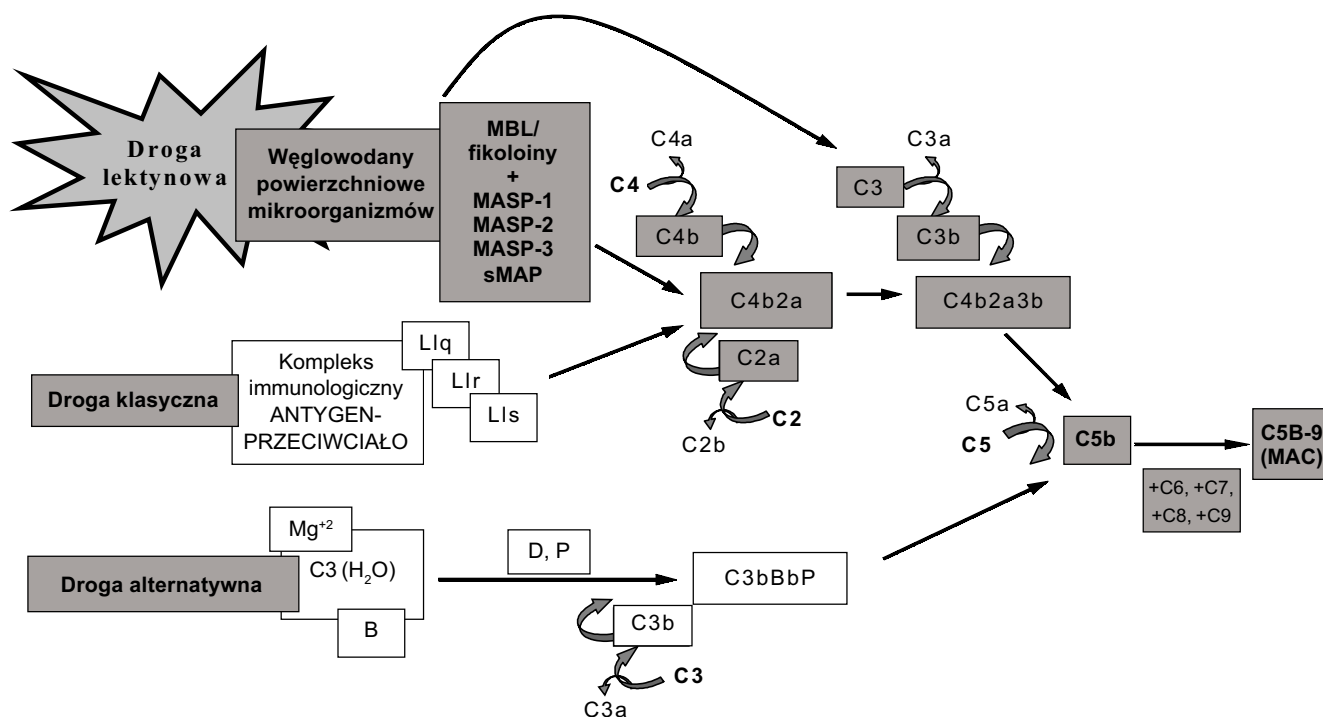
MBL jest jedynym białkiem z grupy kolektyn, które aktywuje układ dopełniacza. Składa się on z około 25 białek, z których część ma charakter enzymatyczny, produkowanych głównie przez komórki wątroby oraz monocytu/makrofagi [15, 74]. Działanie białek dopełniacza kontrolowane jest przez ponad 10 czynników m.in. C1-INH (inhibitor C1), fI i fH (czynniki I oraz H), DAF (CD55), MCP (CD46) i inne [52, 73]. Większość białek dopełniacza krąży we krwi oraz różnych płynach ustrojowych w formie nieaktywnej. Podczas aktywacji, mającej charakter kaskadowy, nieaktywne proenzymy ulegają przekształceniu w proteazy, dla których substratami są kolejne białka układu dopełniacza. Aktywacja tego układu odbywa się na drodze lektynowej, klasycznej i alternatywnej (Ryc. 3).

Lektynowa droga aktywacji dopełniacza jest niezależna od przeciwciał. Polega ona na wiązaniu się

(w obecności jonów Ca^{2+}) białka MBL z cukrami obecnymi na powierzchni różnych patogenów, takich jak bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki [73, 84]. Siła tego wiązania zależy od rodzaju cukru i w przypadku ludzkiego MBL jest następująca: N-acetyloglukozamina > mannoza, N-acetylomannozamina, fukoza > maltoza > glukoza > galaktoza, N-acetylogalaktozamina [28]. Białko MBL krąży w surowicy w kompleksie z proteazami serynowymi MASP-1, MASP-2, MASP-3 oraz nieproteazową pochodną MASP-2 – sMAP (*small MBL-associated protein*, Map19), których budowa przypomina strukturę składowych C1r i C1s dopełniacza. Związanie się MBL z cząsteczką cukru powoduje przekształcenie proenzymów proteaz serynowych, zawierających jeden polipeptyd, w ich aktywne formy zbudowane z dwóch łańcuchów polipeptydowych (H-high i L-light). Stwierdzono, że MASP-1 rozszczepia składowe C3 i C2 dopełniacza, a MASP-2 rozbija składowe C4 i C2. Wynikiem tych oddziaływań jest utworzenie konwertazy C3 (C4b2a) [13, 15]. MASP-3 jest alternatywnym produktem obróbki potranskrypcyjnej genu MASP-1. Funkcja tej proteazy polega na blokowaniu aktywności MASP-2, natomiast znaczenie sMAP pozostaje niewyjaśnione [15, 49, 73]. D a h l i wsp. [10] stwierdzili, że różne oligomery MBL krążą w surowicy w połączeniu z określonymi proteazami serynowymi. MASP-1 i sMAP wiążą się z mniejszymi oligomerami MBL, podczas gdy MASP-2 i MASP-3 z większymi. Znaczenie biologiczne takiego specyficznego wiązania się MBL nie zostało jeszcze wyjaśnione.

Droga lektynowa może być aktywowana także przez grupę białek zwanych fikolinami, które podobnie jak MBL mają zdolność wiązania się z proteazami serynowymi. U ludzi zidentyfikowano trzy rodzaje fikolin nazwanych: L, H i M. Zaobserwowano, że fikoliny L i H aktywują dopełniacz na drodze lektynowej w powiązaniu z białkami MASP. Nie dowiedziono, czy podobną aktywność posiada również fikolina M. Wykazano natomiast, że może ona działać jako receptor fagocytarny dla patogenów, obecny na powierzchni krążących we krwi monocytów oraz makrofagów w płucach i śledzionie. Ludzkie fikoliny wiążą się z N-acetyloglukozaminą, ale nie z cząsteczkami mannozy. Ponadto fikolina H ma zdolność łączenia się z N-acetylogalaktozaminą [15, 49, 73].

Droga klasyczna rozpoczyna się przyłączeniem składnika C1q do kompleksu złożonego z antygenem i jednej cząsteczki przeciwciała klasy IgM lub antygenem i dwóch cząsteczek przeciwciał klasy IgG (kompleks immunologiczny), co stanowi sygnał do aktywacji podjednostek C1r i C1s [73, 74]. Aktywna podjednostka C1s powoduje proteolityczny rozkład C4 oraz C2 na podjednostki a i b. Podjednostki C4b i C2a tworzą enzym – konwertazę C3 (C4b2a).



Rys. 3. Drogi aktywacji dopełniacza

Aktywacja dopełniacza na drodze alternatywnej odbywa się spontanicznie i nie wymaga udziału przeciwciał. Do aktywatorów tej drogi zalicza się bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (szczególnie polisacharydy ścian bakteryjnych), wirusy i zarażone przez nie komórki, grzyby, pierwotniaki, niektóre robaki pasożytnicze oraz komórki nowotworowe. W początkowej fazie aktywacji pobudzona forma czynnika C3, C3(H₂O), wiąże się w obecności jonów Mg²⁺ z czynnikiem B. Powstały kompleks C3(H₂O)B oddziałuje z białkiem D, które powoduje oddysocjowanie podjednostki Ba. Następuje hydroliza C3 do C3a i C3b. Utworzona w ten sposób konwertaza C3, (C3bBbP), stabilizowana jest properdyną (P) [73, 74].

Powstałe konwertazy wszystkich trzech dróg aktywują czynnik C3, w wyniku czego powstają: podjednostka C3a o charakterze anafilatoksyny, C3b – mająca zdolność wiązania się do błony docelowej oraz iC3b – zdefektowane białko biorące udział w opsonizacji, lecz nie aktywujące końcowych białek układu dopełniacza. Cząsteczki C3b stanowią również składową konwertaz C5 drogi klasycznej i lektynowej (C4b2a3b) oraz drogi alternatywnej (C3bBbP). Powodują one proteolizę czynnika C5 na C5a i C5b. Fragment C5b przyłącza kolejno pozostałe składniki dopełniacza (C6, C7, C8 i C9) tworząc w błonie komórki docelowej kompleks atakujący błonę C5b-9 (*membrane attack complex* – MAC). MAC uszkadza błonę poprzez tworzenie w niej kanałów, prowadząc do zaburzeń gospodarki jonowej, nieodwracalnych zmian w metabolizmie komórki, a w rezultacie do jej śmierci [73, 74].

Wykazano, że oprócz organizmu człowieka, w pełni rozwinięty system dopełniacza, ze wszystkimi trzema drogami aktywacji, występuje w różnych grupach systematycznych zwierząt (zarówno u ryb chrzęstnoszkieletowych, jak i wyższych kręgowców). Jednakże nie wszystkie komponenty tego systemu zostały do tej pory zidentyfikowane. Również u niektórych bezkręgowców wykryto obecność kilku ważnych składników komplementu, takich jak: C3 i sekwencje C2/B-podobne (jeżowce), czy GBL (*glucose binding lectin*), lektynę homologiczną z MBL i fikolinami, proteazy serynowe MASP, a także czynnik C3 (żachwy) [15, 74].

3. Wiązanie się MBL do mikroorganizmów

Interakcja MBL z powierzchnią komórek docelowych została potwierdzona badaniami nad zdolnością łączenia się tej kolektyny do cukrów obecnych w strukturach powierzchniowych (np. LPS) określonych mikroorganizmów (Tab. I) [31]. Wykazano również, że zmiany w kompozycji cukrów mogą mieć istotny wpływ na obniżenie wiązania się MBL z powierzchnią komórki, co może być ważnym mechanizmem wirulencji bakterii. Nie jesteśmy jednak w stanie jednoznacznie przewidzieć, jaka będzie interakcja MBL z konkretnym organizmem, mimo iż niejednokrotnie bardzo dobrze znamy sekwencję cząsteczek cukrów w strukturach powierzchniowych określonego patogenu.

Wiele badań koncentruje się na patogennych *Neisseria meningitidis* i *N. gonorrhoeae*, ponieważ do peł-

Tabela I
Wiązanie MBL do różnych mikroorganizmów (za zgodą Wydawcy, wg [31]; zmodyfikowana)

Organizmy, dla których określono ilościowo zdolność wiązania MBL do powierzchni ^a				
Organizmy	Nie wykrywalna	Niska	Średnia	Wysoka
Badano pojedyncze szczepy lub nie wykazano różnic pomiędzy pokrewnymi szczepami	<i>Enterococcus faecalis</i>			
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
	β-hemolityczne paciorkowce grupy B			
	<i>Streptococcus suis</i>			
	<i>Clostridium</i> sp.			
	<i>Listeria monocytogenes</i>			
	<i>Neisseria mucosa</i>			
	<i>Neisseria subflava</i>			
	<i>Neisseria cinerea</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	<i>Propionibacterium acnes</i>			
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>			
	<i>Burkholderia cepacia</i>			
	<i>Actinomyces israelii</i>			
	<i>Cryptosporidium parvum</i> (sporozoity)			
Notowano bardzo dużą zmienność pomiędzy szczepami	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
	β-hemolityczne paciorkowce grupy A			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	<i>Klebsiella</i> sp.			
	<i>Escherichia coli</i>			
	<i>Haemophilus influenzae</i>			
	<i>Eubacterium</i> sp.			
	<i>Fusobacterium</i> sp.			
	<i>Veillonella</i> sp.			
	<i>Bacteroides</i> sp.			
	<i>Candida albicans</i>			
<i>Aspergillus fumigatus</i>				
Duże różnice w zależności od struktury powierzchniowej danego szczepu	<i>Salmonella enterica</i> sv.Typhimurium			
	<i>S. enterica</i> serowar Montevideo			
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
	<i>Neisseria meningitidis</i>			
	<i>Cryptococcus neoformans</i>			
Wykrywalna zdolność przyłączania się MBL do organizmów ^b				
<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , HIV, wirus grypy typ A				
Prawdopodobne przyłączanie się MBL do organizmów ^c				
<i>Leishmania chagasi</i>				

^a – organizmy, dla których zdolność wiązania się MBL została zestawiona z licznymi innymi organizmami lub ze standardem. Grupa zawiera głównie organizmy opisane w [39, 54, 82, 87], które zostały podzielone na 3 grupy.

^b – organizmy, do których przyłączanie się MBL potwierdzają jedynie pojedyncze doniesienia, ale bez możliwości określenia ilościowej zależności z innymi organizmami.

^c – organizmy, do których MBL prawdopodobnie się wiąże.

nej obrony organizmu gospodarza przed zakażeniem tymi bakteriami niezbędna jest aktywacja dopełniacza na wszystkich trzech drogach. Dla większości mikroorganizmów opsonizacja komórki patogenu przez składowe C3b/iC3b dopełniacza stymuluje fagocyto-

zę, co jest wystarczające w ochronie przed rozwojem zakażenia. Takiej sytuacji nie obserwuje się w przypadku patogennych *Neisseria*, które są słabo fagocytowane przez neutrofile nawet po opsonizacji składową C3 dopełniacza [66]. Lipooligosacharyd (LOS)

szczerpów z rodzaju *Neisseria* często zawiera kwas sjałowy jako terminalną cząsteczkę występującą zamiast łańcucha O-swoistego [84]. Badania z wykorzystaniem izogennych mutantów *N. meningitidis*, wykazały, że organizmy sjałylowane są odporne na atak MBL i przez to niewrażliwe na bakteriobójcze działanie surowicy, podczas gdy desjałylowane są wrażliwe [84]. Zdolność wiązania się MBL do tych szczerpów była także obniżona dzięki obecności otoczki zbudowanej z homopolimeru kwasu sjałowego. Miało to jednak o wiele mniejsze znaczenie niż sjałylacja struktury LOS. G u l a t i i wsp. [23] wykazali, że dodawanie MBL do surowicy osób z niedoborem tego białka, nie powoduje redukcji przeżywalności szczerpów *N. gonorrhoeae*, co było spowodowane inaktywacją proteaz serynowych przez regulatory aktywności białek układu dopełniacza: C1-inhibitor i α_2 -makroglobulinę. Badania te wskazują, że MBL najprawdopodobniej nie odgrywa znaczącej roli w bakteriobójczej aktywności surowicy wobec tych szczerpów. Autorzy ci stwierdzili także, że całkowita sjałylacja LOS znosi wiązanie się MBL oraz składowych C4 i C3b dopełniacza, co nadaje tym bakteriom 100%-ową oporność na surowicę.

Znaczenie MBL w aktywowaniu układu dopełniacza przez szczepy *Staphylococcus aureus* pozostaje nadal nie do końca wyjaśnione. Neth i wsp. [55] obserwowali wzrost depozycji składowych C4 i C3 dopełniacza na powierzchni tych bakterii w obecności MBL, podczas gdy Cunnion i wsp. [9] nie zauważyli wpływu MBL na aktywację dopełniacza przez gronkowce *S. aureus*. Te kontrowersyjne doniesienia najprawdopodobniej wynikają z zastosowania różnych surowic przez autorów. Pierwsi wykorzystali surowicę dorosłych osób z genetycznie uwarunkowanym niedoborem MBL, ale zawierającą immunoglobuliny, podczas gdy drudzy użyli surowicę pacjenta z hypo- γ -globulinemią, z której usunęli MBL.

Ważną biologiczną rolą białka MBL, oprócz aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej jest także jego udział w opsonofagocytozie. Fagocytoza może być pobudzana przez MBL w dwojaki sposób [84]. Białko to stymuluje fagocyty do wychwytywania patogenów poprzez aktywację drogi lektynowej układu dopełniacza oraz opsonizację mikroorganizmów przez składowe C3b oraz iC3b dopełniacza. Białko C3b jest rozpoznawane przez receptor CR1 (CD35), natomiast iC3b przez receptor CR3 obecne na fagocytach. MBL może również działać bezpośrednio jako opsonina wiążąc się do węglowodanów na powierzchni mikroorganizmów, a następnie oddziałując z receptorami MBL na komórkach fagocytujących.

Neth i wsp. [55] dodawali kompleksy MBL/MASP do surowic pacjentów z wrodzonym niedoborem MBL i obserwowali depozycję C3b/iC3b na komórkach *S. aureus*, co było jednocześnie związane ze

znaczącym wzrostem wychwytywania tych bakterii przez neutrofile. Również w przypadku *Saccharomyces cerevisiae* obserwowano zależną od dopełniacza opsonizację komórek tych mikroorganizmów, która ulega zahamowaniu w przy braku MBL w surowicy [80].

Wiele prac opisuje bezpośrednie zaangażowanie MBL w fagocytozę [26, 38, 62, 70]. Stwierdzono, że wiązanie się MBL do bogatego w mannozę LPS szczepu *Salmonella enterica* serowar Montevideo wzmacnia aktywację układu dopełniacza, czego rezultatem jest opsonizacja i zabicie bakterii przez komórki fagocytujące. Uwarunkowane jest to wiązaniem się O-antygeny do MBL oraz aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej [70]. K u h l m a n i i wsp. [38] wykazali, że przyłączenie się MBL do cząsteczek mannozy w O-antygenie LPS komórek tych pałeczek, jest wystarczające do wychwytywania i zabijania ich przez neutrofile i monocyty. Jednakże inni autorzy obserwowali fagocytozę takich szczerpów dopiero po wcześniejszej stymulacji neutrofilii przez fibronektynę [21]. MBL, wiążąc się do receptora CR1 na powierzchni neutrofilii, było zdolne do pobudzenia fagocytozy pałeczek *S. enterica* serowar Montevideo, jeśli bakterie były opłaszczane przez IgG. Podobną sytuację obserwowano w przypadku *Cryptococcus neoformans*, kiedy MBL wzmacniał fagocytozę dopiero po opsonizacji komórek tych mikroorganizmów immunoglobulinami [40]. Dodatkowy czynnik opsonizujący nie zawsze wydaje się być niezbędny do inicjacji fagocytozy przez MBL. Wykazano, że samo MBL wzmacnia wychwytywanie cząsteczek wirusa grypy typu A przez neutrofile [26]. MBL może także zapobiegać indukowanemu przez tego wirusa hamowaniu produkcji nadtlenków i wzmacniać tworzenie H_2O_2 przez neutrofile. Również w przypadku *Mycobacterium avium* zaobserwowano, że samo MBL zwiększa aktywność fagocytarną makrofagów [62]. B o n a r i i wsp. [3] zauważyli, że w obecności MBL *M. bovis* aktywuje dopełniacz, a ponadto wzrasta skuteczność wychwytywania tych bakterii przez neutrofile.

S t r a p a g i e l i i wsp. [78] badali intensywność fagocytozy komórek *Helicobacter pylori* przez ludzkie granulocyty w podłożach zawierających cztery różne surowice ludzkie: nMBL – pełna, nie inaktywowana surowica zawierająca naturalne MBL; (–)MBL – surowica pozbawiona MBL; rMBL – surowica pozbawiona MBL, do której dodano rekombinowanego MBL; nMBL + anty-rMBL – pełna surowica zawierająca naturalne MBL z dodatkiem przeciwciał anty-rMBL. Autorzy obserwowali lepsze pochłanianie komórek *H. pylori* przez ludzkie granulocyty, jeśli podłoże zawierało surowicę (–)MBL lub surowicę nMBL + anty-rMBL, niż w przypadku podłoża z nMBL. W procesie tym najprawdopodobniej zaangażowany był układ dopełniacza. Podczas fagocytozy, w obecności surowicy

nMBL, białko MBL oddziałując z *H. pylori* aktywowało dopełniacz na drodze lektynowej, w wyniku czego powstawały kompleksy MAC. Na skutek zależnej od dopełniacza lizy bakterii, ilość komórek *H. pylori*, która pozostawała w podłożu i mogła ulec fagocytozie była obniżona. Droga lektynowa mogła być także aktywowana w surowicy nMBL i (-)MBL przez fikoliny. *H. pylori* w swoich strukturach powierzchniowych zawiera N-acetyloglukozaminę i mannozę. Fikoliny mają zdolność łączenia się z N-acetyloglukozaminą ale nie z mannozą [73]. Dlatego też w surowicy (-)MBL, możliwe było tworzenie kompleksów MAC, jednak w znacznie mniejszym stopniu. Liza komórek, spowodowana aktywacją dopełniacza, była w tym przypadku słabsza i w podłożu pozostawało więcej bakterii ulegających fagocytozie. Innym wyjaśnieniem obniżenia aktywności fagocytarnej granulocytów wobec *H. pylori* w środowisku zawierającym nMBL, może być intensywne opłaszczanie bakterii przez MBL. W ten sposób białko to może zasłaniać powierzchniowe adhezyny *H. pylori*, ważne dla rozpoznania i pochłonięcia tych mikroorganizmów przez fagocyty. Słaba fagocytoza *H. pylori* w surowicy rMBL potwierdza tę sugestię. Straup i wsp. [78], porównując fagocytozę komórek *H. pylori* oraz stężenie MBL w surowicach otrzymanych od pacjentów zainfekowanych *H. pylori* i zdrowych ochotników nie zaobserwowali istotnych różnic.

