

Kwartalnik

**Tom 47**

**Zeszyt 1 • 2008**

CODEN:

PMKMAV 47 (1)

2008

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), ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN),  
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (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 = 3,43 (2007)

### Na okładce:

Koegzystencja grzybnia *Paecilomyces* sp. (żółta w centrum) z kolonią *Bacillus* sp.  
(w kształcie spletanego sznura) na płytce z agarem odżywczym.  
Coexistence of *Paecilomyces* sp. (yellowish one in the centre) and *Bacillus* sp.  
(rope-shaped) on an nutrient agar plate.  
Fot. dr Jerzy Piątkowski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych,  
Uniwersytet Wrocławski

*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 10 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

**Profesor dr hab. n. farm.  
Wanda Woźniak-Parnowska  
1928–2007**

Wanda Woźniak urodziła się 23.06.1928 r. w Warszawie-Goleźdinowie. W latach 1935–1941 uczęszczała do Publicznej Szkoły Powszechnej, a następnie przez 3 lata do Państwowego Gimnazjum im. Hoffmannowej w Warszawie, które w okresie wojny było tajną szkołą, występująca pod nazwą szkoły gospodarczej. Powstanie Warszawskie zastało ją w Otwocku. Po roku samodzielnej nauki, w 1945 zdała, kończący gimnazjum, egzamin z małej matury w Otwocku. Również w Otwocku, po nauce w liceum, zdała maturę w 1947 r. i w tym samym roku rozpoczęła studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie, uzyskując 31.12.1952 dyplom magistra farmacji.

Cztery lata później rozpoczęła studia humanistyczne na Wydziale Filologicznym Uniwersytetu Warszawskiego, uzyskując w 1962 absolutorium na Wydziale Filologii Polskiej.

W 1974 r. w Warszawie poślubiła Tadeusza Józefa Parnowskiego.

Pracę w Instytucie Leków, z którym związana była przez 50 lat, zaczynała jeszcze w okresie studiów – 07.04.1952 r. Przebyła kolejne etapy kariery pracownika naukowego, od asystenta (1952–1954), st. asystenta (1954–1960), przez adiunkta (1960–1973), docenta (1973–1984), aż do profesora (1984–2002). Pracę w Instytucie Leków rozpoczęła w Pracowni Mikrobiologicznego Badania Witamin Zakładu Badania Organopreparatów i Witamin, przekształconego następnie w Zakład Biochemii. W okresie 1962–1967 zatrudniona była w Zakładzie Farmakologii, gdzie od początku 1963 r. kierowała Pracownią Badań Mikrobiologicznych, a od 01.12.64 była kierownikiem Pracowni Chemioterapii Mikrobiologicznej. W 1967 r. została kierownikiem Samodzielnej Pracowni Kontroli Jałowości Płynów Iniekcyjnych i Infuzyjnych, zajmującej się kontrolą jałowości leków i materiałów medycznych. W związku z narastającą liczbą badań mikrobiologicznych oraz ich różnorodnością, w Instytucie Leków utworzono Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, którego kierownikiem była od 01.10.1975 do końca 1996 r. Jednocześnie w okresie 01.02.1984–11.04.1990 pełniła funkcję Zastępcy Dyrektora Instytutu Leków ds. kontroli jakości leków. Po odejściu na emeryturę z końcem 1999r, nadal zatrudniona była na pełnym etacie w Instytucie Leków, do 28.09.2002 r.

W swojej pracy zawodowej najpierw zajmowała się mikrobiologicznymi metodami oznaczania witamin i aminokwasów w lekach i materiale biologicznym.



Uzyskane wyniki stały się przedmiotem rozprawy doktorskiej pt: „Mikrobiologiczne badanie zawartości podstawowych aminokwasów w hydrolizatach ludzkiego osocza”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Edmunda Mikulaszka. Po zdaniu egzaminu z mikrobiologii i po obronie doktoratu, na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie, dnia 02.07.1962 otrzymała stopień doktora farmacji.

W Zakładzie Farmakologii Instytutu Leków zajmowała się pracami dotyczącymi badań jałowości. W roku 1966, kiedy Pracownia Mikrobiologii została przekształcona w Samodzielną Pracownię Mikrobiologii, zakres pracy związany z mikrobiologiczną analizą leków rozszerzył się o ocenę działania przeciwbakteryjnego związków o działaniu tuberkulostatycznym. Pani Profesor opracowała także metody mikrobiologiczne oznaczania aminokwasów, co pozwoliło na zastosowanie nowych metod w badaniach białek krwi w stanach fizjologicznych i patologicznych. Metody te wykorzystana w badaniu spektrum białek w przebiegu gruźlicy eksperymentalnej. Przez osiem miesięcy, w latach 1967–68, pracowała w Instytucie Pasteura, gdzie prowadziła badania składu aminokwasowego białek BCG. Prace te stały się podstawą rozprawy habilitacyjnej. Dnia 20.06.1969, na podstawie rozprawy pt: „Badania nad zmianami ilościowymi i jakościowymi białek osocza w gruźlicy doświadczalnej świnek morskich” i po kolokwium habilitacyjnym na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Krakowie uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk mikrobiologicznych, który został zatwierdzony w 1972 r.