MBL wiąże się także z licznymi formami rozwojowymi pierwotniaków występujących we krwi, takimi jak: *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* czy liczne gatunki *Leishmania*. Pasożyty z rodzaju *Leishmania* są wewnątrzkomórkowymi patogenami, infekującymi głównie makrofagi. Dostanie się pierwotniaka do fagocyty wymaga opłaszczenia jego powierzchni składowymi dopełniacza aktywowanymi na drodze lektynowej. Stymuluje to wychwytywanie patogenu dzięki powierzchniowym receptorom dla C3b/iC3b na powierzchni komórek żernych [53]. W określonych warunkach środowiska deficyt tego białka może być korzystny dla makroorganizmu. Hipotezę tą potwierdzają obserwacje występowania korelacji pomiędzy stężeniem MBL w osoczu, a podatnością na leiszmaniozę trzewną [68]. Pacjenci z tą chorobą mieli znacząco podniesiony średni poziom MBL w surowicy i częściej występowały u nich warianty genu *MBL-2* w porównaniu z grupą kontrolną. Peters i wsp. [61] wykazali, że wewnątrzkomórkowe formy amastigota *L. mexicana* wydzielają substancję zwaną proteofosfoglikanem, która jest wiązana przez MBL, co skutkuje aktywacją kaskady białek dopełniacza i uwolnieniem białek stanu zapalnego. Pasożyty używają tego mechanizmu do zwabiania monocytów w miejsce infekcji. MBL wiąże się także z licznymi stadiami rozwojowymi przywry krwi *Schistosoma mansoni* i aktywuje dopełniacz *in vitro* [35]. Autorzy ci nie stwier-

dzili różnic w stężeniu MBL w surowicach osób zdrowych i zarażonych *Schistosoma sp.*

Badania epidemiologiczne wskazują, że ludzie z niedoborami MBL w surowicy, są bardziej podatni na zakażenie wirusem HIV [16], co potwierdzają doświadczenia *in vitro* wykazujące, że MBL wiąże się z glikoproteinami gp120 wirusa HIV-1 i gp110 HIV-2. Obie glikoproteiny zawierają oligosacharydowe łańcuchy posiadające 7, 8 lub 9 cząsteczek mannozy [24, 25]. Połączenie się gp120 z MBL powoduje brak możliwości jego związania z receptorem CD4 na limfocytach T. Konsekwencje wiązania się MBL do HIV nie są do końca ustalone. Być może prowadzi to do neutralizacji wirusa poprzez aktywację dopełniacza albo zwiększa wychwytywanie cząstek wirusa przez komórki fagocytyczne. W zależności od tego, czy fagocyty są zdolne do zabicia wirusa, czy też nie, prowadzi to do zahamowania lub rozwoju infekcji. Ostatnie badania Ying i wsp. [90] wykazują, że MBL może opsonizować wirusa HIV. Choć nie powoduje to jego neutralizacji w przeciętnych stężeniach tego białka w surowicy ludzkiej, zmienia jednak prezentację antygenów wirusowych podczas infekcji HIV. MBL może zmieniać także zdolność wychwytywania wirusa przez komórki dendrytyczne (DC). Komórki DC, wytwarzające powierzchniową lektynę DC-SIGN (*dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin*) zdolną do łączenia się z limfocytami T, powodują infekcję tych komórek wirusem [90]. Preinkubacja HIV z MBL hamuje wychwytywanie wirusa przez komórki DC i infekcję limfocytów T, a tym samym rozprzestrzenianie się HIV w organizmie. Badania epidemiologiczne skupiają się nad znalezieniem odpowiedzi na dwa pytania: czy niedobór MBL podnosi ryzyko zakażenia wirusem HIV, oraz czy istnieje jakaś korelacja pomiędzy przebiegiem infekcji a posiadaniem określonych alleli genu *MBL-2*. Część autorów twierdzi, że niedobory MBL zwiększają nawet ośmiokrotnie ryzyko zakażenia HIV [16, 57, 64] oraz podnoszą ryzyko transmisji wirusa przez łożysko [4]. Są jednak badania, które zaprzeczają roli MBL w tych zakażeniach [48]. Istnieją także niejasności w odniesieniu do roli MBL w przebiegu AIDS. Garré i wsp. [16] zaobserwowali, że pacjenci z wariantami alleli genu *MBL-2*, wykazują znacznie krótszy czas przeżycia od momentu wystąpienia AIDS, niż pacjenci z allelem dzikim. Jednakże badania Maasi i wsp. [42] wskazują, że posiadanie wariantów alleli genu *MBL-2* wydłuża czas rozwoju pełnoobjawowego AIDS, ale potem nie ma znaczącego wpływu na długość życia chorych. Ponadto, posiadanie jednego z wariantów tego genu chroni przed rozwojem mięsaka Kaposiego. Być może obserwowane w badaniach Garré i wsp. [16] szybsze zejścia śmiertelne pacjentów z AIDS były związane z większą podatnością tych osób na zakażenia

oportunistyczne. Potwierdzałyby to także badania pacjentów chorych na AIDS prowadzone przez Kelly i wsp. [33]. Chorzy, którzy byli homozygotami pod względem wariantów alleli genu *MBL-2*, wykazywali podwyższone ryzyko wystąpienia kryptosporidiozy. Autorzy stwierdzili w treści jelita cienkiego obecność białka MBL oraz jego zdolność do wiązania ze sporozoitami *Cryptosporidium parvum* i aktywacji układu dopełniacza. Wykazano również, że obecność reszt kwasu sjałowego w części węglowodanowej gp120 obniża zdolność wiązania się MBL do wirusa. Taka modyfikacja bogatych w mannozę oligosacharydów w może prowadzić do zaburzenia kolektywno-zależnej obrony przeciwwirusowej [24, 25].

Również w przypadku wirusa grypy typu A obserwuje się przyłączanie białka MBL, co powoduje aktywację dopełniacza i prowadzi do lizy komórek zakażonych tym patogenem [65].

4. Znaczenie występowania niedoborów MBL w różnych chorobach

Niedobory MBL były początkowo rozpoznawane jako defekty opsonizacji u dzieci z infekcjami o niewyjaśnionej etiologii oraz zaburzeniami wzrostu i rozwoju [80]. Sugeruje to, że lektyna ta odgrywa główną rolę w nieswoistej odporności przeciwwirusowej między 6–18 miesiącem życia, kiedy nie są jeszcze w pełni wykształcone mechanizmy odporności swoistej.

Stwierdzono, że braki MBL są ważnym czynnikiem ryzyka predysponującym, głównie małe dzieci, do nabycia różnych infekcji, szczególnie chorób układu oddechowego [37]. Wieloletnie obserwacje prowadzone przez Klein [36] grupy hospitalizowanych dzieci, cierpiących na nawracające infekcje, pomogły zidentyfikować pacjentów, wśród których występujące schorzenia były najprawdopodobniej skutkiem niedoborów białka MBL. Typowa historia choroby obejmowała infekcje górnych lub dolnych dróg oddechowych, rozpoczynające się pomiędzy 3 a 6 miesiącem życia, powtarzające się 1–2 razy w miesiącu aż do wykształcenia się swoistej odporności immunologicznej. Czynniki etiologiczne tych chorób często pozostawały nieokreślone. Wielu autorów podkreśla również, że MBL, a tym samym aktywacja dopełniacza na drodze lektynowej, ma ogromne znaczenie w początkowym stadium infekcji jako pierwsza linia obrony organizmu wyższego przed czynnikami zakażenia [31, 84]. Rozważa się istnienie współzależności pomiędzy niskim poziomem MBL w surowicy, a występowaniem określonych chorób.

Carlsson i wsp. [5] określali kliniczne znaczenie białka MBL w mukowiscydozie (CF). Autorzy zaobserwowali, że koncentracja MBL w surowicy chorych była wyższa, niż w grupie zdrowych osób.

Nie znaleziono jednak korelacji pomiędzy niedoborem MBL a spadkiem funkcji płuc u ludzi z CF, określanej na podstawie wartości parametru FEV₁ (ilość powietrza wydmuchiwana w pierwszej sekundzie przy nasilonym wydechu). Poziom FEV₁ u pacjentów z CF był podobny, niezależnie od występujących u nich alleli genu *MBL-2*. U pacjentów określono także zależność między poziomem MBL w surowicy, a częstością zasiedlania ich dróg oddechowych przez określony drobnoustroj. U 50% chorych z normalnym poziomem białka MBL obserwowano kolonizację dróg oddechowych przez pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*. Natomiast w grupie osób z niedoborami MBL taką kolonizację odnotowywano znacznie rzadziej (22%). Najczęściej izolowanym od tych ludzi patogenem był *S. aureus*. Ponieważ *S. aureus*, w przeciwieństwie do *P. aeruginosa* ma zdolność wiązania się z MBL, to u chorych z normalnym poziomem tego białka komórki gronkowca złocistego są eliminowane. Natomiast obniżenie poziomu MBL w surowicy sprzyja kolonizacji tym patogenem.

Badano także, czy niedoborami białka MBL, które bardzo dobrze wiąże się do komórek grzybów *Aspergillus* sp., można tłumaczyć występowanie przewlekłej nekrotyzującej aspergilozy płucnej (CNPA). Wśród pacjentów z CNPA, aż 70% posiadało haplotypy charakterystyczne dla obniżonego poziomu MBL w surowicy. Szczególnie często u tych pacjentów obserwowano mutację w kodonie 52 genu *MBL-2* [8].

Istnieją także pewne doniesienia o niedoborach MBL u pacjentów z zapaleniem wątroby, które wskazują, że kolektywna ta może mieć modulującą rolę w przebiegu tej choroby. Wśród japońskich pacjentów z chronicznym zapaleniem wątroby typu C, słabo odpowiadających na terapię interferonem, z bardzo dużą częstością odnotowywano obecność allelu B genu *MBL-2* w układzie homozygotycznym [51]. Ponadto u pacjentów opornych na terapię interferonem autorzy z większą częstością obserwowali haplotypy LYPB i LXPA [50]. Yuen i wsp. [91] badali poziomy MBL i występowanie mutacji genu *MBL-2* w grupie pacjentów z Chin, którzy cierpieli na chroniczne zapalenie wątroby typu B lub C. Autorzy zaobserwowali, że allel B genu występował z większą częstością u pacjentów z objawową marskością wątroby w przebiegu hepatitis B lub spontanicznym bakteryjnym zapaleniem otrzewnej.

Rozważa się także powiązanie nieprawidłowej aktywacji drogi lektynowej układu dopełniacza z różnymi chorobami nerek. Stwierdzono, że depozycja MBL przyczynia się do niszczenia kłębuszków nerkowych u pacjentów z nefropatią IgA [11], zespołem Schönleina-Henocha [12] oraz popaciorkowcowym zapaleniem kłębuszków nerkowych [60].

Genetycznie uwarunkowane niedobory białka MBL u ludzi mają też znaczenie w występowaniu miażdżycy

tętnic [46] i chorób naczyń wieńcowych [2]. Stwierdzono także silny związek pomiędzy występowaniem określonego genotypu *MBL-2* a zakrzepicą tętnic u chorych na układowy toczeń trzewny (SLE) [59]. Autorzy obserwowali wystąpienie zakrzepicy tętnic u ponad 85% pacjentów posiadających warianty alleli genu *MBL-2* w układzie homozygotycznym. Osoby z allelem dzikim w układzie homo- lub heterozygotycznym bardzo rzadko zapadały na to schorzenie (21,4%). Silna korelacja pomiędzy posiadaniem alleli B, C lub D może być związana z niszczeniem tętnic na skutek cięższego przebiegu SLE. Pacjenci z niskim stężeniem MBL w surowicy są bardziej podatni na infekcje mikroorganizmami np. *Chlamydia pneumoniae*, których obecność sprzyja rozwojowi chorób naczyń [67].

Niski poziom MBL w surowicy, wywołany przez SNPs, może być związany z występowaniem chorób autoimmunologicznych, takich jak np. SLE. Wykazano, że posiadanie alleli B, C lub D genu *MBL-2* zwiększa 1,6 razy ryzyko nabycia SLE [19]. Proponowane są dwa możliwe wyjaśnienia związku pomiędzy niedoborem MBL, a występowaniem SLE. Po pierwsze, MBL ma zdolność wiązania się i inicjacji wychwytywania ciał apoptycznych przez makrofagi. Dlatego też u osób z bardzo niskim poziomem MBL następuje intensywna akumulacja złogów martwych komórek, które stanowią źródło autoantygenów. Badania Seelen i wsp. [71] wykazały, że u pacjentów z toczniem, posiadających allele B, C lub D, znacznie częściej obserwuje się występowanie przeciwciał przeciwko kardiolipinie i składowej C1q, niż u chorych na SLE z allelem dzikim. Obecność tych przeciwciał jest związana z obniżeniem stężenia MBL w surowicy. Po drugie, choć hipoteza ta nie jest jeszcze potwierdzona, przypuszcza się, że pacjenci z toczniem oraz niedoborem MBL, mogą być bardziej narażeni na infekcje mikroorganizmami, prawdopodobnie odgrywającymi rolę w patogenezie SLE [83]. Niezależnie od tego jaka jest patogeneza SLE, niedobór MBL sam w sobie nie jest czynnikiem odpowiedzialnym za wystąpienie tocznia. Większość osób wykazujących niedobory MBL, nie zapada na SLE ani inne choroby autoimmunologiczne. U ludzi tych muszą wystąpić jakieś inne, nie poznane jeszcze do końca, czynniki wywołujące SLE. Związek pomiędzy brakami MBL a toczniem, sugeruje ochronną rolę tej kolektyny w chorobach autoimmunologicznych. Stwierdzono jednak odkładanie się MBL w nerkach pacjentów ze SLE [27], czy w gruczołach ślinowych pacjentów z zespołem Sjögrena [77]. Ponieważ białko MBL może wiązać się z częściami cukrowymi różnych glikoprotein i aktywować dopełniacz na drodze lektynowej, dlatego też prawdopodobnie ma ono znaczenie w niszczeniu tkanek w schorzeniach autoimmunologicznych. Nie zostało do końca wyjaśnione, jaki efekt na obraz kliniczny SLE wywiera MBL

oraz aktywacja drogi lektynowej układu dopełniacza. Wydaje się jednak, że poziom MBL w surowicy jest związany z przebiegiem tej choroby. U pacjentów ze SLE o genotypie A/A, stężenie tego białka w surowicy wahało się podczas trwania choroby, ale obraz tych zmian był różny. U jednych, po rozpoczęciu leczenia immunosupresyjnego, stężenie to obniżało się, podczas gdy u innych podwyższało się. Wytwarzanie MBL wzrasta u chorych podczas ostrego stanu zapalnego, ale jednocześnie depozycja tej lektyny w różnych tkankach, może obniżać jej poziom w surowicy [81].

Zauważono również związek pomiędzy poziomem MBL w surowicy a zapadalnością na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) [47, 72]. Białko MBL wiąże się z cząsteczkami IgG o zmienionej glikozytacji (posiadającymi więcej cząsteczek N-acetyloglukozaminy, a mniej terminalnych reszt galaktozy w łańcuchu Fc), aktywując dopełniacz na drodze lektynowej. Aktywacja dopełniacza u pacjentów z RZS może przyspieszać niszczenie stawów. Ponadto zwiększone ryzyko infekcji z powodu niedoborów MBL może mieć także udział w rozwoju tego schorzenia. Przeprowadzone badania sugerują, że występowanie u pacjentów wariantów alleli genu *MBL-2* ma wpływ zarówno na wczesny początek choroby, jak i ostrzejsze objawy [17, 22, 29]. Jednakże u osób o genotypie A/A, u których choroba rozpoczynała się w późniejszym wieku, obserwowano przewlekły stan zapalny [17]. U chorych z wariantami alleli genu *MBL-2* w układzie homozygotycznym odnotowuje się znacznie szybszą destrukcję stawów [22].

5. Inne funkcje MBL

Liczne doniesienia opisują modyfikowanie odpowiedzi zapalnej przez MBL. Wykazano, że białko to łączy się z ramnozowo-glukozowymi polimerami streptokoków czy błonowymi mannoproteinami *C. neoformans*, aktywując monocyty do fagocytozy, jednakże hamując wydzielanie przez nie czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) [6, 75]. Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku *Candida albicans* [20, 34]. Podobnie wzrost stężenia MBL powodował wzmoczone wydzielanie TNF- α i interleukiny 6 (IL-6) przez monocyty aktywowane formami promastigota *Leishmania chagasi* [68]. Badano także wydzielanie cytokin przez monocyty w odpowiedzi na *N. meningitidis* w zależności od stężenia MBL. Bakterie inkubowano z różnymi stężeniami MBL, a następnie dodawano do pełnej krwi pochodzącej od dawcy z niedoborem tej lektyny [30]. Jeśli stężenie MBL było niższe niż 4 $\mu\text{g/ml}$, obserwowano wzrost produkcji TNF- α , IL-1 β i IL-6, lecz jeśli stężenia MBL były wyższe, wydzielanie tych cytokin było zahamowane. Inhibicja wydzielania prozapalnych cytokin spowodowana była stymulacją przez

MBL produkcji IL-10 [76]. Doniesienia te mogą sugerować, że białko MBL jest zdolne do modyfikowania reakcji zapalnej organizmu, lecz najprawdopodobniej mechanizm jego działania jest odmienny dla różnych organizmów lub całych grup organizmów.

W ostatnich latach opisano silny związek pomiędzy posiadanym genotypem *MBL-2* a rozwojem zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (*systemic inflammatory reaction syndrome* – SIRS) lub sepsy [14, 18]. Zaobserwowano, że posiadanie przez dzieci wariantów genu *MBL-2*, siedmiokrotnie podwyższało ryzyko rozwoju SIRS [14]. Było to niezależne od stanu ogólnego pacjenta, płci, wieku, pochodzenia etnicznego i nie ograniczało się jedynie do dzieci z infekcją. Posiadanie allelu A było związane z 50%-ową redukcją ryzyka rozwoju SIRS. U wszystkich pacjentów z wariantami alleli genu *MBL-2* w układzie homo- lub heterozygotycznym, zarówno w regionie strukturalnym jak i promotorowym, związanymi z niską ekspresją białka MBL, wystąpił SIRS. Ponadto, u dzieci z ogólnoustrojową infekcją obecność wariantów genu *MBL-2* wpływała na zaostrzenie objawów sepsy [14]. U dorosłych pacjentów z SIRS, genetycznie uwarunkowany niski poziom MBL, był związany z rozwojem sepsy, ciężkiej sepsy lub wstrząsu septycznego [18]. Podobnie jak u dzieci, w grupie dorosłych pacjentów posiadanie wariantów alleli genu *MBL-2* wiązało się z ostrzejszym przebiegiem sepsy, a ponadto większym ryzykiem śmierci w wyniku SIRS. Mechanizm działania MBL nie jest do końca ustalony. Niedobory tego białka mogą zmieniać odpowiedź zapalną ustroju gospodarza na mikroorganizmy lub ich produkty, potencjalnie zaostrzając objawy chorobowe, a także wpływać na rozwój SIRS powodowany innymi czynnikami [36].

O g d e n i w s p . [58] wykazali, że MBL może również wiązać się do ciał apoptycznych i inicjować ich wychwytywanie przez makrofagi. W procesie tym zaangażowany jest obecny na powierzchni komórek receptor cC1qR, który wiąże się do regionu kolagenowego MBL. Pomimo braku wewnątrzblonowej domeny, cC1qR współdziała z receptorem CD91 (receptor α_2 -makroglobuliny) makrofagów i w ten sposób inicjuje pochłanianie komórek ulegających apoptozie na drodze makropinocytozy.

6. Podsumowanie

Białko wiążące mannozę (MBL) jest ważną składową wrodzonego systemu odporności. Należy ono do rodziny kolektywnych, które charakteryzują się obecnością regionu kolagenowego i domeny wiążącej węglowodanu. U ludzi białka zaliczane do tej rodziny są kodowane przez grupę genów zlokalizowanych na długim ramieniu chromosomu 10. Niskie stężenia MBL w surowicy

są spowodowane polimorfizmem pojedynczych nukleotydów w egzonie 1 lub mutacjami w regionie promotorowym genu *MBL-2*. Wykazano, że te mutacje mają związek ze zwiększoną podatnością na wiele chorób infekcyjnych. Brak lub bardzo niskie stężenie białka MBL w surowicy wydaje się być czynnikiem ryzyka wystąpienia niektórych schorzeń, w szczególności chorób autoimmunologicznych.

MBL może wiązać się z szerokim spektrum cukrów, takich jak mannoza czy N-acetyloglukozamina i oddziaływać z różnorodnymi bakteriami, wirusami, drożdżami, grzybami i pierwotniakami, na powierzchni których występują te cukry. Białko MBL, związane z mikroorganizmami jest zdolne aktywować system dopełniacza na drodze lektynowej. Może ono także oddziaływać bezpośrednio z receptorami na komórkach żernych i dzięki temu pobudzać opsonofagocytozę na drodze niezależnej od układu dopełniacza. Istnieje wiele doniesień potwierdzających rolę MBL w modyfikowaniu odpowiedzi zapalnej, ale najprawdopodobniej mechanizm działania tej lektyny jest odmienny dla różnych organizmów lub całych grup organizmów.

Piśmiennictwo

1. Aittoniemi J., Miettinen A., Laippala P., Isolauri E., Viikari J., Ruuska T., Soppi E.: Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr.* **85**, 906–909 (1996)
2. Best L.G., Davidson M., North K.E., MacCluer J.W., Zhang Y., Lee E.T., Howard B.V., DeCruo S., Ferrell R.E.: Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes and coronary artery disease in American Indians: the Strong Heart Study. *Circulation*, **109**, 471–475 (2004)
3. Bonar A., Chmiela M., Rudnicka W., Różalska B.: Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria *in vitro*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **53**, 437–441 (2005)
4. Boniotti M., Crovella S., Pirulli D., Scarlatti G., Spano A., Vatta L., Zezlina S., Tovo P.A., Palomba E., Amoroso A.: Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *Genes Immun.* **1**, 346–348 (2000)
5. Carlsson M., Sjöholm A.G., Eriksson L., Thiel S., Jensenius J.C., Segelmark M., Truedsson L.: Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. *Clin. Exp. Immunol.* **139**, 306–313 (2004)
6. Chaka W., Verheul A.F.M., Vaishnav V.V., Cherniak R., Scharringa J., Verhof J., Snippe H., Hoepelman A.I.M.: Induction of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells by the mannoprotein of *Cryptococcus neoformans* involves human mannose binding protein. *J. Immunol.* **6**, 2979–2985 (1997)
7. Chen C.B., Wallis R.: Stoichiometry of complexes between mannose-binding protein and its associated serine proteases: defining functional units for complement activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 25894–25902 (2001)
8. Crosdale D.J., Poulton K.V., Ollier W.E., Thomson W., Denning D.W.: Mannose-binding lectin gene polymorphisms as

- a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **184**, 653–656 (2001)
9. Cunnion K.M., Lee J.C., Frank M.M.: Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**, 6796–6803 (2001)
 10. Dahl M.R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A.C., Christensen T., Vorup-Jensen T., Jensenius J.C.: MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, **15**, 127–135 (2001)
 11. Endo M., Ohi H., Ohsawa I., Fujita T., Matsushita M., Fujita T.: Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial. Transplant.* **13**, 1984–1990 (1998)
 12. Endo M., Ohi H., Ohsawa I., Fujita T., Matsushita M.: Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* **35**, 401–407 (2000)
 13. Endo Y., Takahashi M., Fujita T.: Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, **211**, 283–293 (2006)
 14. Fidler K.J., Wilson P., Davies J.C., Turner M.W., Peters M.J., Klein N.J.: Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. *Intensive Care Med.* **30**, 1438–1445 (2004)
 15. Fujita T., Matsushita M., Endo Y.: The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* **198**, 185–202 (2004)
 16. Garred P., Madsen H.O., Balslev U., Hofmann B., Pedersen C., Gerstoft J., Svejgaard A.: Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet*, **349**, 236–240 (1997)
 17. Garred P., Madsen H.O., Marquart H., Hansen T.M., Sorensen S.V., Petersen J., Volck B., Svejgaard A., Graudal N.A., Rudd P.M., Dwek R.A., Sim R.B., Andersen V.: Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J. Rheumatol.* **27**, 26–34 (2000)
 18. Garred P., Stårm J.J., Quist L., Taaning E., Madsen H.O.: Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J. Infect. Dis.* **188**, 1394–1403 (2003)
 19. Garred P., Voss A., Madsen H.O., Junker P.: Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun.* **2**, 442–450 (2001)
 20. Ghezzi M.C., Raponi G., Angeletti S., Mancini C.: Serum-mediated enhancement of TNF-alpha release by human monocytes stimulated with the yeast form of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* **178**, 1743–1749 (1998)
 21. Ghiran I., Barbashov S.F., Klickstein L.B., Tas S.W., Jensenius J.C., Nicholson-Weller A.: Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J. Exp. Med.* **192**, 1797–1807 (2000)
 22. Graudal N.A., Madsen H.O., Tarp U., Svejgaard A., Jurik G., Graudal H.K.: The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 515–521 (2000)
 23. Gulati S., Sastry K., Jensenius J.C., Rice P.A., Ram S.: Regulation of the mannan-binding lectin pathway of complement on *Neisseria gonorrhoeae* by C1-inhibitor and α_2 -macroglobulin. *J. Immunol.* **168**, 4078–4086 (2002)
 24. Hart M.L., Saifuddin M., Spear G.T.: Glycosylation inhibitors and neuraminidase enhance human immunodeficiency virus type 1 binding and neutralization by mannose-binding lectin. *J. Gen. Virol.* **84**, 353–360 (2003)
 25. Hart M.L., Saifuddin M., Uemura K., Bremer E.G., Hooker B., Kawasaki T., Spear G.T.: High mannose glycans and sialic acid on gp120 regulate binding of mannose-binding lectin (MBL) to HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **18**, 1311–1317 (2002)
 26. Hartshorn K.L., Sastry K., White M.R., Anders E.M., Super M., Ezekowitz R.A., Tauber A.I.: Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J. Clin. Invest.* **91**, 1414–1420 (1993)
 27. Hisano S., Matsushita M., Fujita T., Endo Y., Takebayashi S.: Mesangial IgA2 deposits and lectin pathway-mediated complement activation in IgA glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, 1082–1088 (2001)
 28. Holmskov U., Malhotra R., Sim R.B., Jensenius J.C.: Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today*, **15**, 67–74 (1994)
 29. Ip W.K., Lau Y.-L., Chan S.Y., Mok C.C., Chan D., Tong K.K., Lau C.S.: Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. *Arthritis Rheum.* **43**, 1679–1687 (2000)
 30. Jack D.L., Read R.C., Tenner A.J., Frosch M., Turner M.W., Klein N.J.: Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Infect. Dis.* **184**, 1152–1162 (2001)
 31. Jack D.L., Turner M.W.: Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 753–757 (2003)
 32. Kakkanaiah V.N., Shen G.Q., Ojo-Amaize E.A., Peter J.B.: Association of low concentrations of serum mannose-binding protein with recurrent infections in adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 319–321 (1998)
 33. Kelly P., Jack D.L., Naem A., Mandanda B., Pollok R.C., Klein N.J., Turner M.W., Farthing M.J.: Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology*, **119**, 1236–1242 (2000)
 34. Kitz D.J., Stahl P.D., Little J.R.: The effect of a mannose binding protein on macrophage interactions with *Candida albicans*. *Cell. Mol. Biol.* **38**, 407–412 (1992)
 35. Klabunde J., Berger J., Jensenius J.C., Klinkert M.Q., Zelck U.E., Kremsner P.G., Kun J.F.: *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Exp. Parasitol.* **95**, 231–239 (2000)
 36. Klein N.J.: Mannose-binding lectin: do we need it? *Mol. Immunol.* **42**, 919–924 (2005)
 37. Koch A., Melbye M., Sorensen P., Homoe P., Madsen H.O., Molbak K., Hansen C.H., Andersen L.H., Hahn G.W., Garred P.: Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA*, **285**, 1316–1321 (2001)
 38. Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R.A.: The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J. Exp. Med.* **169**, 1733–1745 (1989)
 39. Kuipers S., Aerts P.C., van Dijk H.: Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **36**, 33–39 (2003)
 40. Levitz S.M., Tabuni A., Treseler C.: Effect of mannose-binding protein on binding of *Cryptococcus neoformans* to human phagocytes. *Infect. Immun.* **61**, 4891–4893 (1993)
 41. Lipscombe R.J., Sumiya M., Hill A.V., Lau Y.L., Levinsky R.J., Summerfield J.A., Turner M.W.: High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 709–715 (1992)

42. Maas J., de Roda Husman A.M., Brouwer M., Krol A., Coutinho R., Keet I., van Leeuwen R., Schuitemaker H.: Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. *AIDS*, **12**, 2275–2280 (1998)
43. Madsen H.O., Garred P., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Thiel S., Svejgaard A.: A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*, **40**, 37–44 (1994)
44. Madsen H.O., Garred P., Thiel S., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Svejgaard A.: Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J. Immunol.* **155**, 3013–3020 (1995)
45. Madsen H.O., Satz M.L., Hogh B., Svejgaard A., Garred P.: Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol.* **161**, 3169–3175 (1998)
46. Madsen H.O., Videm V., Svejgaard A., Svennevig J.L., Garred P.: Association of mannose-binding lectin deficiency with severe atherosclerosis. *Lancet*, **352**, 959–960 (1998)
47. Malhotra R., Wormald M.R., Rudd P.M., Fischer P.B., Dwek R.A., Sim R.B.: Glycosylation changes of Ig associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Med.* **1**, 237–243 (1995)
48. Malik S., Arias M., Di Flumeri C., Garcia L.F., Schurr E.: Absence of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. *Immunogenetics*, **55**, 49–52 (2003)
49. Matsushita M., Fujita T.: Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.* **180**, 78–85 (2001)
50. Matsushita M., Hijikata M., Matsushita M., Ohta Y., Mishiro S.: Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPA and LYPB with interferon resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. *J. Hepatol.* **29**, 695–700 (1998a)
51. Matsushita M., Hijikata M., Ohta Y., Iwata K., Matsumoto M., Nakao K., Kanai K., Yoshida N., Baba K., Mishiro S.: Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene *MBL*. *Arch. Virol.* **143**, 645–651 (1998b)
52. Mielnik G., Doroszkiewicz W., Korzeniowska-Kowal A.: Struktury zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych a bakteriobójcza aktywność dopełniacza. *Post. Mikrobiol.* **43**, 39–46 (2004)
53. Mosser D.M., Springer T.A., Diamond M.S.: *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.* **116**, 511–520 (1992)
54. Neth O., Jack D.L., Dodds A.W., Holzel H., Klein N.J., Turner M.W.: Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect. Immun.* **68**, 688–693 (2000)
55. Neth O., Jack D.L., Johnson M., Klein N.J., Turner M.W.: Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **169**, 4430–4436 (2002)
56. Ng K.K., Park-Snyder S., Weis W.I.: Ca²⁺-dependent structural changes in C-type mannose-binding proteins. *Biochemistry*, **37**, 17965–17976 (1998)
57. Nielsen S.L., Andersen P.L., Koch C., Jensenius J.C., Thiel S.: The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin. Exp. Immunol.* **100**, 219–222 (1995)
58. Ogden C.A., deCathelineau A., Hoffmann P.R., Bratton D., Ghebrehiwet B., Fadok V.A., Henson P.M.: C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 781–795 (2001)
59. Ohlenschlaeger T., Garred P., Madsen H.O., Jacobsen S.: Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **351**, 260–267 (2004)
60. Ohsawa I., Ohi H., Endo M., Fujita T., Matsushita M., Fujita T.: Evidence of lectin complement pathway activation in poststreptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int.* **56**, 1158–1160 (1999)
61. Peters C., Kawakami M., Kaul M., Ilg T., Overath P., Aebischer T.: Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannose binding lectin pathway. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2666–2672 (1997)
62. Polotsky V.Y., Belisle J.T., Mikusova K., Ezekowitz R.A.B., Joiner K.A.: Interaction of human mannose-binding protein with *Mycobacterium avium*. *J. Infect. Dis.* **175**, 1159–1168 (1997)
63. Presanis J.S., Kojima M., Sim R.B.: Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 748–752 (2003)
64. Prohaszka Z., Thiel S., Ujhelyi E., Szlavik J., Banhegyi D., Fust G.: Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of disease. *Immunol. Lett.* **58**, 171–175 (1997)
65. Reading P.C., Hartley C.A., Ezekowitz R.A.B., Anders E.M.: A serum mannose-binding lectin mediates complement-dependent lysis of influenza virus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1128–1136 (1995)
66. Ross S.C., Densen P.: Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine*, **63**, 243–273 (1984)
67. Rugonfalvi-Kiss S., Endresz V., Madsen H.O., Burian K., Duba J., Prohaszka Z., Karadi I., Romics L., Gonczol E., Fust G., Garred P.: Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation*, **106**, 1071–1076 (2002)
68. Santos I.K., Costa C.H., Krieger H., Feitosa M.F., Zurakowski D., Fardin B., Gomes R.B., Weiner D.L., Harn D.A., Ezekowitz R.A., Epstein J.E.: Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* **69**, 5212–5215 (2001)
69. Sastry K., Herman G.A., Day L., Deignan E., Bruns G., Morton C.C., Ezekowitz R.A.: The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J. Exp. Med.* **170**, 1175–1189 (1989)
70. Schweinle J.E., Ezekowitz R.A.B., Tenner A.J., Kuhlman M., Joiner K.A.: Human mannose-binding protein activates the alternative complement pathway and enhances serum bactericidal activity on a mannose-rich isolate of *Salmonella*. *J. Clin. Invest.* **84**, 1821–1829 (1989)
71. Seelen M.A., van der Bijl E.A., Trouw L.A., Zuiverloon T.C., Munoz J.R., Fallaux-van den Houten F.C., Schlagwein N., Daha M.R., Huizinga T.W.J., Roos A.: A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol.* **44**, 111–119 (2005)
72. Seelen M.A.J., Roos A., Daha M.R.: Role of complement in innate and autoimmunity. *J. Nephrol.* **18**, 642–653 (2005)

73. Sim R.B., Tsiftoglou S.A.: Proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 21–27 (2004)
74. Sochocka M., Błach-Olszewska Z.: Mechanizmy wrodzonej odporności. *Post. Hig. Med. Dośw.* **59**, 250–258 (2005)
75. Soell M., Lett E., Holveck F., Scholler M., Wachsmann D., Klein J.P.: Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF-alpha release. *J. Immunol.* **154**, 851–860 (1995)
76. Sprong T., Jack D.L., Klein N.J., Turner M.W., van der Ley P., Steeghs L., Jakobs L., van der Meer J.W.M., van Deuren M.: Mannose binding lectin enhances IL-1b and IL-10 induction by nonlipopolysaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. *Cytokine*, **28**, 59–66 (2004)
77. Steinfeld S., Penalzoza A., Ribai P., Decaestecker C., Danguy A., Gabius H.J., Salmon I., Appelboom T., Kiss R.: D-mannose and N-acetylglucosamine moieties and their respective binding sites in salivary glands of Sjogren's syndrome. *J. Rheumatol.* **26**, 833–841 (1999)
78. Strapagiel D., Grębowska A., Różalska B., Bąk-Romaniszyn L., Czkwianianc E., Płaneta-Małecka I., Rechciński T., Rudnicka W., Chmiela M.: Natural mannose-binding lectin (MBL) down-regulates phagocytosis of *Helicobacter pylori*. *Pol. J. Microbiol.* **55**, 95–101 (2006)
79. Sumiya M., Super M., Tabona P., Levinsky R.J., Arai T., Turner M.W., Summerfield J.A.: Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet*, **337**, 1569–1570 (1991)
80. Super M., Thiel S., Lu J., Levinsky R.J., Turner M.W.: Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*, **ii**, 1236–1239 (1989)
81. Takahashi R., Tsutsumi A., Ohtani K., Muraki Y., Goto D., Matsumoto I., Wakamiya N., Sumida T.: Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 311–314 (2005)
82. Townsend R., Read R.C., Turner M.W., Klein N.J., Jack D.L.: Differential recognition of obligate anaerobic bacteria by human mannose-binding lectin. *Clin. Exp. Immunol.* **124**, 223–228 (2001)
83. Tsutsumi A., Takahashi R., Sumida T.: Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **4**, 364–372 (2005)
84. Turner M.W.: The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol.* **40**, 423–429 (2003)
85. Turner M.W., Hamvas R.M.J.: Mannose-binding lectin; structure, function, genetics and disease associations. *Rev. Immunogenet.* **2**, 305–322 (2000)
86. van de Wetering J.K., Van Golde L.M.G., Batenburg J.J.: Collectins: players of the innate immune system. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1229–1249 (2004)
87. van Emmerik L.C., Kuijper E.J., Fijen C.A.P., Dankert J., Thiel S.: Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 411–416 (1994)
88. Wagner S., Lynch N.J., Walter W., Schwaebler W.J., Loos M.: Differential expression of the murine mannose-binding lectins A and C in lymphoid and nonlymphoid organs and tissues. *J. Immunol.* **170**, 1462–1465 (2003)
89. Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A.: Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature*, **360**, 127–134 (1992)
90. Ying H., Ji X., Hart M.L., Gupta K., Saifuddin M., Zariffard M.R., Spear G.T.: Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **20**, 327–335
91. Yuen M.-F., Lau C.S., Lau Y.-L., Wong W.-M., Cheng C.-C., Lai C.-L.: Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. *Hepatology*, **29**, 1248–1251 (1999)

Marcin Zmudziński, Eugenia Gospodarek

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel. (052) 585 34 81, 585 44 80, e-mail: kiemikrob@cm.umk.pl

Wpłynęło w czerwcu 2005 r.

1. Wprowadzenie. 2. Antybiotyki aktywne wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. 3. Antybiotykoterapia złożona w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. 4. β -laktamazy pałeczek *Acinetobacter* spp. 4.1. Klasa A β -laktamaz. 4.2. Klasa B β -laktamaz. 4.3. Klasa C β -laktamaz. 4.4. Klasa D β -laktamaz. 5. Zmiana białek wiążących penicyliny. 6. Zmiana przepuszczalności osłon komórkowych. 7. Wpływ („efflux”) antybiotyków z wnętrza komórki. 8. Podsumowanie

Mechanisms of resistance to β -lactams in *Acinetobacter* spp.

Abstract: *Acinetobacter* spp. has emerged as a serious nosocomial pathogen in many countries mainly due to its resistance to β -lactams, which are the most frequently used antibiotics. These bacteria appears to have a propensity for developing antibiotic resistance extremely fast. Many mechanisms of resistance to β -lactams have been identified in this species.

Acinetobacter spp. is responsible for the production of all classes of β -lactamases. The most important β -lactamases are cephalosporinases, which are C class β -lactamases, A class β -lactamases, OXA enzymes, which are D class β -lactamases and B class β -lactamases also known as metallo- β -lactamases. ESBL, related to the narrow spectrum TEM and SHV type β -lactamases, have not yet been detected in *Acinetobacter* spp. The only type of ESBL identified in this agent were non-TEM and non-SHV type ESBL: PER, VEB and CTX-M. *Acinetobacter* spp. all produce OXA-type β -lactamases that hydrolyze carbapenems OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-51 and OXA-58, which have already been identified and described.

Other mechanisms include alteration of PBPs and the reduction of penetration rate across the outer membrane. Combination of these two mechanisms with the production of OXA-type β -lactamases or with class C cephalosporinases can lead to resistance to carbapenems. The reduced expression of PBPs or loss of some outer membrane proteins are related to the increased MIC of carbapenems. Efflux pump system does not appear to influence the resistance to β -lactams. The most active agents against *Acinetobacter* spp. in this group are imipenem, meropenem, ampicillin or cefaperazon with sulbactam and colistin. Combination therapy can be effective in patients with severe infections caused by multidrug resistant strains of *Acinetobacter* spp.

1. Introduction. 2. The most active agents against *Acinetobacter* spp. 3. Combination therapy in treating infections caused by *Acinetobacter* spp. 4. β -lactamases in *Acinetobacter* spp. 4.1. Class A β -lactamases. 4.2. Class B β -lactamases. 4.3. Class C β -lactamases. 4.4. Class D β -lactamases. 5. Alterations of penicillin-binding proteins. 6. Efflux pump system. 7. Loss of outer membrane proteins. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Acinetobacter*, β -laktamowe antybiotyki, β -laktamazy, PBP

Key words: *Acinetobacter*, β -lactam antibiotics, β -lactamases, PBP

1. Wprowadzenie

W ostatnim trzdziestoleciu zaobserwowano znaczny wzrost udziału pałeczek *Acinetobacter* spp. w zakażeniach szpitalnych. Związane jest to ze spadkiem odporności populacji ludzkiej oraz wzrostem oporności tych bakterii na antybiotyki [6, 18, 30, 63], co wynika z szerokiego stosowania antybiotyków zwykle w sposób niekontrolowany w prewencji i leczeniu zakażeń, jak również z rozwoju medycyny, wykorzystującej coraz częściej inwazyjne metody diagnostyczne i lecznicze. Wzrost znaczenia pałeczek *Acinetobacter* spp. w zakażeniach szpitalnych ma związek z szybką zdolnością tych bakterii do wytwarzania oporności pod wpływem presji antybiotykowej. Zdolność tą uzyskały na drodze ewolucji w środowisku naturalnym w wyniku współzawodnictwa z innymi gatunkami bakterii, wytwarzającymi różne substancje

przeciwdrobnoustojowe. Pałeczki *Acinetobacter* spp. mają także możliwość przeżycia w różnorodnych środowiskach, często ubogich w związki odżywcze wykazując stosunkowo małą wrażliwość na niekorzystne warunki fizyko-chemiczne [29].

Bakterie najczęściej nabywają oporność na antybiotyki w wyniku mutacji w genach chromosomalnych lub plazmidowych oraz przekazywania genów warunkujących oporność. Przekazywanie to może przebiegać zarówno poziomo jak i pionowo. Po pojawieniu się mutacji dochodzi do selekcji szczepów posiadających nowe czynniki oporności. Ostatni mechanizm ma największy wpływ na rozprzestrzenienie się bakterii wykazujących lekooporność. U pałeczek *Acinetobacter* spp. opisano wszystkie znane sposoby przekazywania genów oporności na antybiotyki, jednak najważniejszym sposobem ich przekazywania między szczepami tego rodzaju prawdopodobnie jest koniugacja [6].

Uważa się, że potencjał antybiotykooporności istniał od dawna. Jest on obecny wśród szczepów dziko żyjących, ulega ekspresji i licznym modyfikacjom w warunkach selektywnej presji wywołanej przez stosowane środki przeciwbakteryjne [6]. Taka presja spotęgowana jest niewątpliwie w środowisku szpitalnym. Sprzyja to promocji gatunków wykazujących łatwość nabywania nowych mechanizmów oporności, czyli szybko przystosowujących się do zmieniających się warunków. Do takich bakterii należą niewątpliwie pałeczki *Acinetobacter* spp.

Antybiotykami najpowszechniej stosowanymi w praktyce klinicznej, do leczenia zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. i jednocześnie wywołującymi najmniej objawów ubocznych, są β -laktamy. Oporność na te antybiotyki wśród szczepów *Acinetobacter* spp. związana jest z czterema mechanizmami:

- wytwarzaniem β -laktamaz,
- zmianami w białkach wiążących penicyliny (penicillin binding proteins, PBP),
- zmianą przepuszczalności osłon komórkowych poprzez wytwarzanie zmniejszonej liczby białek porynowych (outer membrane proteins, OMP), oraz
- wypływem („efflux”) antybiotyków z wnętrza komórki.

Najważniejszym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek *Acinetobacter* spp. jest wytwarzanie β -laktamaz [6]. Geny warunkujące wytwarzanie tych enzymów mogą być kodowane na plazmidach (enzymy IMP, VIM) lub chromosomach (enzymy OXA). Zmiany w PBP i zmiana przepuszczalności osłon komórkowych kodowana jest przez geny zlokalizowane na chromosomie [63].

2. Antybiotyki aktywne wobec pałeczek *Acinetobacter* spp.

Najczęściej izolowanym i wykazującym największą oporność na antybiotyki spośród gatunków pałeczek *Acinetobacter* spp. jest *Acinetobacter baumannii*. Pozostałe gatunki, do których zalicza się, *A. haemolyticus*, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. radioresistens* i inne opisane dotychczas grupy DNA, wykazują większą wrażliwość na stosowane w leczeniu antybiotyki [34, 67]. Jest ona zróżnicowana zależnie od pochodzenia szczepów, tj. kraju, z którego dany szczep został wyizolowany, ośrodka leczniczego, a nawet oddziału tego samego szpitala. Te różnice są odbiciem sytuacji epidemiologicznej i polityki antybiotykowej prowadzonej w danym ośrodku [6, 29]. Houan g i wsp. [34] wykazali znaczące różnice w wrażliwości na antybiotyki wśród szczepów pałeczek należących do kompleksu *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*, izolo-

wanych z tych samych oddziałów szpitalnych, a nawet od pacjentów, czy personelu jednego oddziału.