Równoległe do badań naukowych, po powrocie ze stypendium we Francji, w 1968 r. rozpoczęła prace nad nowym w Polsce zagadnieniem – oceną czystości

mikrobiologicznej leków nieparenteralnych. Uzyskane wyniki były przedmiotem konferencji naukowej zorganizowanej w październiku 1969 r. w Instytucie Leków. W tym roku również rozpoczęła prace nad opracowaniem norm dotyczących badań mikrobiologicznych leków i materiałów medycznych dla „Compendium Medicamentorum” przygotowywanego w ramach RWPG.

Rozwinięciem tych zainteresowań była redakcja książki „Mikrobiologiczne metody badań leków i materiałów biologicznych” wydanej przez PZWL w 1973 r., w której była autorem wielu rozdziałów.

Zainteresowanie problemami mikrobiologii farmaceutycznej kontynuowane aż do końca pracy w Instytucie spowodowało, że Pani Profesor była bardzo cenionym fachowcem w tej dziedzinie.

Opublikowała ponad 100 prac naukowych związanych głównie z kontrolą mikrobiologicznej jakości produktów leczniczych i wyrobów medycznych, aseptycznym wytwarzaniem leków, badaniem aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków chemicznych, preparatów antyseptycznych i dezynfekcyjnych, badaniem skuteczności środków konserwujących a także walidacją procesów sterylizacji. Wielokrotnie brała udział w zjazdach krajowych i zagranicznych, wygłaszała referaty i prezentowała wyniki badań w postaci plakatów. Wygłaszała wykłady we Wszechnicy PAN oraz była autorką dwóch filmów edukacyjnych, brała kilkakrotnie udział w imprezach organizowanych przez Uniwersytet Warszawski i PAN w ramach Festiwalu Nauki. Była promotorem 2 prac doktorskich wykonanych w Instytucie Leków.

Brała udział w opracowaniu szeregu monografii mikrobiologicznych do V wydania Farmakopei Polskiej. Przez kilka lat była przewodniczącą podkomisji mikrobiologii w Komisji Farmakopei Polskiej. Ponadto, w ramach działalności dydaktycznej prowadzonej w Instytucie Leków oraz w Katedrze Farmacji Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, prowadziła szkolenia dotyczące metod mikrobiologicznych analizy leków oraz higieny procesu wytwarzania produktów leczniczych, dla pracowników przemysłu, laboratoriów kontrolnych i placówek naukowych. Wielokrotnie wizytowała zakłady przemysłu farmaceutycznego, uczestnicząc w rozwiązywaniu aktualnych problemów mikrobiologicznych.

Biegła znajomość języków francuskiego i angielskiego, a także niemieckiego oraz studia filologiczne pomagały jej w pracy naukowej i dydaktycznej.

Uchwałą Rady Państwa z 27.10.1983 nadano doc. Wandzie Woźniak-Parnowskiej tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego nauk farmaceutycznych, Minister Zdrowia i Opieki Społecznej Tadeusz Szlachowski powołał ją w dniu 01.02.1984 na stanowisko profesora nadzwyczajnego w Instytucie Leków.

Ponadto uzyskiwała specjalizację II<sup>o</sup> w zakresie mikrobiologii i serologii. Z początkiem 1983 r. powołana

została na stanowisko zastępcy, a po roku na stanowisko przewodniczącego Zespołu Specjalistycznego w dziedzinie farmacja na okres 3 lat.

Od 1970 roku była członkiem Zespołu Mikrobiologicznego Międzynarodowej Federacji Farmaceutycznej – FIP (Federation International of Pharmacy) i aktywnie uczestniczyła w jej pracach (w latach 90-tych jedno ze spotkań tego Zespołu FIP zorganizowała w Warszawie pod opieką Instytutu Leków). Współpraca naukowa i teoretyczna z FIP pozwoliła na szybkie docieranie do naszego kraju międzynarodowych opinii i osiągnięć naukowych dotyczących badań jałowości i czystości mikrobiologicznej leków oraz związanych z ograniczeniem niebezpieczeństwa tzw. zakażeń odlewkowych. Waga istniejącego problemu spowodowała, że Rada Naukowa przy Ministrze Zdrowia zleciła Pani Profesor opracowanie odpowiedniej monografii. Praca pt: „Mikrobiologiczne skażenie leków” została opublikowana w 1975 r. W tym samym roku Pani prof. W. Woźniak-Parnowska napisała książkę pt: „Konserwacja leków”.