Według badań przeprowadzonych przez V i s a l l i i wsp. [67], dotyczących oporności *Acinetobacter* spp. na antybiotyki β -laktamowe, najwyższą aktywność wobec tych pałeczek wykazuje imipenem (99,2% wrażliwych szczepów). Badali oni także skuteczność połączeń penicylin z inhibitorami β -laktamaz. Najskuteczniejszym połączeniem okazała się ampicylina z sulbactamem (86,9%). Nieco mniejszą skuteczność stwierdzono dla połączenia tikarcyliny z kwasem klawulanowym i piperacyliny z tazobaktamem, odpowiednio u 85,7% i 84,8% szczepów badanych. Zdecydowanie najmniejszą aktywność, wynoszącą 54,4%, stwierdzono dla amoksycyliny z kwasem klawulanowym. Wysoką skuteczność wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazują połączenia sulbaktamu nie tylko z ampicyliną, ale także z cefaperazonem [38, 69]. Sulbaktam hamuje katalityczne działanie enzymów β -laktamowych wiążąc się nieodwracalnie z ich miejscem aktywnym [38]. W porównaniu do tazobaktamu i kwasu klawulanowego, wykazuje on największą aktywność w stosunku do *Acinetobacter* spp. [38, 52]. Sulbaktam oprócz wpływu inhibicyjnego w stosunku do β -laktamaz, posiada również aktywność przeciw tym pałeczkom po związaniu się z białkiem PBP2.

Badania nad opornością pałeczek *Acinetobacter* spp. przeprowadzono również w Polsce [29, 30]. Wyniki wskazują, że najbardziej aktywnymi antybiotykami wobec szczepów izolowanych z polskich szpitali są imipenem, nitroksolina, netilmicyna i ampicylina z sulbactamem.

Antybiotykem ostatniej szansy w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych szczepami rodzaju *Acinetobacter* wykazującymi oporność na β -laktamy, w tym na karbapenemy, jest kolistyna. Ma ona jednak toksyczne działanie na organizm człowieka i nie daje możliwości stosowania terapii sekwencyjnej, ponieważ musi być podawana paraenteralnie [37, 46, 58].

3. Antybiotykoterapia złożona w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp.

Ostatnie doniesienia sugerują dużą skuteczność antybiotykoterapii złożonej [6, 25, 43]. Znaczący udział mają w niej antybiotyki β -laktamowe. Takie leczenie zmniejsza ryzyko wytwarzania oporności, tak jak ma to miejsce w monoterapii, zmniejsza toksyczność stosowanych antybiotyków oraz podnosi skuteczność leczenia antybakteryjnego. Ma to istotne znaczenie wobec faktu szybkiego wytwarzania przez szczepy pałeczek *Acinetobacter* spp. nowych mechanizmów oporności na antybiotyki.

β -laktamy, z uwagi na ich mechanizm działania, stosuje się w skojarzeniu z wieloma antybiotykami nie β -laktamowymi. Opisano skuteczność połączeń antybiotyków β -laktamowych z między innymi aminoglikozydami, fluorochinolonami [6, 25, 45]. Stwierdzono zwiększoną aktywność lewofloksacyliny i ciprofloksacyliny w połączeniu z cefalosporynami III i IV generacji takimi, jak ceftazidim i cefepim, a także wymienionych fluorochinolonów z piperacyliną z tazobaktamem oraz imipenemem [25]. Opisano również synergizm między połączeniami β -laktamów (imipenemu, ampicyliny z sulbaktamem i tikarcyliny z kwasem klawulanowym) z aminoglikozydami (tobramycyną i amikacyną) [43]. W stosowaniu antybiotykoterapii złożonej wobec zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. rekomendowanymi przez większość badaczy antybiotykami są penicyliny i cefaloporyny o szerokim zakresie działania, a także karbapenemy w skojarzeniu głównie z aminoglikozydami i fluorochinolonami. Terapia złożona wydaje się być postępowaniem z wyboru w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy *Acinetobacter* spp.

4. β -laktamazy pałeczek *Acinetobacter* spp.

U pałeczek *Acinetobacter* spp. opisano β -laktamazy o zróżnicowanym zakresie działania, występowaniu i oporności na inhibitory β -laktamaz. Wszystkie powodują hydrolizę wiązania amidowego w pierścieniu β -laktamowym [31]. Podobne enzymy są identyfikowane wśród innych Gram-ujemnych pałeczek, np. *Pseudomonas* spp. Nasuwa to przypuszczenie, co do ich wspólnego pochodzenia. β -laktamazy pałeczek *Acinetobacter* spp. należą generalnie do enzymów wytwarzanych konstytutywnie. Rzadziej są to enzymy indukowane. Wiąże się to z możliwością natychmiastowej reakcji na obecność antybiotyku w środowisku i jego szybką inaktywacją.

Obecnie najczęściej używane są dwie klasyfikacje β -laktamaz: wg Bush i Amblera [4, 14, 16]. Klasyfikacja Bush to podział funkcjonalny uwzględniający hydrolityczne właściwości różnych enzymów w stosunku do β -laktamów. Natomiast klasyfikacja Amblera jest podziałem strukturalnym, opierającym się na sekwencjach aminokwasowych enzymów hydrolizujących β -laktamy. Oba systemy klasyfikacji w dużej mierze pokrywają się. Podział β -laktamaz wytwarzanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. w niniejszej pracy został oparty na klasyfikacji Amblera.

4.1. Klasa A β -laktamaz

Do klasy A β -laktamaz wg Amblera zalicza się enzymy zwane β -laktamazami o szerokim zakresie działania (broad spectrum β -lactamases), np. SHV,

TEM. Występują one powszechnie wśród pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* i to z nich najczęściej powstają β -laktamazy o rozszerzonym zakresie działania (extended spectrum β -lactamases, ESBL) [11, 28, 61]. U pałeczek *Acinetobacter* spp. dotychczas nie opisano tego typu enzymów. Wykryto jednak ESBL inne niż TEM i SHV, zaliczane do PER, VEB, a w ostatnim czasie CTX-M [11, 48, 61]. Są to jedyne β -laktamazy typu ESBL opisane dotychczas u rodzaju *Acinetobacter*.

PER-1 to β -laktamaza typu ESBL kodowana plazmidowo. Gen odpowiedzialny za syntezę tego enzymu zidentyfikowano również na chromosomie [64, 70]. PER-1 hydrolizuje penicyliny i cefalosporyny, w tym także IV generacji. Pierwotnie enzym ten opisano u *Pseudomonas aeruginosa* we Francji, a następnie także wśród szczepów *A. baumannii* w Turcji i we Włoszech [11, 64]. Do niedawna uważano, że występuje on jedynie u pałeczek *Acinetobacter* spp. izolowanych w Europie. W 2003 roku opisano jednak w Korei szczepy posiadające gen *bla*_{PER-1}, a odsetek ich występowania oceniono na 54,6% [70]. Dla porównania w Turcji odsetek ten był również bardzo wysoki i wynosił 46% [64]. Sugeruje to powszechne występowanie wśród pałeczek rodzaju *Acinetobacter* tego enzymu także w innych częściach świata.

Szczepy posiadające gen *bla*_{PER-1} należą do różnych klonów pałeczek *Acinetobacter* spp., jednak nie wyklucza to jednocześnie klonalnego rozprzestrzeniania się bakterii posiadających ten mechanizm oporności. Gen ten wykazuje zdolność do wbudowywania się w różne struktury genomu. Jego ekspresja fenotypowa wymaga odpowiedniej sekwencji promotorowej, która nie występuje u pałeczek *Escherichia coli*. Konjugacja tego genu do pałeczek *E. coli* nie spowoduje więc wytworzenia oporności na cefalosporyny IV generacji, które nie są generalnie objęte zakresem działania ESBL typu TEM i SHV.

Wytwarzanie β -laktamazy PER-1, oprócz oporności na cefalosporyny powoduje także brak skuteczności połączeń β -laktamów z sulbaktamem [64]. Dotyczy to nie tylko kombinacji sulbaktamu z ampicyliną, ale także jego połączenia z cefoperazonem, wprowadzonego ostatnio na rynek polski.

W 2003 roku Poirer i wsp. [56] opisali we Francji β -laktamazę VEB-1, kolejny enzym typu ESBL u pałeczek *Acinetobacter* spp. Jest on kodowany na integronie wbudowywanym w strukturę chromosomu bakteryjnego. Wcześniej wykazywano go u pałeczek *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* spp. w południowo-wschodniej Azji [27]. *Acinetobacter* spp. jest pierwszą Gram-ujemną pałeczką izolowaną w Europie wytwarzającą ten enzym poza południowo-wschodnią Azją [56]. Sekwencja genowa integronu zawierającego gen *bla*_{VEB-1} u pałeczek *Acinetobacter* spp. jest identyczna, jak analogicznych integronów, występujących

u innych gatunków. Świadczy to o horyzontalnym przekazywaniu tego mechanizmu oporności.

W 2004 roku [48] u trzech pacjentów oddziału neurochirurgicznego opisano szczepy pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazujące oporność na cefotaksym, ceftriakson, cefepidoksym, aztreonam, ale były one wrażliwe na ceftazidim i imipenem. Bakterie te wytwarzały β -laktamazę o rozszerzonym spektrum wrażliwą na kwas klawulanowy sklasyfikowaną jako CTX-M-2. Gen *bla*_{CTX-M-2} kodujący ten enzym zlokalizowany jest na plazmidzie, który występuje także u innych bakterii, np. u *Proteus mirabilis*. Jego ekspresja fenotypowa ma charakter indukcyjny.

Wytwarzanie enzymów ESBL u pałeczek *Acinetobacter* spp. wiąże się ze wzrostem MIC cefalosporyn (w tym również IV generacji). Wiąże się to z trudnościami w wykrywaniu β -laktamaz typu ESBL za pomocą powszechnie stosowanego w diagnostyce mikrobiologicznej testu dwóch krążków. Użycie ceftazidimu, cefotaksymu i aztreonamu w odległości 10 mm od środka krążka z inhibitorem β -laktamaz pozwala na wykrycie tylko części szczepów posiadających gen *bla*_{PER-1}. Dopiero użycie cefepimu i zmniejszenie odległości między krążkami do 5 mm zwiększa znacznie czułość testu. Dowodzą tego badania przeprowadzone przez Yon g i wsp. [70]. W pierwszym etapie doświadczeń, za pomocą testu dwóch krążków wykryto 17 z 53 szczepów z genem *bla*_{PER-1}. W drugim etapie, po wprowadzeniu opisanej modyfikacji, liczba wykrytych szczepów wzrosła do 52 z 53. Wadą opisanej metody są jednak, według autorów, niewielkie rozmiary stref zahamowania wzrostu, co utrudnia interpretację wyników. Może być to przyczyną zaniżenia wykrywalności enzymów typu ESBL u pałeczek *Acinetobacter* spp. Poirel i wsp. [56] uważają, że wiarygodność testu dwóch krążków w wykrywaniu ESBL u tych pałeczek można zwiększyć przez dodanie do podłoża kloksacyliny, która jest inhibitorem cefalosporynaz, wytwarzanych często jednocześnie z ESBL. Metoda ta, zdaniem autorów, powinna być stosowana powszechnie w diagnostyce mikrobiologicznej.

Enzymami należącymi do klasy A β -laktamaz, opisanymi u pałeczek *Acinetobacter* spp., które nie należą do ESBL, są CARB-5, TEM-1, TEM-2 oraz β -laktamazy podobne do SHV [6, 23, 53, 65]. Są to najczęściej, obok cefalosporynaz, występujące β -laktamazy u tych bakterii. CARB-5 (pI 6,3) kodowana jest na plazmidzie, hydrolizuje ampicylinę, karbenicylinę i cefalosporyny I generacji. Nie hydrolizuje natomiast meticyliny. Jest ona wrażliwa na kwas klawulanowy, sulbaktam, pCMB (p-chloromerkuribenooat) oraz kloksacylinę [53]. Wysoka aktywność wobec karbenicyliny pozwala zakwalifikować ten enzym jako karbenicylinazę. TEM-1 (pI 5,4) oraz pozostałe wymienione enzymy także kodowane są plazmidowo i wykazują

wrażliwość na działanie kwasu klawulanowego [6]. Ich głównym substratem jest penicylina.

Biorąc pod uwagę różnorodność β -laktamaz klasy A należy przypuszczać, że geny kodujące te enzymy będą ulegały dalszym mutacjom, prowadzącym do powstania kolejnych szczepów opornych. Taką właściwość wykazują szczególnie enzymy typu TEM i SHV, co uwarunkowane jest trzema głównymi ich właściwościami: znacznym rozpowszechnieniem wśród pałeczek Gram-ujemnych, powstawaniem ich w bardzo dużych ilościach oraz możliwością mutacji w kierunku enzymów o coraz szerszym zakresie substratowym [28]. Enzymy tego typu opisano już wśród niefermentujących pałeczek *P. aeruginosa* [47, 49]. Pojawienie się wśród pałeczek *Acinetobacter* spp. ESBL typu TEM i SHV jest wysoce prawdopodobne i wydaje się być tylko kwestią czasu.

Dotychczas u pałeczek rodzaju *Acinetobacter* nie opisano β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy, które należałyby do klasy A według A m b l e r a.

4.2. Klasa B β -laktamaz

Klasa B to metalo- β -laktamazy, w skrócie nazywane MBL, do których zalicza się IMP i VIM. W odróżnieniu od β -laktamaz serynowych, do których należą wszystkie pozostałe klasy β -laktamaz, zawierają one w miejscu aktywnym dwuwartościowy jon cynku i dlatego są hamowane przez EDTA. Są one jednocześnie odporne na działanie inhibitorów β -laktamaz [15, 35]. Hydrolizują penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. Mimo tak szerokiego zakresu działania nie rozkładają aztreonamu.

Pierwszy enzym typu IMP wykryto i opisano na początku lat 90. XX wieku w Japonii u pałeczek *P. aeruginosa* i *Serratia marcescens* [51, 68]. Został on nazwany IMP-1. Wkrótce potem opisano ten enzym u wielu gatunków bakterii w innych krajach, w tym także w 1999 roku we Włoszech u *Acinetobacter* spp. [20]. Należy podkreślić, że w tym czasie na Dalekim Wschodzie, podczas gdy opisywano IMP-1 u wielu gatunków bakterii, nie wykazywano go jeszcze w Europie. *Acinetobacter* spp. okazał się bakterią, u której po raz pierwszy na tym kontynencie zidentyfikowano enzymy typu IMP [20]. IMP-2, kolejną karbapenemazę występującą u pałeczek *Acinetobacter* spp., opisano także we Włoszech w 2000 roku [60]. *A. baumannii* jest pierwszą na świecie bakterią, u której zidentyfikowano ten enzym. Kolejną metalo- β -laktamazą typu IMP wykrytą u rodzaju *Acinetobacter* był enzym IMP-4 opisany w Hong Kongu w Chinach [17]. W Portugalii natomiast w 2002 roku zidentyfikowano po raz pierwszy na świecie enzym IMP-5. Bakterią, u której go wykryto był, podobnie jak w przypadku IMP-2, *A. baumannii* [22]. Świadczy to o ogromnych możliwościach pałeczek

czek rodzaju *Acinetobacter* do wytwarzania nowych mechanizmów oporności obejmujących swoim zakresem nawet karbapenemy, powszechnie uważane za najskuteczniejsze antybiotyki β -laktamowe.

Do metalo- β -laktamaz klasy B występujących u pałeczek *Acinetobacter* spp. należą także enzymy typu VIM. VIM-1 opisany został w tej grupie drobnoustrojów we Włoszech, a VIM-2 w Korei [71].

Łatwość rozprzestrzeniania MBL wiąże się z horyzontalnym przekazywaniem genów *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* wśród bakterii różnych gatunków [8, 35, 59]. Geny te pierwotnie znajdowały się w chromosomach. Obecnie wiadomo, że wchodzi w skład integronów, które mogą wbudowywać się w plazmidy i chromosomy. Mają one też zdolność włączania i wyłączania sekwencji DNA w obrębie, tzw. kasety zawierającej duże fragmenty z genami oporności na różne klasy antybiotyków, co warunkuje wielolekooporność.

Rozprzestrzenienie MBL wśród pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazuje zróżnicowanie geograficzne [1, 35, 60, 62, 71]. Szczepy wytwarzające te enzymy izolowano głównie na Dalekim Wschodzie, ale także i w Europie. Opisywanie ich w tak odległych od siebie rejonach pozwala przypuszczać, że występują one na całym świecie. Odsetek szczepów pałeczek *Acinetobacter* spp. opornych na karbapenemy jest niższy niż wśród szczepów *Pseudomonas* spp., ale ciągle wzrasta. Należy jednak zwrócić uwagę, że odsetek szczepów posiadających MBL wśród szczepów niewrażliwych na karbapenemy może być wyższy dla *Acinetobacter* spp., niż dla *Pseudomonas* spp. [36]. Niewątpliwie wzrost występowania MBL wiąże się ze wzrostem stosowania karbapenemów w leczeniu zakażeń. Szczepy odporne na imipenem występują na całym świecie. Jednak izolaty wytwarzające MBL występują rzadziej, niż te, które wytwarzają inne mechanizmy oporności na karbapenemy, na przykład opisane niżej enzymy typu OXA [14–16, 35]. Biorąc jednakże pod uwagę ogromny potencjał genów kodujących MBL zdolnych do rozprzestrzeniania się wśród pałeczek niefermentujących, jak również innych drobnoustrojów, karbapenemy mogą stać się wkrótce nieskutecznymi lekami w terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp.

4.3. Klasa C β -laktamaz

Do klasy C należą kodowane chromosomalnie cefalosporynazy, zaliczane do grupy 1 według klasyfikacji Bush [14, 16]. Wykazują one bardzo dużą różnorodność, co utrudnia ich ocenę i identyfikację. Wiele badań sugeruje jednak, iż są to najważniejsze β -laktamazy wytwarzane przez pałeczki *Acinetobacter* spp. Występują one u 75 do 98% szczepów tego rodzaju. Są hamowane przez kloksacylinę. Izolacja tych enzymów jest trudna ze względu na dużą masę

cząsteczkową i słabą rozpuszczalność. Z tych powodów wiedza na ich temat jest jeszcze niepełna i wymaga on uzupełnienia dalszymi badaniami.

Pierwszą chromosomalną cefalosporynazę (pI 8,6) u pałeczek *Acinetobacter* spp. opisali w 1976 roku Matthew i Harris [wg 6]. W następnych latach opisano kolejne enzymy tej grupy. Cefalosporynazę hamowaną przez kloksacylinę, aztreonam, karbenicylinę i sulbaktam opisał w 1977 roku Morohoshi (pI 7,25–7,5 CEP-N) i Bluschmidt (pI 9,9) [wg 6]. Jest ona oporna na działanie kwasu klawulanowego.

Hood i Ameyes [33] w 1991 roku podzielili znane wówczas cefalosporynazy kodowane chromosomalnie, na 4 grupy: ACE-1, ACE-2, ACE-3 i ACE-4 (*Acinetobacter* chromosomal enzymes). Enzymy te zróżnicowano dzięki chromatografii FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography). Najmniejszą cząsteczkę ma ACE-3 (M_r 35000) i ACE-2 (M_r 60500). Z kolei ACE-1 i ACE-4 to duże enzymy o masie cząst. powyżej 500000, a nawet 1000000, co sugeruje, że są one złożone z wielu łańcuchów polipeptydowych lub łączą się z innymi komponentami komórkowymi, w tym prawdopodobnie składnikami ściany komórkowej. Mogą więc one stanowić formę pośrednią między PBP, a β -laktamazami [44]. ACE wykazują aktywność wobec cefalosporyn i penicylin. Najwyższą efektywność ich działania stwierdza się w stosunku do cefalosporyn I generacji, takich jak cefalorydyna i cefradyna. Żaden z enzymów tej grupy nie hydrolizuje aztreonamu i cefalosporyn III generacji. Trzy z nich (ACE-1, ACE-2, ACE-3) wiążą jednak aztreonam, co z jednej strony warunkuje częściową oporność na ten antybiotyk, z drugiej natomiast inaktywuje te enzymy. Najsilniejszą cefalosporynazą opisanej grupy jest ACE-1. Obecnie cefalosporynazy dzieli się na dwie grupy: pierwszą o pI >8,5 oraz drugą o pI 8–8,5 [40].

W 1996 roku [54] scharakteryzowano nowe cefalosporynazy pod względem właściwości biochemicznych, a w 2000 roku [9] opisano sekwencję nukleotydową pierwszego genu kodującego cefalosporynazę AmpC, wytwarzaną przez pałeczki *Acinetobacter* spp. Gen *ampC* cefalosporynazy występującej u pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazuje największe podobieństwo w stosunku do genu *ampC* u *Aeromonas sobria*. Sięga ono jednak tylko 42,3% budowy nukleotydowej. Porównując sekwencje nukleotydowe genów *ampC* pałeczek *Acinetobacter* spp. i innych gatunków bakterii wykazano kolejne różnice, co świadczy o jeszcze mniejszym pokrewieństwie między nimi. Obecnie pojawiają się prace opisujące sekwencje nukleotydowe kolejnych cefalosporynaz występujących u pałeczek *Acinetobacter* spp. [5].

Pałeczki *A. baumannii* wytwarzające enzym AmpC wykazują różną oporność na β -laktamy. Poziom wytwarzania tego enzymu i tym samym oporności na

ceftazidim, zależy od obecności sekwencji promotrowej [21]. System regulacji ekspresji tych β -laktamaz jest tu bardziej złożony niż u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*. Stwierdzono, że szczepy *A. baumannii* posiadające średnią i wysoką oporność na ceftazidim dysponują sekwencją insercyjną zawierającą silny promotor, umieszczoną przed genem *ampC* [21]. Sekwencja ta jest ruchoma i zbudowana z 1200 par zasad. Jest to pierwszy znany ruchomy element genomu, który może regulować różne geny oporności u pałeczek *Acinetobacter* spp. Wykazuje on możliwość regulacji wytwarzania oksacylinaz, należących do klasy D β -laktamaz oraz genu *aac(3)IIa*, odpowiedzialnego za powstanie enzymu modyfikującego aminoglikozydy. Cefalosporynazy pałeczek *Acinetobacter* spp. wydają się nie podlegać indukcji w sposób taki jak ma to miejsce u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* [5]. Użycie cefoksytyny jako induktora w doświadczeniu przeprowadzonym przez Beceiro i wsp. [5] nie spowodowało zwiększenia wytwarzania AmpC β -laktamaz. Podobne wyniki uzyskiwali inni badacze [wg 6].

Jak już wspomniano cefalosporynazy pałeczek *Acinetobacter* spp. mogą inaktywować penicyliny oraz cefalosporyny. Są one jednak hamowane przez sulbaktam, co jest cechą obserwowaną tylko u pałeczek *Acinetobacter* spp. i *Citrobacter freundii*. Wyraża się to dużą aktywnością penicylin w połączeniu z tym inhibitorem β -laktamaz w warunkach *in vitro*. Stężenie sulbaktamu musi być jednak wysokie, co sprawia, że w warunkach *in vivo* skuteczność takiego połączenia jest wyraźnie mniejsza.

Wysoki poziom ekspresji genów cefalosporynaz wykryto u szczepów opornych na karbapenemy, u których mechanizm oporności na tę grupę antybiotyków jest dodatkowo związany ze zmniejszeniem przepuszczalności osłon komórkowych [57]. Oba te mechanizmy zdają się być odpowiedzialne za wzrost MIC dla karbapenemów, co zmniejsza ich skuteczność terapeutyczną. Dowodem na to przypuszczenie jest fakt, że nie stwierdzono innych istotnych różnic w mechanizmie oporności na β -laktamy u badanych szczepów *A. baumannii*, zarówno wrażliwych, jak i opornych na karbapenemy. Potwierdza to udział cefalosporynaz w oporności na tę grupę antybiotyków. Podobną zależność stwierdzono w przypadku oporności na piperacylinę, cefotaksym, cefpirom i aztreonam.

4.4. Klasa D β -laktamaz

Klasa D to β -laktamazy typu OXA (pI 6,65) – oksacylinazy inaktywujące penicyliny i cefalosporyny. Większość z nich hydrolizuje również karbapenemy, nie są one jednak metaloenzymami. Kodowane są chromosomalnie. Trudności w ich wykrywaniu wynikają z różnej aktywności wobec cefalosporyn III ge-

neracji. Mogą dla przykładu hydrolizować cefepim, nie hydrolizując ceftazidimu. Hamowane są przez kwas klawulanowy (oprócz OXA-23), tazobaktam i sulbaktam, wykazują z wyjątkiem enzymów OXA-24, OXA-27 i OXA-40, dużą aktywność wobec kloksacyliny i oksacyliny [3]. Według klasyfikacji Bush zaliczane są one wszystkie do klasy 2d [14, 16].

Pierwszym sklasyfikowanym i opisanym enzymem tej klasy u pałeczek *Acinetobacter* spp. był OXA-21 [66]. Zakres jego działania nie został ostatecznie wyjaśniony, ponieważ badany szczep wytwarzał dodatkowo dwie inne β -laktamazy, niemniej jednak nie obejmuje on karbapenemów [11, 66]. OXA-23, następny enzym występujący u rodzaju *Acinetobacter*, początkowo zakwalifikowano jako karbapenemazę klasy A wg Ambler'a i nazwano ARI-1 (*Acinetobacter* enzymy resistant to imipenem) [12]. Później, na podstawie badań nad strukturą genetyczną, zaliczono ją do oksacylinaz [2, 24]. Kolejną opisaną oksacylinazą była OXA-24 izolowana ze szczepu pochodzącego z Hiszpanii [10] oraz OXA-25, OXA-26, OXA-27 [3]. W 2003 roku opisano OXA-40 [32], a ostatnio w 2005 r. w Argentynie [13] i we Francji [55] wyizolowano dwie nowe karbapenemazy u pałeczek *Acinetobacter* spp. nazwane odpowiednio OXA-51 i OXA-58.

Pałeczki *Acinetobacter* spp. wytwarzają wszystkie opisane dotychczas β -laktamazy OXA hydrolizujące imipenem, tj. OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 oraz OXA-51 i OXA-58 [35, 55]. Badania genetyczne zaowocowały ich podziałem na trzy grupy. Do jednej z nich zaliczono OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, do drugiej OXA-23 i OXA-27, a do trzeciej OXA-51 i OXA-58 [13, 32, 55]. Porównując sekwencje nukleotydową poszczególnych grup enzymów OXA wykazano 60% podobieństwa w budowie cząsteczkowej. Z kolei podobieństwo enzymów należących do tej samej grupy jest bardzo wysokie i osiąga nawet 99%. Dla przykładu, OXA-40 różni się od pozostałych enzymów ze swojej grupy, jednym lub dwoma aminokwasami. Jednak jego właściwości biochemiczne znacznie różnią się od pozostałych, gdyż jest on słabo hamowany przez inhibitory β -laktamaz: kwas klawulanowy, tazobaktam, sulbaktam oraz wykazuje względnie wąski zakres działania, obejmujący jednak ceftazidim i imipenem.

Ostatnio opisane karbapenemazy OXA-51 i OXA-58 z uwagi na małe podobieństwo (około 60%) do pozostałych OXA karbapenemaz pałeczek *Acinetobacter* spp. zostały zaliczone do nowoutworzonej trzeciej grupy [13, 55]. Głównym substratem tych enzymów jest imipenem. Hydrolizują one także penicyliny, w tym oksacylinę. OXA-58 nie wykazuje aktywności wobec cefalosporyn. Są to enzymy kodowane przez geny znajdujący się na plazmidzie, w przeciwieństwie do większości enzymów tej klasy występujących u pa-

łeczek *Acinetobacter* spp., które kodowane są chromosomalnie.

Oksacylinazy mają zdecydowanie słabszą aktywność wobec karbapenemów niż metaloenzymy należące do klasy B. Wytwarzanie tych enzymów nie warunkuje całkowitej oporności na karbapenemy. Konieczne jest współistnienie zmniejszonej przepuszczalności błony zewnętrznej, związanej z brakiem białek porynowych. Dopiero połączenie tych dwóch mechanizmów powoduje pojawienie się oporności klinicznej na imipenem.

Karbapenemazy typu OXA mogą rozprzestrzeniać się także wśród innych gatunków bakterii. Enzym OXA-23 opisano u *P. mirabilis* [7]. Pałeczki *Acinetobacter* spp. są więc rezerwuarem, z którego geny *bla_{OXA}* kodujące karbapenemazy mogą rozprzestrzeniać się w przyszłości na inne bakterie. Liczba enzymów typu OXA u rodzaju *Acinetobacter* będzie się niewątpliwie powiększać coraz bardziej.

5. Zmiany w białkach wiążących penicyliny

Zmiana PBP jest często związana z opornością na β -laktamy. PBP u pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazują podobieństwo do analogicznych białek szczepów *Bacteroides* spp. O b a r a i N a k l e [50] opisali u pałeczek *Acinetobacter* spp. 6 białek PBP: 1a (94 kDa), 1b (92 kDa), 1c (86 kDa), 2 (74 kDa), 3 (59 kDa), 4 (42 kDa). Kombinacje tych białek warunkują różny stopień wiązania się antybiotyków β -laktamowych z komórką bakteryjną. F e r n á n d e z - C u e n c a i wsp. [26] obserwowali 12 różnych wzorów PBP u badanych przez siebie szczepów. Stwierdzili oni, że brak PBP2 (73,2 kDa) wraz z wytwarzaniem oksacylinaz lub MBL warunkuje oporność na imipenem.

6. Zmiana przepuszczalności osłon komórkowych poprzez redukcję białek porynowych

Istotnym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe pałeczek *Acinetobacter* spp. jest zmniejszenie przepuszczalności ściany bakteryjnej. Bakterie te wykazują 3% przepuszczalności ściany komórkowej *E. coli* i taką samą lub nawet mniejszą przepuszczalność niż *P. aeruginosa* [57]. Przepuszczalność ściany komórkowej rodzaju *Acinetobacter* dla penicylin i cefalosporyn stanowi 1% przepuszczalności jaka występuje u szczepów *E. coli*. Dla karbapenemów jest to poniżej 2%. Pozwala to tym bakteriom na osiągnięcie wysokiego poziomu oporności na antybiotyki β -laktamowe już przy niższym poziomie wytwarzania enzymów hydrolizujących te antybiotyki. Mechanizm zmniejszenia przepuszczalności osłon komórkowych

jest powszechny wśród dzikich szczepów występujących w środowisku naturalnym [6] i jest związany z wytwarzaniem białek porynowych OMP (outer membrane proteins). Jest to obok wytwarzania β -laktamaz najważniejszy sposób uzyskania oporności na antybiotyki β -laktamowe wśród pałeczek *Acinetobacter* spp. Wynika on z redukcji liczby poryn lub z tworzenia kanałów o mniejszych średnicach, nieprzepuszczających związków o dużej masie cząsteczkowej lub o znacznej hydrofobowości.

Za przepuszczalność antybiotyków przez błonę zewnętrzną u pałeczek *Acinetobacter* spp. odpowiedzialne są między innymi białka porynowe o masie cząsteczkowej 22 kDa, 22,5 kDa, 33–36 kDa, 46,5 kDa [8, 19, 26, 50]. Utrata tych białek warunkuje oporność na β -laktamy. Zmniejszone wytwarzanie poryn o masie cząsteczkowej 46,5 kDa jest związane ze spadkiem przepuszczalności dla małych hydrofilnych cząsteczek o 40% do 80% [50]. Pałeczki *Acinetobacter* spp. posiadają wiele białek porynowych, które mogą tworzyć różne wzory PBP.

Ostatnio pojawiło się szereg badań, których autorzy opisują niewątpliwą rolę OMP i PBP w budzącej coraz więcej obaw oporności szczepów *Acinetobacter* spp. na karbapenemy [1, 60]. Oporność tą wykazują zarówno szczepy wytwarzające karbapenemazy, jak i nie posiadające takiej cechy. Potwierdza to udział ściany komórkowej w wytworzeniu tej oporności, albo współistnienie kilku mechanizmów jednocześnie. Przypuszcza się, że jest to uwarunkowane utratą OMP lub ich uszkodzeniem na skutek mutacji. Stwierdzono, że szczepy odporne na karbapenemy w porównaniu ze szczepami wrażliwymi wykazują zmniejszoną ekspresję białek osłon zewnątrzkomórkowych 47 kDa, 44 kDa, 37 kDa [wg 6]. B o u i wsp. [8] odkryli, że zmniejszona ekspresja białek 22 kDa, 33 kDa powoduje podwyższenie MIC karbapenemów wśród szczepów wytwarzających OXA-24. W innych badaniach zauważono, że już sama redukcja ekspresji białek 33–36 kDa, bez udziału innych mechanizmów oporności może powodować oporność na karbapenemy [19]. Podobnie utrata białka 29 kDa związana jest z pojawieniem się oporności na imipenem u szczepów nie wytwarzających karbapenemaz [39]. Podobny efekt wywołuje brak białka porynowego 22,5 kDa [26].

Udział OMP i PBP w kształtowaniu oporności na imipenem jest bezsporny, ale wymaga jeszcze kolejnych, wnikliwych badań. Należy jednak zauważyć rosnący udział tych mechanizmów oporności w stosunku do wytwarzania β -laktamaz. Znamienny jest fakt, iż mogą one bez udziału enzymów hydrolizujących β -laktamy warunkować oporność na najbardziej skuteczną dziś grupę antybiotyków wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. jaką są karbapenemy. Oporność pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki β -laktamowe jest

jednak w rzeczywistości najczęściej wynikiem działania kilku mechanizmów jednocześnie. Potęguje to efekt obronny danego szczepu przed antybiotykami. Zmniejszenie powinowactwa β -laktamów do PBP, z jednoczesnym spadkiem przepuszczalności osłon komórkowych, daje zdecydowanie większe szanse na to, że β -laktamazy wytwarzane nawet w mniejszej ilości zhydrolizują lek przeciwbakteryjny. Naturalnie zmniejszona

przepuszczalność ściany komórkowej u bakterii jest znaczącym czynnikiem selekcyjnym. Powoduje też łatwiejsze uzyskiwanie wysokiego poziomu oporności na antybiotyki w stosunku do innych pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wydaje się, że to właśnie w ścianie komórkowej tkwi największa tajemnica oporności pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki.

Tabela I

Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek *Acinetobacter* spp.

Rodzaj mechanizmu oporności	Nazwa	Klasa mechanizmów laktamazy	Zakres działania	Kodowanie	Rok odkrycia
β -laktamaza	TEM-1	A	Penicyliny	Plazmidowo	1980
β -laktamaza	TEM-2	A	Penicyliny	Plazmidowo	1982
β -laktamaza	CARB-5	A	Karbenicylina	Plazmidowo	1988
β -laktamaza	SHV-like	A	Penicyliny	Plazmidowo	1993
β -laktamaza	PER-1	A	Cefalosporyny, penicyliny	Plazmidowo/Chromosomalnie	1997
β -laktamaza	VEB-1	A	Cefalosporyny, peniceliny	Plazmidowo/Chromosomalnie	2003
β -laktamaza	CTX-M-2	A	Cefalosporyny, peniceliny	Plazmidowo	2004
β -laktamaza	IMP-1	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	1999
β -laktamaza	IMP-2	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2000
β -laktamaza	IMP-4	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2001
β -laktamaza	IMP-5	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2002
β -laktamaza	VIM-1	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	1999
β -laktamaza	VIM-2	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2002
β -laktamaza	ACE-1	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	ACE-2	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	ACE-3	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	ACE-4	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	AMP-C	C	Penicyliny, cefalosporyny	Chromosomalnie	od 1996
β -laktamaza	OXA-21	D	Penicyliny, cefalosporyny	Chromosomalnie/Plazmidowo	1997
β -laktamaza	OXA-23 (ARI-1)	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie/Plazmidowo	1985/99
β -laktamaza	OXA-24	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	1993
β -laktamaza	OXA-25	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2000
β -laktamaza	OXA-26	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2000
β -laktamaza	OXA-27	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2000
β -laktamaza	OXA-40	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2002
β -laktamaza	OXA-51	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2005
β -laktamaza	OXA-58	D	Penicyliny, karbapemy	Plazmidowo	2005
Zmiana PBP:	1a (94 kDa), 1b (92 kDa), 1c (86 kDa), 2 (74 kDa), 3 (59 kDa), 4 (42 kDa)	–	β -laktamy z karbapenemami	Chromosomalnie	1991
Przepuszczalność osłon komórkowych	Spadek liczby białek m.in. 22 kDa, 22.5 kDa, 33–36 kDa, 46 kDa	–	β -laktamy z karbapenemami	Chromosomalnie	1996
Przepuszczalność osłon komórkowych	Brak 29 kDa	–	Karbapenemy	Chromosomalnie	2002

7. Wpływ („efflux”) antybiotyków z wnętrza komórki

Kolejnym mechanizmem oporności na β -laktamy jest wypływ („efflux”) antybiotyku z komórki bakteryjnej. Jest to najslabiej poznany mechanizm oporności na antybiotyki u pałeczek *Acinetobacter* spp. Dotyczy on wielu antybiotyków, a zwłaszcza cefotaksymu, chloramfenikolu, trimetoprimu, tetracyklin, fluorochinolonów i aminoglikozydów [41, 42, 57]. Pompa odpowiedzialna za ten rodzaj oporności należy do superrodziny RND (resistance-nodulation-division) i jest kodowana przez gen *adeABC*, którego ekspresja jest regulowana przez dwuskładnikowy system regulacji, zbudowany z genów *adeR* i *adeS*. Mechanizm ten ma jednak, jak się okazuje, niewielkie znaczenie w oporności na β -laktamy.

8. Podsumowanie

Podsumowując przytoczone mechanizmy oporności na β -laktamy (tab. I) występujące u pałeczek *Acinetobacter* spp. można stwierdzić, że bakterie te mają potencjalną zdolność wytwarzania oporności na wszystkie znane dziś antybiotyki β -laktamowe. Jeden szczep może wytwarzać kilka β -laktamaz z jednoczesną redukcją lub zmianą OMP, czy PBP, co powoduje oporność na wiele antybiotyków tej grupy. Udowodniono, że każdy z tych mechanizmów niezależnie może powodować oporność w stosunku do nawet najbardziej skutecznych β -laktamów. Niewątpliwie jednak największe znaczenie ma współdziałanie wielu z nich jednocześnie.

Ze względu na złożoność problemu oporności na antybiotyki β -laktamowe, należy stosować je z dużą rozważą, aby nie dopuścić do selekcji szczepów opornych.

Piśmiennictwo

- Afzal-Shah M., Livermore D.: Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 576–577 (1998)
- Afzal-Shah M., Villar H., Livermore D.: Biochemical characteristics of a carbapenemase from an *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 127–131 (1999)
- Afzal-Shah M., Woodford N., Livermore D.: Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 583–588 (2001)
- Ambler R.P.: The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **286**, 321–331 (1980)
- Beceiro A., Dominguez L., Ribera A.: Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC β -lactamase in clinical strain of *Acinetobacter* genomic species 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1374–1378 (2004)
- Bergogne-Bérézin E., Joly-Guillou, Towner K. J.: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. CRC Press INC. New York 1996
- Bonnet R., Marchandin H., Chanal C.: Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2004–2006 (2002)
- Bou G., Cerveró G., Domínguez M.: Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3299–3305 (2000)
- Bou G., Martínez-Beltrán J.: Cloning nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 428–432 (2000)
- Bou G., Oliver A., Martínez-Beltrán J.: OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1556–1561 (2000)
- Bradford P.: Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microb. Rev.* **14**, 933–951 (2001)
- Brown S., Bantar C.: Limitation of *Acinetobacter baumannii* treatment by plasmid-mediated carbapenemase ARI-2. *Lancet*, **351**, 186–187 (1998)
- Brown S.: Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin. Microb. Infect.* **11**, 15–23 (2005)
- Bush K., Jacoby G., Medeiros A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233 (1995)
- Bush K.: Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 48–53 (1998)
- Bush K.: New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1085–1089 (2001)
- Chu Y., Afzal-Shah M., Houang E.: IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 710–714 (2001)
- Cisneros J., Rodriguez-Bano J.: Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microb. Infect.* **8**, 687–693 (2002)
- Clark, R. B.: Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33–36-kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**, 242–251 (1996)
- Cornaglia G., Riccio M., Mazzariol A.: Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet*, **13**, 899 (1999)
- Corvec S., Caroff N., Espaze E.: AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 629–635 (2003)
- Da Silva G.J., Correia M., Vital C., Ribeiro G, Sousa J.C., Leitão R., Peixe L., Duarte A.: Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 33–39 (2002)
- Devaud M., Kayser F.H., Bachi B.: Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 323–329 (1982)
- Donald H., Scaife W., Amyes S.: Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance

- in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 196–199 (2000)
25. Drago L., Vecchi E., Nicola L.: Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemother.* **50**, 202–210 (2004)
 26. Fernández-Cuenca F., Martínez L., Conejo, Juana C.: Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 565–574 (2003)
 27. Girlich D., Poirel L., Leelaporn A.: Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 175–182 (2001)
 28. Gniadkowski M.: Beta-laktamazy o szerokim i rozszerzonym spektrum substratowym oraz β -laktamazy odporne na inhibitory. *Antybiotykoterapia*, **5**, 540–544 (1999)
 29. Gospodarek E., Ziółkowski G.: Antybiotykooporne szczepy *Acinetobacter baumannii* występujące w Polsce. *Przeg. Epid.* **54**, 88–96 (2000)
 30. Gospodarek E.: Ocena wybranych właściwości biologicznych pałeczek *Acinetobacter* spp. Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy. Praca habilitacyjna 1999
 31. Helfand M., Bonomo R.: β -lactamases: a survey of protein diversity. *Curr. Drug Targets.* **3**, 9–23 (2003)
 32. Héritier C., Poirel L., Aubert D.: Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 268–273 (2003)
 33. Hood J., Amyes S.C.E.: The chromosomal β -lactamases of the genus *Acinetobacter*: enzymes which challenge our imagination (w) *The biology of Acinetobacter*. Towner K.J., Bergogne-Bérézin E., Fewson C.A., Plenum Publishing Corp., New York 1991, s 117–132
 34. Houang E., Yiu Wai Chu, K.Y. Chu.: Significance of genomic DNA group delineation in comparative studies of antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1472–1475 (2003)
 35. Laudy A.: Karbapenemazy – enzymy mogące hydrolizować szerokie spektrum β -laktamów. *Zakażenia*, z. **4**, 32–38 (2003)
 36. Lee K., Gyo Lee W., Uh Y.: VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 868–871 (2003)
 37. Levin A., Baron R., Santos M.: Intravenous colistin as therapy for nosocomial infectious caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1008–1011 (1999)
 38. Levin A.: Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin. Microb. Infect.* **8**, 144–153 (2002)
 39. Limansky A., Musi M., Viale A.: Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4776–4778 (2002)
 40. López-Hernández S., Alarcón T., López-Brea M.: Biochemical characterization of chromosomal cephalosporinases from isolates belonging to the *Acinetobacter baumannii* complex. *Clin. Microb. Infect.* **7**, 218–226 (2001)
 41. Magnet S., Courvalin P., Lambert T.: Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3375–3380 (2001)
 42. Marchand I., Damier-Piolle L., Courvalin P.: Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3298–3304 (2004)
 43. Marques M.B., Brookings E.S., Moser S.A.: Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 881–885 (1997)
 44. Massova I., Mobashery S.: Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1–17 (1998)
 45. Montero A., Ariza J., Corbella X.: Efficacy of colistin versus β -lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1946–1952 (2002)
 46. Montero J., Leyba C., Jiménez F.: Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 1111–1118 (2003)
 47. Mugnier P., Dubrous P., Casin I.: A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2488–2493 (1996)
 48. Nagano N., Nagano Y., Cordevant C., Shibata N., Arakawa Y.: Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3978–3984 (2004)
 49. Nass T., Philippon L., Porel E.: An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1281–1284 (1999)
 50. Obara M., Nake T.: Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 791–800 (1991)
 51. Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., Ohta M., Horii T., Ito H., Yoshimura F., Kato N.: Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 71–78 (1994)
 52. Pandey A., Kapil A., Sood S.: In Vitro activities of ampicillin-sulbactam and amoxicillin clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3415–3416 (1998)
 53. Paul, G., M.L. Joly-Gouilou, E. Bergogne-Brezin.: Novel carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**, 45–50 (1989)
 54. Perilli M., Felici A., Oratore A.: Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 715–719 (1996)
 55. Poirel L., Marqué S., Héritier C.: OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 202–208 (2005)
 56. Poirel L., Menuteau O., Agoli N.: Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3542–3547 (2003)
 57. Quale J., Bratu S., Landman D.: Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 214–220 (2003)

58. Reis A., Luz D., Tognim M.: Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1025–1026 (2003)
59. Riccio M., Franceschini N., Boschi L.: Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1229–1235 (2000)
60. Rohini M., Gee Yen S., Farrag N.: Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a London hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 141–142 (2003)
61. Shah A., Hasan F., Ahmed S.: Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 25–32 (2004)
62. Tysall L., Stockdale M., Chadwick P.: IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 215–224 (2002)
63. Urban C., Segal-Maurer S., Rahal J.: Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 1268–1274 (2003)
64. Vahaboglu H., Öztürk R., Aygün G.: Widespread detection of PER-1- type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2265–2269 (1997)
65. Vila J., Marcos A., Marco F.: In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 138–141 (1993)
66. Vila J., Navia J., Casals R. and C.: Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA – derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2757–2759 (1997)
67. Visalli M., Jacobs M., Moore T.: Activities of β -lactams against *Acinetobacter* genospecies as determined by agar dilution and E-test MIC methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 767–770 (1997)
68. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuashi S.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 147–151 (1991)
69. Wood Ch., Hanes S., Croce M.: Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 1425–1430 (2002)
70. Yong D., Hee Shin J., Kim S.: High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1749–1751 (2003)
71. Yum J., Yi K., Yong D.: Molecular characterization of metallo-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 837–840 (2002)

Łukasz Drewniak, Aleksandra Skłodowska

Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Miecznikowa 1, 02-009 Warszawa, tel.: (+22) 5541 005, fax: (+22) 5541 006, e-mail: asklodowska@biol.uw.edu.pl

Wpłynęło w kwietniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Rozpowszechnienie arsenu w środowisku. 3. Mikrobiologiczne transformacje arsenu. 3.1. Biometylacja organicznych związków arsenu. 3.2. Redukcja arsenianów – mechanizmy oporności. 4. Procesy redoks – oddychanie tlenowe (utlenianie) i bez-tlenowe (redukcja). 4.1. Dysymilacyjna redukcja arsenianów. 4.2. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów. 5. Biogeochemiczny obieg arsenu. 6. Podsumowanie

The role of bacteria in biogeochemical cycle of arsenic

Abstract: Arsenic is widely distributed in the Earth's crust and is one of the most toxic elements. It is found in soil and natural minerals and it, therefore, may enter the atmosphere and water. Arsenic can exist in four valence states (–3, 0, +3, +5) and in a number of organic and inorganic forms. Organic forms are less harmful than the inorganic ones and arsenite [As(III)] is more toxic than arsenate [As(V)]. Some prokaryotes may use arsenic compounds for energy generation (either as electron donors or acceptors), whereas others are only resistant to arsenic. These microbes play an important role in speciation and mobilization of arsenic in nature. The review of microbial arsenic metabolism and the potential role of microbes in the biogeochemical cycle of arsenic are presented in this paper.