Była podporucznikiem pomocniczej służby wojskowej kobiet i prowadziła sprawy wojskowo-obronne w Instytucie Leków. Brała udział w obradach komisji RWPG w kraju i za granicą.

Została odznaczona Srebrnym Krzyżem Zasługi (1976), odznaką „Za wzorową Pracę w Służbie Zdrowia” (1982), nagrodą specjalną II stopnia MZiOŚ „Za szczególne osiągnięcia w pracy na rzecz ochrony zdrowia i pomocy społecznej” oraz honorowym medalem im. Łukasiewicza, nadawanym osobom ze środowiska farmaceutycznego.

Pani prof. dr hab. Wanda Woźniak-Parnowska była aktywnym członkiem towarzystw naukowych: Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych, Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (przez dwie kadencje była Przewodniczącą Oddziału Warszawskiego PTM i w roku 1983 organizowała XX Zjazd PTM), Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (w latach 1996–1999 była Prezesem Oddziału Warszawskiego PTF).

Pod koniec swojej pracy w Instytucie Leków, w związku z jubileuszem 50-lecia Instytutu napisała ciekawą, bogato ilustrowaną książkę: „Instytut Leków 1951–2001 Dzieje – ludzie – dokonania”, wydaną w 2001 roku przez Instytut Leków. Równoległe przygotowała rozprawę: „Charakterystyka naukowego dorobku Instytutu Leków (1951–2002)”, opublikowaną w periodyku Instytutu Historii Nauki PAN *Analecta* w 2002 r.

Pani prof. dr hab. Wanda Woźniak-Parnowska zakończyła pracę w Instytucie Leków tuż przed jego przekształceniem w Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego (01.10 2002). Zmarła 26.12.2007 r. i została pochowana na Cmentarzu Komunalnym d. Wojskowym na Powązkach.

*Stefan Tyski*

Zakład Mikrobiologii i Antybiotyków  
Narodowy Instytut Leków

Dariusz Kmiecik, Szymon Dębicki

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego  
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, tel. (0-61) 8546516; faks (0-61) 8546510, e-mail: dkmiec@am.poznan.pl

Wpłynęło w styczniu 2008

1. Wstęp. 2. Budowa wirusa JC. 2.1. Kapsyd. 2.2. Genom. 2.3. Cykl replikacyjny. 3. Sposób zakażenia i zmienność JCV. 4. Rola JCV jako czynnika etiologicznego w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego i przewodu pokarmowego. 4.1. Udział JCV w postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii. 4.2. Mechanizm molekularny wpływu JCV na rozwój nowotworów. 4.2.1. Nowotwory przewodu pokarmowego. 4.2.2. Guzy mózgu. 5. Podsumowanie

#### Role of the JC virus in the pathogenesis of cancer diseases and disorders associated with compromised immunity

**Abstract:** JC virus is a common human virus, found by PCR analysis in the urine of about 40% of tested individuals. In case of serious immune deficiency, like AIDS, some cancers or after organ transplantation, JCV can infect and proliferate in neural tissue. It results in a demyelinating disease of the brain, progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). Recent reports have also pointed to a role of JCV in cancerogenesis, in which viral proteins, particularly large antigen T, are involved. It applies to different brain tumors and cancers of gastrointestinal tract, especially esophageal carcinomas, gastric cancers and colon rectal carcinomas. The aim of this article is to describe molecular mechanisms of the JCV-mediated oncogenesis.

1. Introduction. 2. JC virion structure. 2.1. Capsid. 2.2. Genome. 2.3. Replication cycle. 3. Infection mode and heterogeneity of JCV. 4. JCV as an etiological agent in diseases of central nervous system and gastrointestinal tract. 4.1. Role of JCV in progressive multifocal leukoencephalopathy. 4.2. Molecular mechanism of JCV influence on tumor development. 4.2.1. Cancers of gastrointestinal tract. 4.2.2. Brain tumors. 5. Conclusion

**Słowa kluczowe:** wirus JC, duży antygen T, guzy mózgu, nowotwory przewodu pokarmowego

**Key words:** JC virus, large antigen T, brain tumors, cancers of gastrointestinal tract

## 1. Wstęp

Wirus JC (JC virus, JCV) należy do rodzaju *Polyomavirus* znajdującego się w obrębie rodziny *Polyomaviridae* (wcześniej był klasyfikowany w rodzinie *Papovaviridae*). Materiał genetyczny cząsteczki wirusa stanowi dwuniciowy kolisty DNA wielkości ok. 5130 pz (par zasad) [30]. Jego naturalnym i jedynym gospodarzem jest człowiek [21]. JCV jest mało znanym wirusem, choć bardzo powszechnie występującym w populacji światowej. Obecność przeciwciał anti-JCV stwierdza się u ok. 90% osób na świecie [11]. Natomiast, według szacunków ekspertów ok. 40% ludzi to osoby zakażone nim, co oznacza, że w ich moczu znajduje się wirusowe DNA, wykrywalne metodą PCR [2]. Wirusa JC po raz pierwszy wyizolowano w 1970 r., od osoby chorej na postępującą wieloogniskową leukoencefalopatię (*progressive multifocal leukoencephalopathy* – PML), chorobę polegającą na demielinizacji ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [12]. W jądrach zakażonych komórek mikrogleju wykryto wiriony o budowie typowej dla poliomawirusa, którego nazwano od inicjałów pacjenta wirusem JC [12]. Okazało się później, że JCV jest czynnikiem etiologicznym PML [38]. Choć JCV jest szeroko rozpowszechniony wśród

ludzi, to nie jest patogenny dla większości z nich, wywołując jedynie przelotne zaburzenia układu moczowego u nielicznych osób. Wirus ten uaktywnia się dopiero w wyniku osłabienia układu immunologicznego, np. na skutek podawania leków immunosupresyjnych po przeszczepach organów [38]. U osób bez zaburzeń immunologicznych PML prawie się nie spotyka.

Celem tego artykułu jest ogólne przedstawienie wiedzy dotyczącej wirusa JC oraz jego związku z niektórymi schorzeniami, związanymi z osłabieniem układu immunologicznego oraz nowotworami przewodu pokarmowego i mózgu.

## 2. Budowa wirusa JC

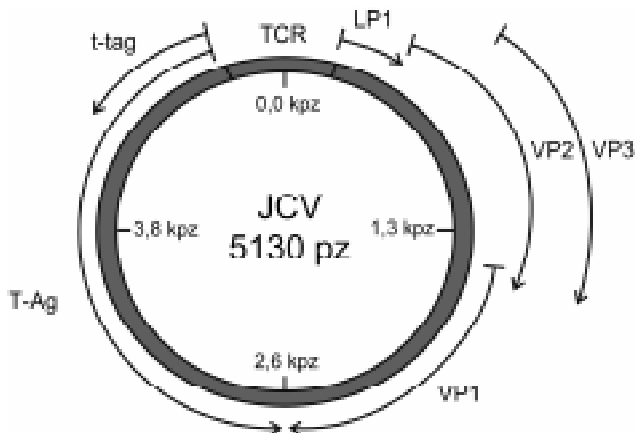
### 2.1. Kapsyd

Wirion JCV zawiera ikosaedralny kapsyd o średnicy 45–50 nm [34]. Kapsyd liczy 72 kapsomery zbudowane z trzech białek kodowanych przez genom wirusa: VP1, o długości 360 reszt aminokwasowych (360 cząsteczek tego białka przypada na wirion), VP2 o długości 350 reszt aminokwasowych (30–60 cząsteczek) i VP3 o długości ok. 230 reszt aminokwasowych (30–60 cząsteczek) [34].

## 2.2. Genom

Genom JCV stanowi dwuniciowy, superhelikalnie zwinięty, kolisty DNA o długości 5130 pz [30] (Rys. 1). Organizacja genomu wirusa JC jest bardzo konserwatywna i podobna do genomów innych poliowirusów: SV40 i BK [30]. Homologia między SV40 i JCV wynosi 69%, a pomiędzy genomami BK i JCV sięga 75% [30]. W genomie JCV można wyróżnić trzy regiony: tzw. wczesny i późny region kodujący oraz region regulatorowy (*transcriptional control region* – TCR) [30] (Rys. 1). Region TCR zawiera liczne, zachodzące na siebie sekwencje regulatorowe, a także miejsce początku replikacji (*ori*), wzmacniacze oraz wczesne i późne promotory, z których bezpośrednio zachodzi transkrypcja odpowiednich genów wczesnych i późnych [30]. W obrębie TCR znajdują się sekwencje, rozpoznawane przez niektóre komórkowe czynniki transkrypcyjne takie jak: c-Jun i c-Fos tworzące rodzinę AP-1 (*activating protein 1 family*) oraz czynnik NF-1X (*Nuclear factor 1X*) [56]. Bliskie sąsiedztwo miejsc wiązania obu czynników w promotorze JCV wskazuje na możliwość ich interakcji między sobą. Badania *in vitro* wykazały, że czynnik NF-1X wpływa na zwiększenie produkcji białek wirusowych [56]. Na wiązanie NF-1X oddziałują negatywnie c-Jun, który w ten sposób obniża produkcję białek wirusowych, a co zatem idzie, może regulować poziom aktywności wirusa JC [56].