1. Introduction. 2. Arsenic in the environment. 3. Microbial transformation of arsenic. 3.1. Biomethylation of organic arsenic compounds. 3.2 Reduction of arsenate-resistance mechanism. 4. Redox reaction – aerobic (oxidation) and anaerobic (reduction) respiration. 4.1 Dissimilatory reduction of arsenate. 4.2 Microbial arsenite oxidation. 5. Biogeochemical cycle of arsenic. 6. Summary

Słowa kluczowe: arsen, toksyczność, oporność, mikroorganizmy, obieg biogeochemiczny

Key words: arsenic, toxicity, resistance, microorganism, biogeochemical cycle

1. Wstęp

Mikroorganizmy są stale narażone na działanie jonów metali występujących w środowisku. Niektóre z tych jonów (magnez, potas, miedź czy cynk) są pobierane jako istotne składniki odżywcze, podczas gdy inne są związkami toksycznymi (tj. rtęć, ołów, kadm, arsen czy srebro) [59].

Jednym z najbardziej toksycznych pierwiastków, występujących naturalnie w środowisku, jest arsen. Na działanie toksycznych związków arsenu są narażone zarówno organizmy prokariotyczne jak i eukariotyczne. U ludzi arsen działa teratogennie, kancerogennie i mutagennie. Działa on na skórę oraz różne organy, w tym: wątrobę, układ krwionośny, nerki, płuca, gruczoł krokowy. Może powodować cukrzycę, chorobę wieńcową, hiperpigmentację i zapalenie skóry, zmiany hematologiczne, obwodowe neuropatie i wiele innych schorzeń [22].

Toksyczność związków arsenu jest uzależniona od wartościowości tego pierwiastka oraz od postaci, w jakiej on występuje. Najbardziej groźne i toksyczne są nieorganiczne związki arsenu, przy czym związki As(III) są bardziej toksyczne niż związki As(V) [41]. Żywe komórki (bakteryjne, roślinne, zwierzęce, w tym

ludzkie) są narażone głównie na działanie arsenu w postaci arsenianów i arseninów. Arseniany (HAsO_4^{2-} i H_2AsO_4^-), są molekularnymi analogami fosforanów i hamują fosforylację oksydacyjną, tym samym blokując łańcuch oddechowy. Arseniny [$\text{As}(\text{OH})_3$ i H_2AsO_3^-] są bardziej toksyczne, ponieważ wiążą się z grupami tiolowymi, upośledzając funkcje wielu białek. Związki As(III) powodują także zaburzenia w utlenianiu, np. pirogronianu, alfa-ketoglutaranu i glutaminianu [40].

Mikroorganizmy wykształciły różne mechanizmy usuwania arsenu z komórki. Mogą one: (i) zmniejszyć pobieranie arsenianów przez systemy transportu fosforanów [14], (ii) przeprowadzić transformacje chemiczne toksycznych związków arsenu (metylacja, demetylacja, redukcja, utlenianie) oraz (iii) wykorzystać specjalne systemy detoksykacji arsenu, tzw. systemy ArsC [60].

W niniejszej pracy dokonano przeglądu bakterii odgrywających kluczową rolę w biogeochemicznym obiegu arsenu. Opisano: (i) bakterie odporne na związki arsenu, (ii) bakterie wykorzystujące arseniany jako końcowe akceptory elektronów w procesie oddychania beztlenowego, a także (iii) bakterie chemolitoautotroficzne uzyskujące energię z procesu utleniania arseninów.

2. Rozpowszechnienie arsenu w środowisku

Arsen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w skorupie ziemskiej, ale występuje w niej w ilościach śladowych (około 3,4 ppm) [74]. Występuje w glebie i w minerałach, i może być również uwalniany do wody i powietrza. Minerale arsenowe wchodziły w skład hydrotermalnych lub metasomatycznych złóż rud metali, a wśród ponad 150 istniejących minerałów najbardziej rozpowszechnionymi są: realgar (As_4S_4), aurypigment (As_2S_3), arsenit (As_2O_3), lelingit (FeAs_2) i arsenopiryt (FeAsS) [10, 11]. W Polsce najważniejsze złoża minerałów arsenowych znajduje się w Żłotym Stoku (Dolny Śląsk), a niewielkie ich ilości stwierdzono również w Miedziance i Czarnowie koło Kamiennej Góry (Dolny Śląsk).

Arsen jest uwalniany do środowiska pod wpływem: (i) wietrzenia skał, (ii) erupcji i emisji wulkanów, oraz (iii) innych naturalnych procesów (np. pod wpływem działania mikroorganizmów). Na obecność związków arsenu w glebie, wodzie i powietrzu ma także wpływ działalność człowieka. Do antropogenicznych źródeł arsenu można zaliczyć: (i) wydobywanie i wytopienie rud metali nieżelaznych, (ii) spalanie drewna i węgla brunatnego, (iii) stosowanie pestycydów, defoliantów i herbicydów [6], (iv) stosowanie związków arsenu jako dodatku do pasz dla zwierząt [Roxarsony (kwas 4-hydroksy-3-nitrofenyloarsenowy) i kwas *p*-arsanilowy (kwas 4-aminofenyloarsenowy)] [54]. Skażeniu ulega przede wszystkim gleba oraz środowisko wodne, a ilości uwolnionych związków prawie czterokrotnie przewyższają te pochodzące z naturalnych źródeł [19].

Arsen jest powszechnym zagrożeniem zdrowia w wielu częściach świata. Skażenie wód gruntowych tym pierwiastkiem stwierdzono w: Bangladeszu [8], Zachodnim Bengal w Indiach [21], Tajwanie [16], Chile [9], Północnym Meksyku [13], Argentynie [3, 23, 44] oraz w USA (W Stanach: Kalifornia, Utah, Nevada, Washington i Alaska) [72]. W Polsce największe ilości arsenu znajdują się w: (i) Bieszczadach, co związane jest z występowaniem minerałów arsenowych w okolicy Baligródu, (ii) na Górnym Śląsku, co wiąże się z rozwojem i działalnością hutnictwa i górnictwa rud metali, oraz (iii) na Dolnym Śląsku w dolinie potoku Trująca i w okolicach Żłotego Stoku, gdzie występują złoża arsenowe lelingitu i arsenopiryty [36].

3. Mikrobiologiczne transformacje arsenu

Arsen należy do pierwiastków bardzo mobilnych i w środowisku ulega różnorodnym transformacjom włączając: przemiany chemiczne (procesy redukcji/utleniania, metylacji/demetylacji) oraz zmiany postaci fizycznej (ciało stałe – ciecz – gaz). Głównym źródłem

transformacji arsenu w środowisku są organizmy żywe, a przede wszystkim mikroorganizmy.

Przemiany arsenu przeprowadzane przez drobno-ustroje prokariotyczne i eukariotyczne stanowią kluczowe etapy biogeochemicznego obiegu tego pierwiastka. Możemy wyróżnić trzy podstawowe typy biotransformacji:

- (i) procesy redukcji, metylacji i demetylacji związków arsenu (przeprowadzane przez grzyby, glony i bakterie),
- (ii) biosynteza organicznych związków arsenu (przeprowadzane przez grzyby, glony, bakterie i archeony),
- (iii) przemiany redoks pomiędzy arseninami a arsenianami (przeprowadzane przez prokarioty).

Procesy redoks „katalizowane” przez bakterie i archeony są najważniejszym elementem biogeochemicznego obiegu arsenu i dlatego zostały one omówione szerzej w rozdz. 4.

3.1. Biometylacja organicznych związków arsenu

Proces biometylacji pierwszy raz opisano w 1945 roku, gdy wykazano, że grzyb *Scopulariopsis brevicaulis* jest zdolny do metylacji arsenowodoru [15]. Od tego czasu opisano wiele gatunków grzybów metylujących związki arsenu. Interesującym przykładem jest *Candida humicola*. Gatunek ten wykazuje zdolność do metylacji arseninów, metyloarsenianów, oraz dime-tyloarsenku (DMA) do trimetyloarsenku (TMA) [18]. Z kolei szczep *Penicillium* sp., wyizolowany przez H u y s m a n s i F r a n k e r b e r g a w 1991 [30] jest zdolny nie tylko do metylacji arsenu, ale również do utleniania powstałego produktu.

Metylacja związków arsenu została wykryta także u wielu gatunków prokariotów. W 1971 roku M c B r i d e i W o l f e po raz pierwszy opisali ten proces u archeona *Methanobacterium bryantii* [37]. Kilka lat później wyizolowano *Aeromonas* sp. i *Flavobacterium* sp., które są zdolne do metylacji związków arsenu [75]. Obecnie wiadomo, że metylowe pochodne arsenu produkują też: *Corynebacterium* sp., *E. coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Nocardia* sp. [7].

Co ciekawe, mikrobiologiczna metylacja związków arsenu wykazuje duże podobieństwo do procesów przeprowadzanych w tkankach zwierząt [60]. W tkankach zwierzęcych oraz u grzybów donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina, a produktem metylacji arseninów jest kwas dimetyloarsenowy. Z kolei u bakterii donorem grupy metylowej jest metylo-kobalamina. We wszystkich przypadkach w procesie metylacji niezbędne jest także cytoplazmatyczne białko, metylotransferaza, która wykorzystuje tioredoksynę (Trx) jako reduktor [60].

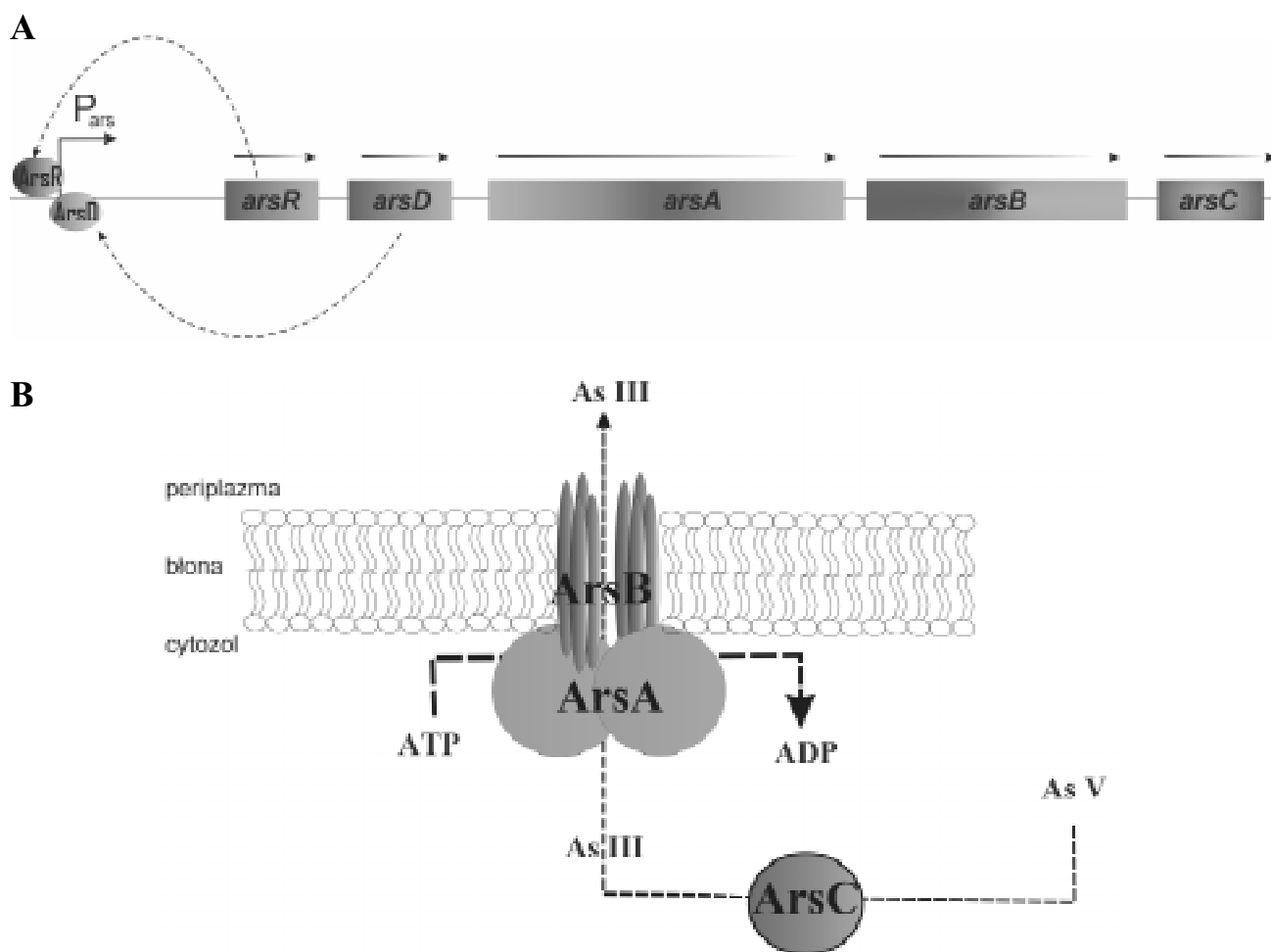
Warto zaznaczyć, że metylacja związków arsenu nie jest uniwersalnym mechanizmem oporności na arsen, a dla niektórych mikroorganizmów metylowane formy arsenu mogą być bardziej toksyczne niż formy niemetylowane [64]. Z kolei niewiele wiadomo na temat odwrotnego procesu, a mianowicie demetylacji organicznych pochodnych arsenu. Nie zidentyfikowano dotąd żadnych enzymów (ani genów) odpowiedzialnych za proces demetylacji organicznych pochodnych arsenu.

3.2. Redukcja arsenianów – mechanizm oporności

W celu ochrony przed toksycznym działaniem arsenu mikroorganizmy wykształciły różne strategie detoksykacji. Najbardziej powszechnym i najlepiej poznany mikrobiologicznym mechanizmem oporności na arsen są tzw. systemy *ars*. Mechanizm działania polega na redukcji arsenianów [As(V)], a następnie usuwaniu powstałych arseninów [As(III)] poza komórkę. Systemy *ars* występują zarówno u bakterii Gram-dodatnich, gramujemnych jak i u archeonów. Proces

redukcji As(V) do As(III) wykryto także u *Saccharomyces cerevisiae*.

Determinanty genetyczne odpowiedzialne za mechanizm redukcji arsenianów mogą znajdować się na chromosomach lub plazmidach i mogą występować razem z genami oporności na inne metale ciężkie, np. na antymon Sb(III) [12]. Systemy *ars* tworzą operony składające się z minimum trzech genów podlegających wspólnej transkrypcji: *arsR*, *arsB* i *arsC* [61]. Gen *arsR* koduje białko regulatorowe odpowiedzialne za ekspresję operonu *ars*, gen *arsB* – specyficzny transporter As(III), a *arsC* – cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową. W operonach *ars* mogą występować dodatkowe geny: *arsA* i *arsD*. Białko ArsA jest rozpuszczalną podjednostką ATPazy aktywowaną poprzez obecność metalu ciężkiego. ArsA tworzy kompleks z błonowym białkiem ArsB, i pośrednio (jako kompleks ArsAB) uczestniczy w usuwaniu As(III) poza komórkę [70]. Białko ArsD pełni funkcje drugiego, poza ArsR, regulatora operonu *ars*. Jak się wydaje, białko ArsD jest regulatorem działającym *in trans*, niezależnym od



Rys. 1. Schemat organizacji operonu *ars* [A] oraz mechanizm działania systemu *ars* [B]

Gen *arsR* koduje białko regulatorowe (ArsR) odpowiedzialne za ekspresję operonu *ars*, gen *arsD* koduje drugi regulator – białko ArsD. Gen *arsB* koduje specyficzny transporter As(III) (białko ArsB), *arsC* cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową (białko ArsC), z kolei *arsA* koduje ATPazę (białko ArsA), która tworzy kompleks z ArsB, i pośrednio (jako kompleks ArsAB) uczestniczy w usuwaniu As(III) poza komórkę.

czynników indukujących [27]. Schemat organizacji operonu *ars* oraz mechanizm działania systemu *ars* przedstawiono na rys. 1.

Podstawowym enzymem w systemach *arsC* jest cytoplazmatyczna reduktaza arsenianowa ArsC. Na podstawie przeprowadzonych analiz filogenetycznych sekwencji białkowych wykazano, że istnieją trzy oddzielne grupy cytoplazmatycznych reduktaz arsenianowych, które mają taką samą funkcję biochemiczną, ale różne pochodzenie ewolucyjne [38]. Archetypem pierwszej grupy reduktaz arsenianowych jest reduktaza kodowana przez plazmid R773 *E. coli*, która wykorzystuje glutaredoksynę (Grx) i glutation (GSH) jako reduktor. Reprezentantem drugiej rodziny jest reduktaza ArsC kodowana przez plazmid pI258 *Staphylococcus aureus*, która wykorzystuje tioredoksynę (Trx) jako reduktor i jest spokrewniona z rodziną LmwPTPaz (Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase). Trzecią rodzinę reprezentuje reduktaza Acr2p z *S. cerevisiae*, jedyna do tej pory zidentyfikowana eukariotyczna reduktaza arsenianowa. Należy ona do super-rodзинy PTPaz (protein tyrosine phosphatase), w skład której wchodzi fosfatazy cyklu komórkowego Cdc25a.

4. Procesy redoks

Źródłem energii dla organizmów chemotroficznych są reakcje utleniania i redukcji (reakcje redoks), w których elektrony są przenoszone z jednego pierwiastka lub związku na inny związek lub pierwiastek. Reakcje redoks powodują zmiany konfiguracji elektronowej danego pierwiastka (związku), co bardzo często zmienia jego właściwości oraz reaktywność. Abiotyczne procesy redoks zachodzą bardzo powoli, zaś reakcje katalizowane przez mikroorganizmy są dużo szybsze i bardziej rozpowszechnione w środowisku naturalnym.

Reakcje utleniania i redukcji przeprowadzane przez mikroorganizmy są zazwyczaj wykorzystywane w procesach oddechowych do uzyskiwania energii. Utlenianie związków organicznych lub nieorganicznych (donory elektronów) sprzężone z redukcją tlenu cząsteczkowego (O_2) jest procesem oddychania tlenowego i wiąże się z powstawaniem wody. Z kolei w oddychaniu beztlenowym utlenianie donorów elektronów jest połączone z redukcją innych niż tlen akceptorów elektronów, w wyniku czego powstają inne produkty końcowe.

Zarówno mikrobiologiczne utlenianie arseninów jak i beztlenowe procesy oddychania arsenianowe znacząco wpływają na obieg biogeochemiczny arsenu. W pierwszej części tego rozdziału zostały umówione mikroorganizmy, które wykorzystują arseniany jako ostateczne akceptory elektronów, zaś w drugiej omówiono bakterie i archeony utleniające arseniny.