Produkty wczesnego regionu kodującego, tzw. antygeny T, pojawiają się jako pierwsze w procesie transkrypcji zaraz po wnikięciu wirusa do jądra i jego od-



Rys. 1. Schemat genomu wirusa JC

Kolisty dwuniciowy DNA, o długości ok. 5130 pz, podzielony jest na dwa regiony. Wczesny region kodujący, obejmuje geny dla małego antygeny t (t-ag) oraz dużego antygeny T (T-Ag), wraz z jego formami powstającymi w wyniku alternatywnego składowania: T'(165), T'(136) i T'(135). Późny region kodujący zawiera gen białka pomocniczego agno-proteiny (LP1) oraz geny białek kapsydu VP1-3. Pomiędzy nimi znajduje się region regulatorowy (TCR), w którym znajduje się miejsce startu replikacji (*ori*), a także sekwencje promotorowe i regulatorowe dla wczesnego i późnego regionu kodującego. Numeracja zasad (podana w kbp) rozpoczyna się od miejsca *ori* i biegnie zgodnie z ruchem wskazówek zegara.

plaszczeniu, i biorą udział w stymulacji komórki gospodarza do wytwarzania enzymów potrzebnych do replikacji DNA komórkowego, przygotowując tym samym komórkę do replikacji wirusowego DNA [63]. Białka późnego regionu kodującego czyli białka kapsydu (*viral proteins 1-3*; VP1, VP2 i VP3) oraz agno-proteina powstają dopiero po replikacji wirusowego genomu i nie biorą bezpośredniego udziału w ekspresji informacji genetycznej wirusa [34].

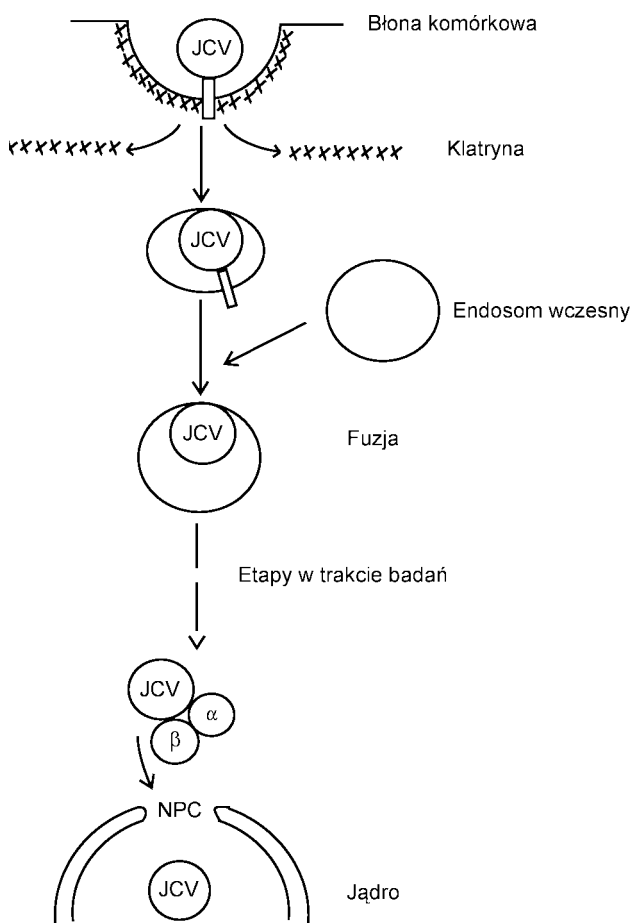
Wczesny prekursorowy mRNA wirusa JC podlega alternatywnemu składowaniu (*splicing*) do pięciu dojrzałych transkryptów, kodujących białka: duży antygen T (T-Ag), mały antygen t (t-ag), T'(165), T'(136) oraz T'(135) [51]. Wszystkie te białka posiadają jednakowe końce aminowe (N-końce) złożone z 81 reszt aminokwasowych. Poza tym każde białko charakteryzuje się własnym unikalnym końcem karboksylowym (C-końiec), z wyjątkiem T-Ag i T'(165), u których C-końce pokrywają się [51]. Obecność podobnych sekwencji między białkami wczesnymi wirusa JC sugeruje, że antygeny te wchodzi w interakcje między sobą, a funkcjonalną domeną, która odpowiada za te oddziaływania jest domena N-końcowa [51]. Najlepiej zbadanym białkiem wczesnym wirusa JC jest duży antygen T (T-Ag) [34]. Około 95% T-Ag jest zlokalizowane w jądrze komórki gospodarza [34]. Występuje tam w nukleoplazmie w formie wolnej lub zasocjowanej z chromatyną i macierzą jądrową [34]. Antygen T jest wieloczynnościowym białkiem, które poprzez bezpośrednie interakcje z czynnikami komórkowymi bierze udział w regulacji cyklu komórkowego i przetrwaniu komórki [66]. Wykazano, że czynniki c-Jun oraz c-Fos potrafią znacząco zmniejszyć replikację i transkrypcję genów JCV [41]. Wynika to m.in. z fizycznej interakcji pomiędzy c-Jun, a białkiem regulatorowym wirusa T-Ag [41]. Jak się wydaje, jest to jeden ze sposobów w jaki duży antygen T-Ag powoduje transregulację promotorów zarówno wirusowych, jak i komórkowych, której skutkiem są zmiany w ekspresji genów [66]. Wreszcie, T-Ag jest jedynym białkiem wirusowym wymaganym do replikacji własnego DNA, wiążąc się z nim i wykazując aktywność helikazy [3, 66]. Antygen T ulega modyfikacjom potranslacyjnym głównie przez fosforylację reszt seryny i treoniny, ale również przez o-glikozylację, acylację, adenylację, ADP-rybozylację [66]. Mały antygen t (t-ag) jest białkiem bogatym w cysteinę, zlokalizowanym głównie w jądrze komórkowym gospodarza, rzadziej w cytoplazmie. Posiada zdolność wiązania się z niektórymi białkami komórkowymi, czego efektem może być stymulacja wzrostu komórki [34]. Białka T'(135), T'(136), T'(165) są izoformami dużego antygeny T, które powstają w wyniku alternatywnego składowania prekursorowego wczesnego mRNA. Podobnie jak duży antygen T, mogą wiązać się z niektórymi białkami regulacyjnymi komórki, takimi jak:

p107 i p130, należącymi do rodziny pRB (więcej w dalszej części tekstu), upośledzając ich funkcje, i w konsekwencji doprowadzając do nowotworzenia [8].

Późny rejon kodujący wirusa JC zawiera geny agnoproteiny (inaczej białko LP1 – *leader protein 1*) oraz trzech białek kapsydu: VP1, VP2, VP3. Agnoproteina jest 71-aminokwasowym białkiem o masie cząsteczkowej 8 kD, produkowanym w późnej fazie cyklu replikacyjnego wirusa, jednakże nie stwierdza się jej występowania w wirionie [15, 26]. W komórkach można ją znaleźć głównie w cytoplazmie, szczególnie w rejonach okołojądrowych, podczas gdy w jądrze występuje w małych ilościach [15]. Podobną lokalizację obserwowano w komórkach transfekowanych plazmidami zawierającymi gen agnoproteiny [15]. Przypuszczalnie białko to pełni rolę regulatorową w replikacji i ekspresji genów wirusa, jak również w składaniu wirionów i ich rozprzestrzenianiu [15, 40]. Liczne badania pokazały również, że agnoproteina ma możliwość wiązania się do innych białek wirusowych (np. T-Ag), jak również do czynników komórkowych takich jak: p53 oraz Ku70 i Ku80, deregulując cykl komórkowy [14, 15]. Obecność samej agnoproteiny, bez innych białek wirusa JC, wpływa hamująco na wzrost komórek poprzez zatrzymanie ich głównie w fazie G2/M [14]. Obserwuje się wtedy również zmniejszoną aktywność cyklin A i B [14]. Dodatkowo, agnoproteina wywiera toksyczny wpływ na komórkę poprzez hamowanie i uniemożliwienie naprawy uszkodzonego DNA [15]. Pod jej wpływem zwiększa się w komórce liczba pofragmentowanych chromosomów oraz pojawiają się zgrupowania fragmentów jądra [15]. Rola agnoproteiny w hamowaniu procesu naprawy DNA polega na jej wiązaniu się do dwóch czynników, Ku70 i Ku80, biorących udział w tym procesie i inaktywacji ich [15]. Modułacja działania białek Ku70 i Ku80 może być jednym z ważnych czynników sterujących cyklem życiowym wirusa JC, a także przyczyną nowotworzenia [15]. W przypadku koinfekcji astrocytów ludzkich wirusami JCV i HIV-1, zaobserwowano spadek poziomu replikacji HIV-1, z równoczesnym niewielkim podniesieniem poziomu replikacji JCV [37]. Za efekt ten może być odpowiedzialna agnoproteina, gdyż eksperymenty wykazały, że wiąże się ona z białkiem Tat HIV-1 [37]. W ten sposób hamuje ona jego interakcję z sekwencją docelową RNA HIV-1, TAR, a także z cykliną T1, białkiem będącym podjednostką tzw. pozytywnego czynnika b elongacji transkrypcji (*positive transcription elongation factor b*, P-TEFb), z podjednostką p65 czynnika NF-kappaB oraz z czynnikiem Sp1 [37, 55]. W przypadku zaburzonej funkcji Tat, polimeraza RNA II nie przeprowadza wydajnej transkrypcji genów HIV-1 z miejsca startu tj. z LTR (*Long Terminal Repeat*) wirusa, sekwencji zawierającej miejsca wiązania różnych komórkowych czynników transkrypcyjnych [37, 55].