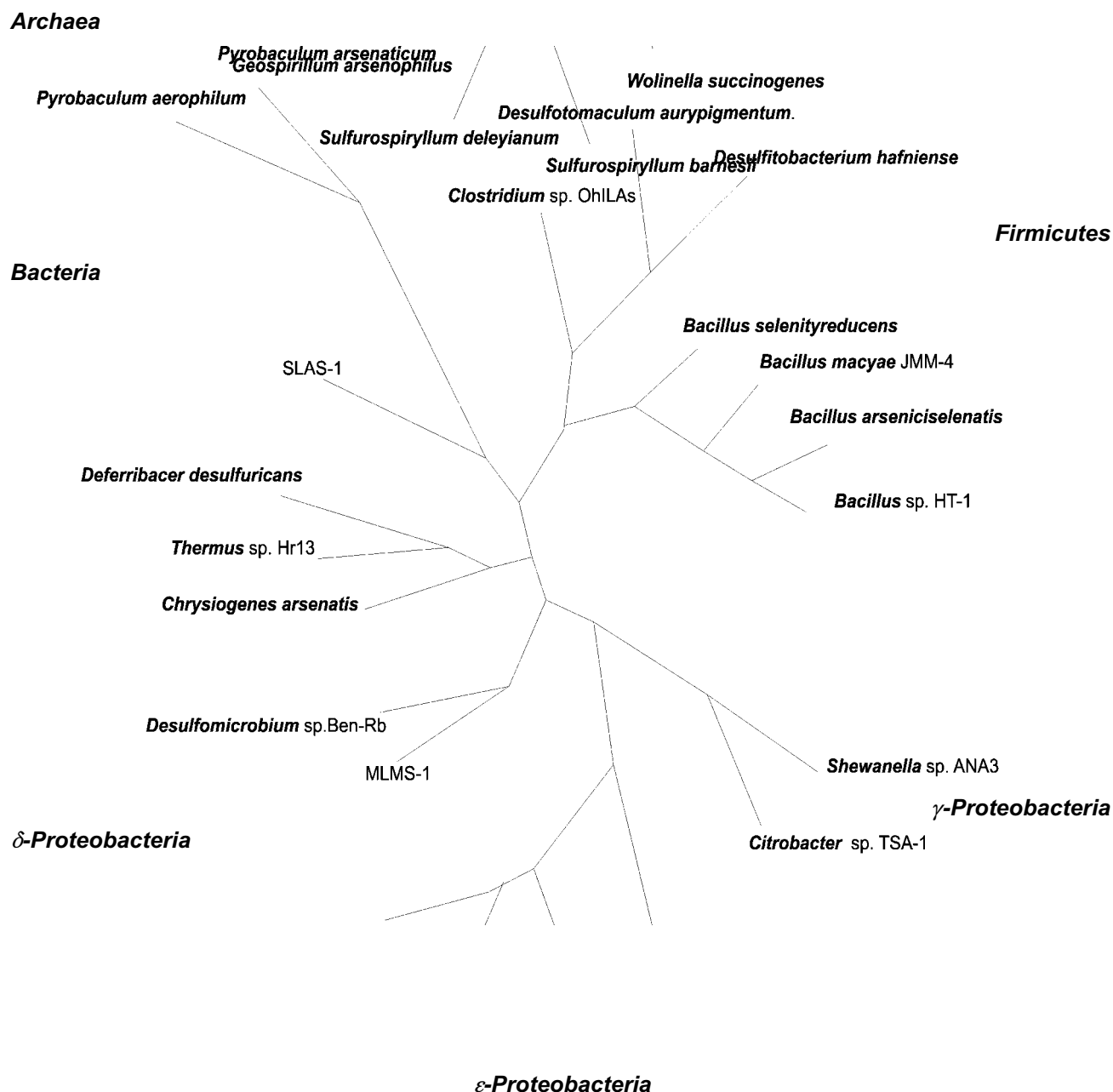
4.1. Dysymilacyjna redukcja arsenianów

Bakteryjny proces redukcji arsenianów do arseninów może towarzyszyć utlenianiu substratów organicznych lub wodoru, a wynikiem tego sprzężenia jest synteza ATP. Cały proces utleniania związków organicznych, w połączeniu z redukcją As(V) do As(III), jest korzystny energetycznie ze względu na powstający potencjał redoks As(V)/As(III), który wynosi + 135 mV.

Obecnie znanych jest około 30 organizmów prokariotycznych zdolnych do dysymilacyjnej redukcji arsenianów. Wśród nich są beztlenowce z różnych grup *Bacteria* i *Archaea*. Ponad 20 gatunków mikroorganizmów oddychających arsenianami (redukcujących arseniany) zostało wyizolowanych w postaci czystych kultur i sklasyfikowanych do następujących typów prokariotów: *Proteobacteria* (γ , δ i ϵ), *Firmicutes*, „Deinococcus-Thermus”, *Chrysiogenetes* oraz do *Crenarchaeota* [48]. Zróżnicowanie filogenetyczne mikroorganizmów prokariotycznych zdolnych do dysymilacyjnej redukcji arsenianów przedstawia rys. 2.

Mikroorganizmy zdolne do oddychania arsenianowego były izolowane z różnych środowisk w tym: z osadów słodkowodnych, ujść rzek, jezior, gorących źródeł, kopalni złota [47], z podpowierzchniowych formacji wodonośnych [55], z otworów termicznych w skorupie ziemskiej na dnie oceanu [68] oraz przewodu pokarmowego zwierząt [28]. Wśród mikroorganizmów wykorzystujących arseniany jako końcowe akceptory elektronów znajdują się także ekstremofile przystosowane do wysokich temperatur, pH czy zasolenia [26, 29, 67].

Pierwszymi opisanymi bakteriami zdolnymi do oddychania arsenianowego były dwa blisko spokrewnione gatunki należące do ϵ -*Proteobacteria*: *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 i *S. barnesii* SES-3 [1, 35, 65]. Szczep *S. arsenophilum* MIT-13 został wyizolowany z zanieczyszczonych arsenem osadów zlewiska Aberjona w USA [1]. Bakteria ta utlenia mleczan do CO_2 , jednocześnie redukując As(V) do As(III), dzięki czemu uzyskuje energię potrzebną do wzrostu. *S. arsenophilum* może również wykorzystywać: H_2 i octan, lub pirogronian jako alternatywne donory elektronów, oraz azotany i fumarany jako akceptory elektronów. Z kolei szczep *S. barnesii* SES-3 został wyizolowany z bogatych w związki selenu bagien we wschodniej Nowadzie (USA). Szczep SES-3 może wykorzystywać octan, pirogronian, mleczan i wodór jako donory elektronów, a jako akceptor elektronów oprócz arsenianów może wykorzystywać: fumarany, Fe(III), tiosiarczan, siarkę elementarną, azotany, DMSO i inne [66]. Bardzo interesującym przykładem jest także szczep Gram-dodatniej bakterii, *Desulfotomaculum auripigmentum* OREX-4, wyizolowanej ze słodkowodnych osadów jeziora Upper Mystic w Winchester, w USA [43]. Utle-



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne mikroorganizmów prokariotycznych zdolnych do dysymilacyjnej redukcji arsenianów. Pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy genami 16S rRNA wyznaczono metodą największej parsymonii z metodą nieparametryczną bootstrap.

nia on: H_2 , H_2 i octan, maślan, pirogronian, mleczan, jabłczan, glicerol i etanol, wykorzystując: siarczany, siarczyny, tiosiarczany, fumaran i przede wszystkim arseniany jako akceptory elektronów.

Pierwszą oczyszczoną i scharakteryzowaną reduktazą odpowiedzialną za dysymilacyjną redukcję $As(V)$ był enzym wyizolowany z *Chrysiogenes arsenatis* [35]. Reduktaza tej bakterii jest peryplazmatycznym molibdoenzymem należącym do rodziny reduktaz DMSO. Składa się z dwóch podjednostek: większej ArrA (87 kD) zawierającej centrum żelazo-siarkowe [4Fe-4S], oraz mniejszej ArrB (29 kD) zawierającej zgrupowanie żelazo-siarkowe [Fe-S] [33]. Równie

dobrze została scharakteryzowana reduktaza arsenianowa gramodatniej, haloalkalofilnej bakterii *Bacillus selenityreducens*. Wykazuje ona duże podobieństwo, na poziomie sekwencji nukleotydowej (50% podobieństwa) oraz na poziomie aminokwasowym (obie podjednostki ArrA i ArrB wykazują 85% podobieństwa), do reduktazy *C. arsenatis*. Niezwykle interesująca jest także Gram-ujemna bakteria z rodzaju *Shewanella*. Na podstawie przeprowadzonej analizy *in silico* wykazano, że szczep *Shewanella* ANA-3 posiada w swoim genomie operon *ars* (kodujący reduktazę cytoplazmatyczną) oraz geny *arrA* i *arrB*, kodujące dysymilacyjną reduktazę arsenianową (zlokalizowaną

w błonie komórkowej). Geny te kodują odpowiednio: (i) potencjalne białko ArrA, zawierające motyw żelazo-siarkowy i molibdenowy kofaktor piranopterynowy oraz (ii) potencjalne białko ArrB, zawierające trzy [4Fe-4s] oraz jedno [3Fe-4S] zgrupowania żelazo-siarkowe [56]. Homologi operonu *arr* zostały także zidentyfikowane w genomach *Desulfofitobacterium hafniense* [45], *Wolinella succinogenes* [28], *Desulfosporosinus* sp. Y5 [51].

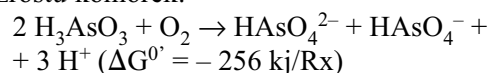
4.2. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów

Chemiczne utlenianie As(III) do As(V) w obecności samego tlenu jest procesem bardzo powolnym [17]. Aby zwiększyć szybkość reakcji utleniania, należy zastosować odpowiedni katalizator [33]. Skutecznymi utleniaczami chemicznymi są: wolny chlor (Cl₂), podchloryn, ozon czy nadmanganian. Ze względu na występowanie skutków ubocznych (utlenianie innych związków w środowisku, powstawanie produktów ubocznych oraz pozostałości po utleniaczach), wymienione wyżej chemiczne utleniacze nie są w zasadzie stosowane w środowisku naturalnym. Alternatywą do chemicznego utleniania As(III) w środowisku jest zastosowanie naturalnych katalizatorów biologicznych.

Większość arseninów występujących w środowisku jest utleniana z udziałem mikroorganizmów [69]. Pierwsze doniesienia o mikrobiologicznym utlenianiu arsenu pochodzą z roku 1918, kiedy to Green wyizolował i opisał szczep *Achromobacter* zdolny do utleniania arseninów do arsenianów [25]. Od tego czasu wyizolowano i scharakteryzowano wiele gatunków z różnych grup *Bacteria* i *Archaea* zdolnych do utleniania As(III) [42]. Wśród bakterii zdolnych do utleniania arseninów większość stanowią chemoorganoheterotrofy, które do wzrostu wymagają organicznego źródła węgla. Należą do nich: α , β i γ *Proteobakterie*, bakterie z grupy „Deinococcus-Thermus” oraz archeony z typu *Crenarchaeota*. Znane są również bakterie utleniające arseniny zdolne do wzrostu chemolitoautotroficznego. Do chemolitoautotroficznych bakterii arsenowych możemy zaliczyć sześć szczepów należących do α -*Proteobacteria*: Ben-5, NT-2, NT-3, NT-4, Nt-25 i NT-26 [57], dwa do γ -*proteobacteria* – szczep MHLE-1 [46] oraz *Pseudomonas arsenitoxidans* [31], oraz dwa szczepy zaliczone do β -*Proteobacteria*: *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 [39] oraz *Thiomonas arsenivorans* b6^T [5]. Zróżnicowanie filogenetyczne bakterii utleniających arseniny przedstawia rys. 3.

W przypadku bakterii heterotroficznych utlenianie arseninów jest głównie mechanizmem detoksykacji, polegającym na transformacji As(III) do mniej toksycznej formy As(V). Przedstawiona niżej reakcja utleniania arseninów przez bakterie heterotroficzne, pomimo że jest reakcją egzoergiczną, nie jest wyko-

rzystywana do zdobywania energii potrzebnej do wzrostu komórek:

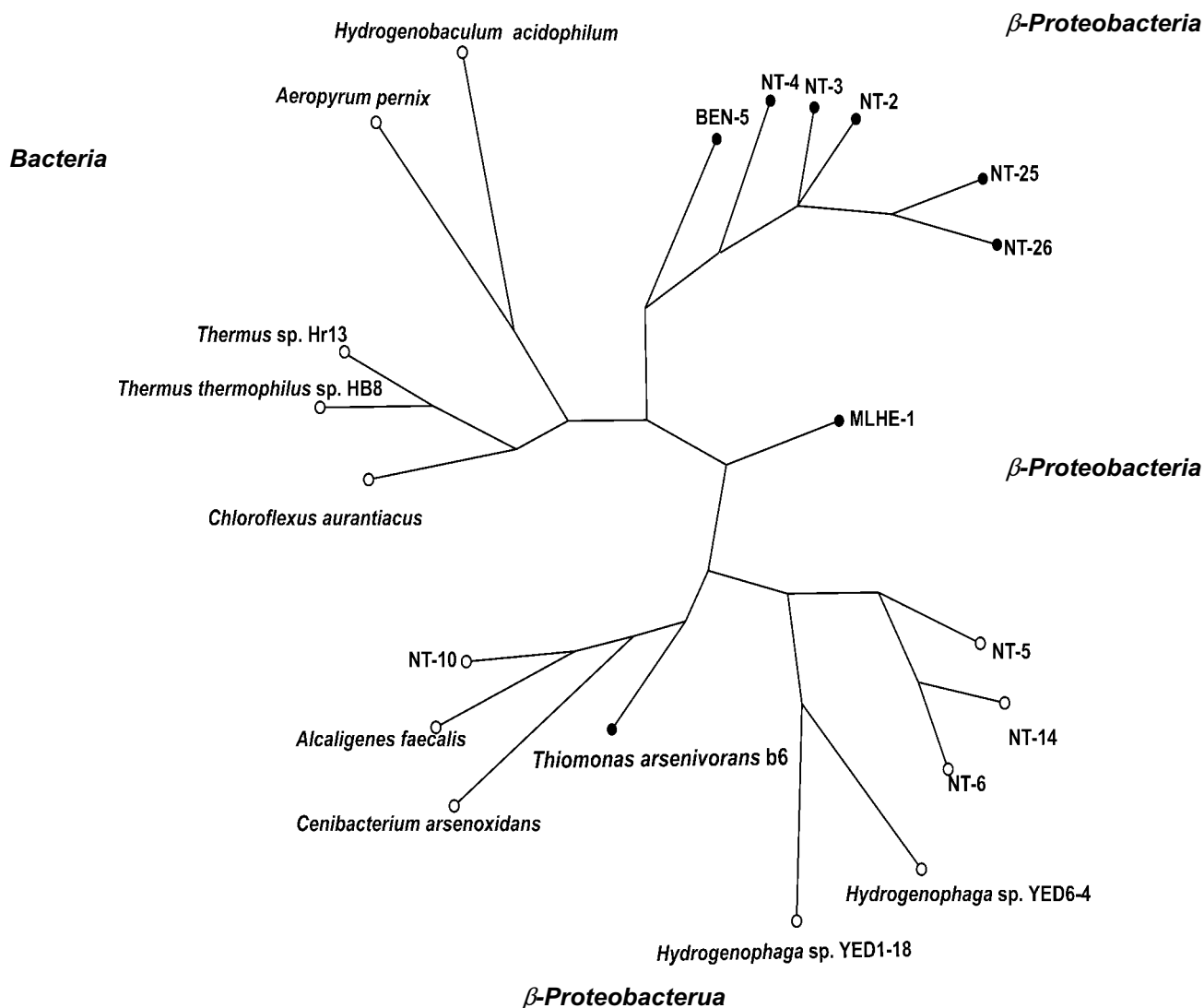


Zupełnie inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku bakterii chemolitoautotroficznych. Utlenianie arseninów, pełniących funkcję donora elektronów, jest sprzężone z łańcuchem transportu elektronów i z redukcją tlenu lub azotanów oraz wiąże się z pozyskaniem energii do wiązania CO₂ i wzrostu komórek.

Ze wszystkich bakterii utleniających arseniny do arsenianów najlepiej poznana jest heterotroficzna bakteria *Alcaligenes faecalis* [50]. Oksydaza arseninowa *A. faecalis* jest częścią składową peryplazmatycznego łańcucha transportu elektronów, w którego skład wchodzi także: azuryn, cytochrom *c* i oksydaza cytochromu *c*. Oksydaza arseninowa tej bakterii jest jednorodzeniowym molibdoenzymem, należącym do rodziny reduktaz DMSO podobnych do reduktaz arsenianowych (Arr) [2]. Jest ona heterodimerem, z dużą podjednostką katalityczną AsoA (~85 kD), zawierającą atom molibdenu połączony z dwiema pterynami i zgrupowaniem [3Fe-4S], oraz z mniejszą podjednostką AsoB (~14 kD) (najprawdopodobniej pełniącą funkcję przenośnika elektronów), zawierającą motyw Rieske'go [2Fe-2S] [2], który jest typowy dla molibdoenzymów.

Scharakteryzowana została również oksydaza arseninowa chemolitoautotroficznego szczepu *Rhizobium* sp. NT-26 [58] oraz heterotroficznego szczepu *Hydrogenophaga* sp. NT-14 [73]. Podobnie jak w przypadku *A. faecalis* są to enzymy peryplazmatyczne składające się z dwóch heterologicznych podjednostek. Większa podjednostka AroA (98 kD) wykazuje duże podobieństwo do molibdenowych podjednostek reduktaz DMSO, zaś mniejsza podjednostka AroB (14 kD) zawiera motyw żelazowo-siarkowy Rieske'go [58].

Utlenianie As(III) z udziałem „mikrobiologicznych katalizatorów” staje się podstawą powstających obecnie systemów bioremediacyjnych usuwających arseniny. W 2002 roku zespół badawczy Battaglia-Brunet opisał proces utleniania arseninów przez populację bakterii nazwanych CASO1, a następnie immobilizację powstałych arsenianów [As(V)] na silnych adsorbentach [4]. Bardzo skutecznym mikrobiologicznym utleniaczem okazał się także szczep *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 wyizolowany ze ścieków przemysłowych zanieczyszczonych arsenem [62]. Za interesowanie tematem bioremediacji arsenu ze środowiska i poszukiwania mikroorganizmów użytecznych w procesach detoksykacji środowisk skażonych As(III) doprowadziło do wyizolowania kilku nowych gatunków bakterii utleniających As(III). W 2001 roku Gihring i Banfield wyizolowali z gorących źródeł Growler Hot Spring w północnej Kalifornii w USA bardzo interesujący, termofilny szczep *Thermus*



Rys. 3. Drzewo filogenetyczne mikroorganizmów prokariotycznych utleniających arseniny

Pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy genami 16S rRNA wyznaczono metodą największej parsymonii z metodą nieparametryczną bootstrap.

○ – zaznaczono bakterie heterotroficzne, natomiast ● – zaznaczono bakterie chemolitoautotroficzne.

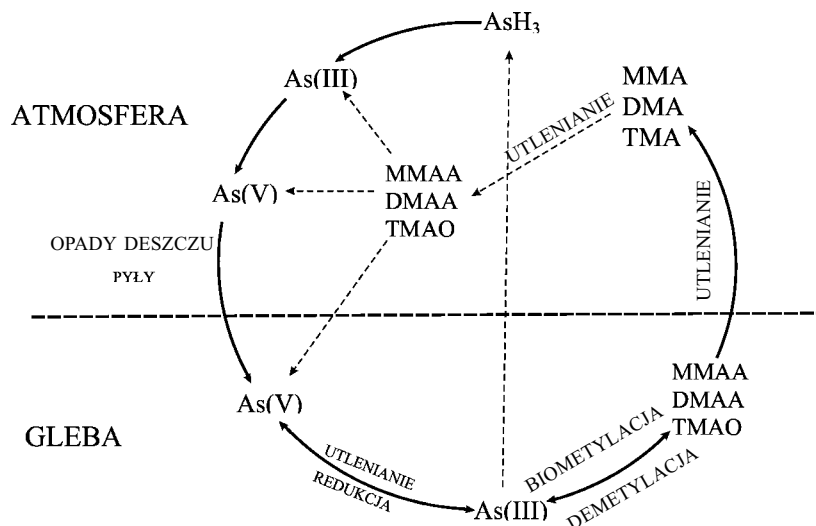
HR13 [26]. W warunkach tlenowych utlenia on As(III) w celach detoksykacji, nie wykorzystując powstałej energii. Natomiast w warunkach beztlenowych w obecności mleczanu wykorzystuje As(V) jako końcowy akceptor elektronów. Równie ciekawy jest chemolitoautotroficzny szczep MHLE-1, wyizolowany z Mono Lake w Kalifornii (USA) [46]. Może on wykorzystywać oprócz arseninów inne donory elektronów: siarczki lub gazowy wodór (H_2). Jest także zdolny do wzrostu heterotroficznego oraz potrafi wykorzystywać azotany jako końcowy akceptor elektronów [46].

5. Biogeochemiczny obieg arsenu

Mikroorganizmy pełnią istotną rolę w wielu reakcjach geochemicznych, które mają pośredni lub bezpośredni wpływ na specjację arsenu w środowisku. Nieorganiczne formy arsenu, arseniny [As(III)] i arse-

niany [As(V)], mogą być odpowiednio utleniane bądź zredukowane w zależności od aktywności mikroorganizmów. Arsen nieorganiczny ulega także metylacji i wówczas mogą powstawać: kwas monometyloarsenowy (MMAA – monomethylarsonic acid), kwas dimetyloarsenawy (DMAA – dimethylarsinic acid) oraz tlenek trójmetyloarsenu (TMAO – trimethyl arsine oxide) [71]. Niektóre mikroorganizmy są także zdolne do demetylacji organicznych form arsenu do związków nieorganicznych [63]. Rozpuszczalne związki arsenu mogą być przekształcone przez mikroorganizmy w gazowe arsenki. As(V) i As(III) mogą być zredukowane do arsenowodoru [AsH_3], MMAA do monometyloarsenu [MMA – monomethyl arsine], DMAA do dimetyloarsenu [DMA, dimethyl arsine] oraz TMAO do trójmetyloarsenu [TMA – trimethyl arsine] [19].

W zależności od typu środowiska oraz od mikroorganizmów w nim występujących możemy wyróżnić



Rys. 4. Schemat gazowego obiegu arsenu (wg Trupeinen i wsp., 2002 za zgodą wydawcy)

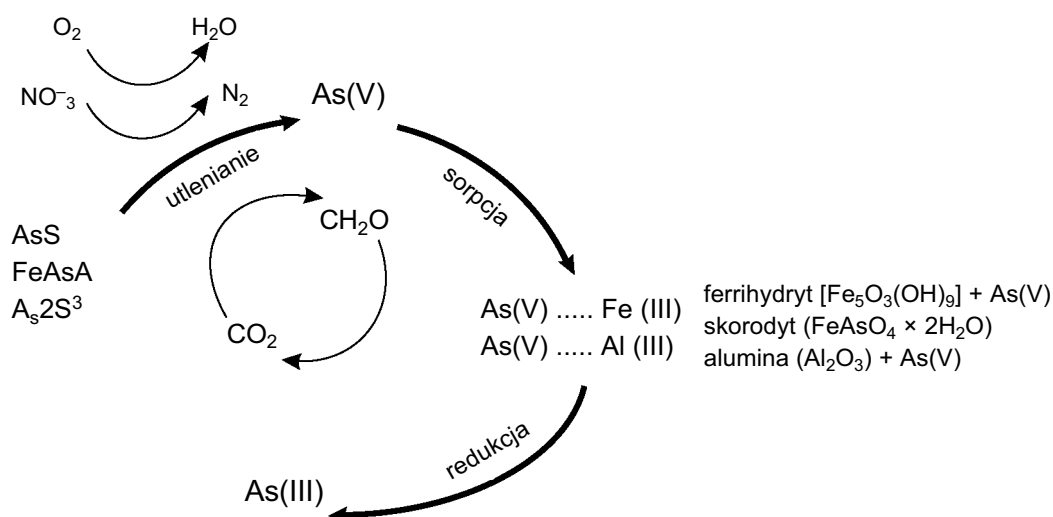
MMAA – kwas monometyloarsenowy (monomethylarsinic acid), DMAA – kwas dimetyloarsenawy (dimethylarsinic acid), TMAO – tlenek trójmetyloarsenku (trimethyl arsine oxide), MMA – monometylo arsenek (monomethyl arsine), DMA – dimetylo arsenek (dimethylarsine), TMA – trimetylo arsenek (trimethylarsine).

gazowy i sedymentacyjny obieg biogeochemiczny arsenu. O gazowym (globalnym) cyklu mówimy w przypadku, gdy arsen przechodzi w postać gazową i może przemieszczać się na większe odległości. Natomiast obieg sedymentacyjny ma miejsce, gdy arsen nie przechodzi w postać gazową, a jest jedynie osadzany w glebie lub na dnie oceanów lub zbiorników wodnych na skutek ciężenia, jest to więc cykl lokalny.

W 1977 roku Woolson [76] opisał „gazowe” przemiany arsenu występującego w glebie. As(V) jest redukowany do As(III), a następnie w wyniku kolejnych reakcji metylacji As(III) pojawia się trójmetylo-

arsenek (TMA). Powstałe arsenki mogą być przenoszone wraz z wiatrem na duże odległości lub w zależności od warunków środowiskowych mogą być od razu utleniane. Z kolei utlenianie metylowych pochodnych arsenu przywraca formy nieorganiczne, które wraz z deszczem lub jako pyły powracają do gleby [52]. Schemat gazowego obiegu arsenu przedstawia rys. 4.

Szlaki lokalnego (sedymentacyjnego) obiegu arsenu są bardziej złożone i ściśle zależą od warunków środowiska. W ostatnich latach zostało przedstawionych kilka teorii wyjaśniających mikrobiologiczną mobilizację arsenu w zbiornikach wodnych, osadach



Rys. 5. Schemat lokalnego obiegu arsenu wg Oremland i Stolz (2003)

Arsen pierwotnie występuje w zredukowanych minerałach takich jak: realgar (AsS), aurypigment (As₂S₃), czy arsenopiryty (FeAsS). Chemolitoautotroficzne bakterie zdolne do utleniania związków arsenu i asymilacji CO₂ do związków organicznych, „atakują” te minerały i uwalniają As(V) do środowiska. As(V) może być następnie adsorbowany na powierzchni utlenionych minerałów takich jak: ferrihydryt, skorodyt czy alumina. Jeżeli zostaną dostarczone związki organiczne (np. z pokładów torfu), to w warunkach beztlenowych As(V) może zostać zredukowany przez chemoorganoheterotrofy, a powstały As(III) jest uwolniony do środowiska, w związku z czym nie jest to obieg zamknięty

i glebie [49]. Wszystkie one opisują zależności biogeochemiczne pomiędzy mikroorganizmami, związkami arsenu, oraz innymi związkami nieorganicznymi (głównie żelaza, manganu oraz siarki). Ogólny schemat lokalnego obiegu arsenu przedstawiono na rys. 5. W środowiskach bogatych w związki żelaza następuje silna adsorpcja As(V) na Fe(III). Jeżeli w takich warunkach znajdzie się bakteria zdolna do redukcji Fe(III) do rozpuszczalnego Fe(II), następuje wówczas uwalnianie As(V) do środowiska. Taki mechanizm mobilizacji arsenu został opisany na przykładzie bakterii *Shewanella alga*. Jest ona zdolna do redukcji żelaza występującego w skorodycie ($\text{FeAsO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) [20]. Zupełnie inaczej jest w przypadku bakterii zdolnych do redukcji As(V). Wówczas do środowiska są uwalniane przede wszystkim jony As(III). W 1997 r. Ahmann i wsp. opisali proces uwalniania As(III) ze stałego arsenianu żelaza (FeAsO_4) za pośrednictwem *Sulfurospirillum arsenophilum* [1]. Bakterie zdolne do redukcji As(V) i Fe(III) uwalniają do środowiska As(III) oraz Fe(II). Należy do nich wspomniany wcześniej szczep *Sulfurospirillum barnesii* SES-3. Szczep SES-3, podobnie jak i inne bakterie zdolne do dysymilacyjnej redukcji arsenianów, może wykorzystywać różne akceptory elektronów. Może on uwalniać As(III) oraz Fe(II) z ferryhydrytu [$\text{Fe}_5\text{O}_3(\text{OH})_9$], na którym początkowo był wytrącony As(V).

6. Podsumowanie

W prawie wszystkich zsekwencjonowanych genomach bakterii i archeonów występują geny *ars* kodujące oporność na As(V) i/lub As(III). W bazie danych Entrez Nucleotide [76] obecnie znajduje się ponad 1000 sekwencji genu *arsC* (koduje cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową) oraz prawie 300 sekwencji genu *arsB* [koduje specyficzny transporter As(III)]. Ilość sekwencji genów *ars* zdeponowanych w bazach danych świadczy o ich rozpowszechnieniu u prokariotów oraz pośrednio o silnej toksyczności arsenu w środowisku.

W większości przypadków mikroorganizmy wykształciły tylko mechanizmy usuwające arsen poza komórkę. Mikroorganizmy redukujące As(V) uwalniają do środowiska bardziej toksyczne formy As(III), tym samym zwiększając stopień jego zanieczyszczenia. Z kolei bakterie utleniające arseniny mogą być wykorzystane w procesach bioremediacji wód pitnych skażonych arsenem. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów [As(III)], a następnie adsorpcja powstałych arsenianów [As(V)] na silnych adsorbentach [np. Fe(III)] może w przyszłości stać się wydajnym sposobem usuwania arsenu. Oprócz bakterii w systemach bioremediacyjnych próbuje się także wykorzystać rośliny.

Bakteryjny gen *arsC* kodujący cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową oraz gen kodujący enzym odpowiedzialny za nadprodukcję glutationu u roślin, zostały sklonowane w *Arabidopsis thaliana* [24]. Taka roślina transgeniczna jest oporna na bardzo duże stężenia As(V) i ma zdolność do odkładania przekształconego arsenu w przestrzeniach międzykomórkowych.

Obecnie prowadzone są także badania środowiskowe niezwiązane z technikami hodowli mikroorganizmów (z dziedziny tzw. metagenomiki), które mają na celu poznanie genów oraz białek związanych z metabolizmem arsenu. Jej największym osiągnięciem jest zidentyfikowanie ponad 160 różnych genów *aroA*, kodujących oksydazę arseninową. Ze skażonych arsenem gleb, osadów oraz gorących źródeł w USA i Australii wyizolowano DNA, na matrycy, którego zamplifikowano bakteryjne geny *aroA*. Zamplifikowane geny sklonowano i zsekwencjonowano. Z pobranych próbek wyizolowano ponadto RNA, a następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję (RT-PCR). Okazało się, że ekspresja genów *aroA* zachodzi podczas utleniania arseninów bezpośrednio w środowisku oraz w warunkach laboratoryjnych [32]. Uzyskane wyniki (160 różnych genów *aroA*) sugerują, że geny oksydazy arseninowej są rozpowszechnione wśród bakterii i ogrywiają istotną rolę w biogeochemicznym cyklu arsenu.

Podsumowując warto podkreślić rolę badań nad mikrobiologicznym metabolizmem arsenu. Poznanie i zrozumienie mikrobiologicznych mechanizmów transformacji arsenu być może pozwoli na skonstruowanie odpowiednich narzędzi biotechnologicznych umożliwiających efektywne oczyszczanie środowisk skażonych arsenem.

Piśmiennictwo

1. Ahmann D., Krumholz L.R., Hemond H.F., Lovley D.R., Morel F.M.: Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2923–2930 (1997)
2. Anderson G.L., Williams J., Hille R.: The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **267**, 23674–23682 (1992)
3. Astolfi E., Maccagno A., Garcia Fernandez J.C., Vaccaro R., Stimola R.: Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* **3**, 133–143 (1981)
4. Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M., Baranger P.: An arsenic (III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 1–12 (2002)
5. Battaglia-Brunet F., Joulian C., Garrido F., Dictor M.C., Morin D., Coupland K., Barrie Johnson D., Hallberg K.B., Baranger P.: Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**, 99–108 (2006)

6. Bednar A.J., Garbarino J.R., Ranville J.F., Wildeman T.R.: Presence of organoarsenicals used in cotton production in agricultural water and soil of the southern United States. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7340–7344 (2002)
7. Bentley R., Chasteen T.G.: Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 250–274 (2002)
8. Biswas B.K., Dhar R. K. ; Samanta G. Mandal B. Chakraborti D. Faruk I.Kazi Saiful Islam ; Moniruzzaman Chowdhury M. Islam A. i Roy S.: Detailed study report of Samta, one of the arsenic-affected villages of Jessore District, Bangladesh. *Curr. Sci.* **74**, 134–145 (1998)
9. Borgono J.M., Vicent P., Venturino H.: Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: Epidemiological and clinical study before and after installation of a treatment plant. *Environ. Health Perspect.* **19**, 103–105 (1977)
10. Budavari S., O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E.: The Merck index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., 2001 s. 440, 462
11. Carapella S.C. Arsenic and arsenic alloys. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, wyd. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. New York, NY: John Wiley and Sons, **3**, 624–633 (1992)
12. Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B.P.: The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* **177**, 981–986 (1995)
13. Cebrian M.E., Albores A., Aguilar M., Blakely E.: Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.* **2**, 121–133 (1983)
14. Cervantes C., Ji G., Ramirez J.L., Silver S.: Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 355–367 (1994)
15. Challenger F.: Biological methylation. *Chem. Rev.* **36**, 315–361 (1945)
16. Chen Y.C., Su H.J., Guo Y.L., Hsueh Y.M., Smith T.J., Ryan L.M., Lee M.S., Christiani D.C.: Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan. *Cancer Causes Control*, **14**, 303–310 (2003)
17. Cherry J.A., Shaikh A.U., Tallman D.E., Nicholson R.V.: Arsenic species as an indicator of redox conditions in groundwater. *J. Hydrol.* **43**, 373–392 (1979)
18. Cox D.P., Alexander M.: Production of trimethylarsine gas from various arsenic compounds by three sewage fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **9**, 84–88 (1973)
19. Cullen W.R., Reimer K.J.: Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* **89**, 713–764 (1989)
20. Cummings D.E., Caccavo F.J., Fendorf S., Rosenweig R.F.: Arsenic mobilization by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 723–729 (1999)
21. Da D., Chatterjee A., Mandal B.K., Gautam S., Chakraborti D., Chanda B.: Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst*, **120**, 917–924 (2005)
22. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.html>. (Wrzesień 2005)(online).
23. De Sastre M.R., Varillas A., Kirschbaum P.: Arsenic content in water in the northwest area of Argentina. Arsenic in the environment and its incidence on health (International seminar proceedings), Universidad de Chile, Santiago. pp. 91–99 (1992)
24. Dhanker O.P., Li Y., Rosen B.P., Shi J., Salt D., Senecoff J.F., Sashti N.A., Meagher R.B.: Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnol.* **20**, 1140–1145 (2002)
25. Green H.H.: Description of a bacterium that oxidizes arsenite to arsenate, and one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *S. African. J. Sci.* **14**, 465–467 (1918)
26. Gihring T.M., Druschel G.K., McCleskey R.B., Hamers R.J., Banfield J.F.: Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 3857–3862 (2001)
27. Gladysheva T.B., Oden K.L., Rosen B.P.: Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry*, **33**, 7288–7293 (1994)
28. Herbel M.J., Switzer Bluma J., Hoefta S.E., Cohen S.M., Arnold L.L., Lisack J., Stolz J.F, Oremland R.S.: Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 59–67 (2002)
29. Huber R.M., Sacher M., Vollmann A., Huber H., Rose D.: Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. *Appl. Microbiol.* **23**, 305–314 (2000)
30. Huysmans K.D, Frankenberger W.T.: Evolution of trimethylarsine by a *Penicillium* sp. isolated from agricultural evaporation pond water. *Sci. Total Environ.* **105**, 13–28 (1991)
31. Ilyaletdinov A.N., Abdrashitova S.A.: Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologiya*, **50**, 197–204 (1981)
32. Inskeep W., Macur R., Hamamura N., Masur D., Taylor W.P., Warelow T.P., Ward S.A., Santini J.M.: Bacterial arsenite oxidase genes detected in soil, Sediment and Geothermal Environments. The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings (November 12–16, 2006)
33. Jekel M.R.: Removal of arsenic in drinking water treatment. In: Arsenic in environment, part I: Cycling and Characterization, ed. Nriagu, J.O. pp. 119–132. New York NY: John Wiley & Sons 1994
34. Krafft T., Macy J.M.: Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 647–653 (1998)
35. Laverman A.M., Blum J.S., Schaefer J.K., Phillips E., Lovley D.R., Oremland R.S.: Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3556–3561 (1995)
36. Lis J., Pasieczna A.: Atlas geochemiczny Polski 1:2 500 000. Państw. Inst. Geol. Warszawa, 34 s. 74 (1995)
37. McBride B.C., Wolfe R.S.: Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. *Biochemistry*, **10**, 4312–4317 (1971)
38. Mukhopadhyay R., Rosen B.P.: Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ. Health Perspect.* **110** (Suppl 5), 745–748 (2002)
39. Muller D., Ličvremont D., Simeonova D.D., Hubert J.C., Lett M.C.: Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant β -Proteobacterium. *J. Bacteriol.* **185**, 135–141 (2003)
40. National Research Council, Arsenic in Drinking Water, National Academy Press, Washington, DC, 1999
41. Neff J.M.: Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 917–927 (1997)

42. Newman D.K., Ahmann D., Morel F.M.: A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiology*, **15**, 255–268 (1998)
43. Newman D.K., Beveridge T.J., Morel F.M. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2022–2088 (1997)
44. Nicolli H.B., Suriano J.M., Gomez Peral M.A., Ferpozzi L.H., Baleani O.A.: Groundwater contamination with arsenic and other trace elements in an area of the Pampa province of Cordoba, Argentina. *Environ. Geol. Water Sci.* **14**, 3–16 (1989)
45. Niggenmeyer A., Spring S., Stackenbrandt E., Rosenzweig R.F.: Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: Implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5568–5580 (2001)
46. Oremland R.S., Hoelt S.E., Santini J.M., Bano N., Hollibaugh R.A., Hollibaugh J.T.: Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4795–802 (2002)
47. Oremland R. S., D. K. Newman, B. W. Wail, J. F. Stolz, in Environmental Chemistry of Arsenic, W. T. Frankenberger Jr., Ed. Dekker, New York, 2002, pp. 273–296.
48. Oremland R.S., The ecology of arsenic. *Science*, **300**, 939–944 (2003)
49. Oremland R.S., Stolz J.F.: Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.* **13**, 45–49 (2005)
50. Osborne F.H., Ehrlich H.L.: Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 295–305 (1976)
51. Perez-Jimenez J.R., De Fraia C., Young L.Y.: Arsenate respiratory reductase gene (*arrA*) for *Desulfosporosinus* sp. strain Y5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 825–829 (2005)
52. Pongratz R.: Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. *Sci. Total. Environ.* **224**, 133–141 (1998)
53. Reyes Sierra-Alvarez, Cortinas I., Yenal U., Field J.A.: Methanogenic inhibition by arsenic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5688–5691 (2004)
54. Rosen B.P.: Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**, 86–92 (2002)
55. Saikat S.Q., Selim A.M., Kessi J., Wehrli K.E., Hanselmann W.: www.unizh.ch/_microeco/uni/kurs/mikoek/results/project2/arsen.html (2001)
56. Saltikov C.W., Cifuentes A., Venkateswaren K., Newman D.K.: The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As (V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species, strain ANA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2800–2809 (2003)
57. Santini J.M., Sly L.I., Schnagl R.D., Macy J.M.: A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 92–97 (2000)
58. Santini J.M., vanden Hoven R.N.: Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* **186**, 1614–1619 (2004)
59. Silver S.: Bacterial interaction with mineral cations and anions: good ions and bad. In: Biomineralization and biological metal accumulation (Westbroek, P., de Jong, E.W., Eds.), pp. 439–457. D. Reidel, Dordrecht. 1983
60. Silver S., Phung L.T.: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789 (1996)
61. Silver S., Phung L.T.: A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 587–605 (2005)
62. Simeonova D.D., Micheva K., Muller D.A., Lagarde F., Lett M.C., Groudeva V.I., Lievreumont D.: Arsenite oxidation in batch reactors with alginate-immobilized ULPAs1 strain. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 441–6 (2005)
63. Sohrin Y., Matsui M., Kawashima M., Hojo M., Hasegawa H.: Arsenic biogeochemistry affected by eutrophication in Lake Biwa, Japan. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2712–2720 (1997)
64. Stolz J.F., Basu P., Santini J.M., Oremland R.S.: Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 107–130 (2006)
65. Stolz J.F., Ellis D.J., Switzer Blum J., Ahmann D., Oremland R.S.: *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov., *Sulfurospirillum arsenophilus* sp. nov., and the *Sulfurospirillum* clade in the Epsilon Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1177–1180 (1999)
66. Stolz J.F., Oremland R.S.: Bacterial respiration of selenium and arsenic. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 615–627 (1999)
67. Switzer Blum J., Bindi A.B., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S.: *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* **171**, 19–30 (1998).
68. Takai K., Kobayashi H., Nealson K.H., Horikoshi K.: *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 839–846 (2003)
69. Tamaki S., Frankenberger W.T.: Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **124**, 79–110 (1992)
70. Tisa L.S., Rosen B.P.: Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 190–194 (1990)
71. Turpeinen R., Panssar-Kallio M., Kairsalo T.: Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. *Sci. Total. Environ.* **285**, 133–145 (2002)
72. Valentine J.L.: Chapter 14 – Review of health assessments for US/Canada populations exposed to arsenic in drinking water. In: Chappell WR, Abernathy CO & Cothorn CR eds. Arsenic – Exposure and health. Northwood, UK, Science and Technology Letters, pp 139–152 (1994)
73. vanden Hoven R.N., Santini J.M.: Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1656**, 148–155 (2004)
74. Wedepohl K.H.: The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals. Metals in natural raw materials. Natural resources. In: Merian E, ed. Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance. New York, NY: VCH, s. 3–17, 1991
75. Wong P.T.S., Chau Y.K., Luxon L., Bengert G.A. Methylation of arsenic in the aquatic environment. In: Hemphill DD ed. Trace substances in environmental health. Proceedings of the University of Missouri's 11th Annual Conference, 7–9 June 1977, Columbia, MO, University of Missouri, pp. 100–106, 1977
76. Woolson EA. Fate of arsenicals in different environmental substrates. *Environ. Health. Perspect.* **19**, 73–81, (1977)
77. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Limits&DB=Nucleotide) Limits&DB=Nucleotide

Spis treści

Mirosław Kańtoch (1928–2007)	187
M. Łuczkiwicz, M.J. Flaga – Gorączka krwotoczna Ebola. Immunologiczne i molekularne mechanizmy patogenezy, diagnostyka, eksperymentalne metody leczenia i uodparniania	189
T. Dzieciatkowski, A. Tomaszewska, A. Majewska, M. Łuczak – Zakażenia ludzkim parwowirusem B19	203
T. Dzieciatkowski, A. Rola, A. Majewska, M. Solarska, M. Łuczak – Leki stosowane w leczeniu zakażeń herpeswirusami ludzi	211
A.M. Łasica, A. Staroń, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Charakterystyka białek Dsb organizmów prokariotycznych	223
M. Juda, E. Dadas, A. Malm – Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii	237
A. Cisowska, D. Tichaczek-Goska, W. Goska – Aktywność przeciwważająca ludzkiej lektyny wiążącej mannozę (MBL)	249
M. Zmudziński, E. Gospodarek – Mechanizmy oporności pałeczek <i>Acinetobacter</i> spp. na antybiotyki β -laktamowe	263
Ł. Drewniak, A. Skłodowska – Rola bakterii w biogeochemicznym cyklu arsenu ...	275

Contents

Mirosław Kańtoch (1928–2007)	186
M. Łuczkiwicz, M.J. Flaga – Ebola haemorrhagic fever. Immunological and molecular mechanisms of pathogenesis, diagnostics, experimental methods of therapy and vaccination	189
T. Dzieciatkowski, A. Tomaszewska, A. Majewska, M. Łuczak – Infections with human parvovirus B19	203
T. Dzieciatkowski, A. Rola, A. Majewska, M. Solarska, M. Łuczak – Drugs used in antiherpesviral therapy in humans	211
A.M. Łasica, A. Staroń, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Characterization of prokaryotic Dsb proteins	223
M. Juda, E. Dadas, A. Malm – Significance of two-component regulatory systems in pathogenicity and drug resistance of bacteria	237
A. Cisowska, D. Tichaczek-Goska, W. Goska – Anti-infectious activity of human mannose-binding lectin (MBL)	249
M. Zmudziński, E. Gospodarek – Mechanisms of resistance in to β -lactams <i>Acinetobacter</i> spp.	263
Ł. Drewniak, A. Skłodowska – The role of bacteria in biogeochemical cycle of arsenic	275

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 maszynopisu.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony maszynopisu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

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

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń

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 naukowcy instytutów badawczych, biotechnologów 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. Oczuki 3, tel. (0 22) 628 08 22.