### 2.3. Cykl replikacyjny

W cyklu replikacyjnym JCV można wyróżnić dwie fazy: wczesną i późną. Faza wczesna obejmuje adsorpcję wirusów do komórki i trwa do rozpoczęcia replikacji wirusowego DNA [34]. W tym czasie cząsteczki wirusa łączą się z powierzchnią komórki, wykorzystując do tego celu reszty kwasu sjałowego obecne w receptorach glikoproteinowych [22, 31, 32]. Na podstawie badań z użyciem cząsteczek wirusopodobnych, tzw. VLP (*virus-like particles*), zawierających na swojej powierzchni tylko główne białko kapsydu VP1,



Rys. 2. Wejście wirusa JC do komórki

W adsorpcji JCV do komórki uczestniczą reszty kwasu sjałowego, będącego składnikiem glikoprotein powierzchniowych. Następnie dochodzi do połączenia z receptorem. Doniesiono, że taką rolę pełni receptor serotoninowy. W wyniku endocytozy zależnej od klatryny, białka, które uczestniczy w uformowaniu się pęcherzyka endosomalnego, wirus wchodzi do środka komórki. Jak się sądzi, JCV, podobnie jak i inne ligandy, przechodzi typową drogę, polegającą na skierowaniu do wczesnych endosomów, a potem podlega sortowaniu, decydującemu o tym, czy znajdzie się w endosomie powracającym na powierzchnię komórki czy też w endosomie późnym i/lub lizosomie. W przypadku wirusa JC, etapy te są nadal w trakcie badań. Po dotarciu w pobliżu jądra wirion opuszcza endosom i zostaje związany z importyną  $\alpha$ , która rozpoznaje sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) obecny na powierzchni białka kapsydu VP1. Importyna  $\alpha$  tworzy heterodimer z importyną  $\beta$ , która z kolei rozpoznaje kompleks porowy jądra (*nuclear pore complex*, NPC). W rezultacie wirion wnika przez ten kompleks do jądra, gdzie ulega odpłaszczeniu i dochodzi do transkrypcji genów wirusowych.

skonstruowano prawdopodobny mechanizm penetracji wirusa JC [52, 53] (Rys. 2). Po wnikięciu do komórki drogą endocytozy zależnej od białka komórkowego klatryny, cząsteczki wirusa zamknięte w endosomach ulegają przemieszczaniu w kierunku jądra komórkowego. Opuszczenie endosomów przez wiriony następuje dopiero przy zewnętrznej stronie błony jądrowej [52, 53]. Samo wejście wirusa JC do jądra następuje przez kompleks porowy jądra (*nuclear pore complex* – NPC) przy udziale importyn  $\alpha$  i  $\beta$  [52, 53]. Jest to możliwe gdyż importyna  $\alpha$  rozpoznaje sygnał lokalizacji jądrowej (*nuclear localization signal* – NLS) obecny w białku kapsydowym VP1 [52, 53] (Rys. 2). W jądrze komórkowym genom wirusowy ulega odplaszczeniu i zachodzi jego transkrypcja z użyciem polimerazy RNA II gospodarza, prowadząca do powstania mRNA wczesnych [63]. Na tych mRNA syntetyzowane są wirusowe białka wczesne – antygeny T, które stymulują komórkę gospodarza do wytwarzania enzymów potrzebnych do replikacji DNA komórkowego, przygotowując tym samym komórkę do replikacji DNA wirusowego [63]. Proces ten zachodzi dzięki zdolności antygeny T do aktywacji ekspresji genów komórkowych oraz własnych [63]. Geny wirusowe są aktywowane po związaniu się T-Ag z rejonem wzmacniacza transkrypcji promotora wirusowego. Antygen T wiąże się także z polimerazą DNA  $\alpha$  oraz z innymi białkami odpowiedzialnymi za regulację wzrostu komórki [62, 63].

Faza późna cyklu replikacyjnego wirusa JC rozpoczyna się wraz z inicjacją replikacji DNA wirusowego [34]. Jednakże trzeba zaznaczyć, że sam proces replikacji nie jest do końca poznany w przypadku wirusa JC, a przedstawiana wiedza w tym zakresie opiera się na badaniach nad innym, blisko spokrewnionym wirusem SV40. Replikacja zachodzi w jądrze komórki gospodarza i bierze w niej udział antygen T (T-Ag) oraz enzymy komórkowe [63]. Sześć cząsteczek antygeny T, dzięki jego zdolności do wiązania DNA i aktywności helikazowej, przyłącza się do DNA wirusa w miejscu startu replikacji i katalizuje rozplatanie nici DNA [3]. Po rozpleceniu nici DNA białko to tworzy kompleks z białkiem replikacyjnym A (RPA), tworząc kompleks preinicjujący replikację, do którego przyłącza się następnie  $\alpha$ -prymaza polimerazy DNA, przekształcając go w kompleks inicjacyjny [62]. Synteza DNA zachodzi w dwóch kierunkach wokół kolistego DNA wirusa. Przesuwanie się widełek replikacyjnych ułatwione jest dzięki aktywności helikazowej antygeny T [3]. W fazie późnej zachodzi również ekspresja genów późnych kodujących białka kapsydu wirusa, składanie cząsteczek wirusa w jądrze zakażonej komórki oraz uwolnienie wirusa z komórki [34]. Proces uwolnienia wirusa JC prowadzi do lizy komórek [20].

### 3. Sposób zakażenia i zmienność JCV

Dane serologiczne wskazują, że bezobjawowe infekcje JCV często zdarzają się u małych dzieci [65]. Po zakażeniu JCV utrzymuje się w komórkach gospodarza z reguły przez całe jego życie. Prawdopodobnie wirus JC dostaje się do organizmu człowieka drogą pokarmową (gdzie stwierdza się jego obecność) wraz z zanieczyszczoną wodą i żywnością [5]. Często wykrywany jest w migdałkach co sugeruje, że może to być początkowe miejsce jego infekcji [44]. Po wnikięciu do organizmu wirus JC pozostaje w tkance nerkowej, replikując się na relatywnie niskim poziomie i może być izolowany z moczu [7]. W nerkach JCV pozostaje w fazie utajonej, nie przechodząc pełnego cyklu replikacyjnego i tym samym nie doprowadza do lizy komórek [65]. Wirus JC może również uaktywnić się (tzw. aktywna infekcja) in vivo w stanach znacznego osłabienia układu immunologicznego gospodarza [19, 65]. Wówczas wnika do neuronów wykorzystując, jak się wydaje, ich receptory serotoninowe [23]. Poza tkanką nerkową i mózgową wirus JC może być wykrywany, jak wspomniano, w migdałkach, a także w okrężnicy, węzłach chłonnych, szpiku kostnym, śledzionie i wątrobie, oraz innych tkankach wliczając osocze krwi i limfocyty [44, 24]. Te ostatnie prawdopodobnie służą wirusowi do przemieszczania się między nerkami (a także innymi tkankami), a ośrodkowym układem nerwowym [17].

Forma wirusa zwykle wykrywana w moczu nazywana jest JCV archetypowym (*archetype*) i zawiera pojedynczą kopię sekwencji wirusowego promotora i wzmacniacza w rejonie regulatorowym (TCR) [27, 48]. Drugi wariant wirusa JC, nazywany przestawionym (*rearranged*), jest kojarzony z aktywną infekcją wirusa w mózgu, spowodowaną immunosupresją gospodarza, np. w wyniku zakażenia wirusem HIV-1 [27, 28, 48]. Ta forma posiada delekcje i/lub duplikacje niektórych sekwencji regulatorowych, co w konsekwencji prowadzi do zmiany tropizmu tkankowego oraz potencjału patogenicznego wirusa JC, przyczyniając się do powstania takich chorób jak postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia (PML) i niektóre nowotwory [27, 28, 48].

Epidemiologicznie wirusy JC można podzielić na przynajmniej siedem typów występujących w różnych obszarach geograficznych [2]. Klasyfikacja wirusów oparta jest o jego różne sekwencje w rejonie kodującym białko kapsydu VP1 oraz w rejonie regulatorowym (TCR) [2]. Różnice w sekwencjach między poszczególnymi typami wynoszą od 1–3% [1]. Typ 1 występuje głównie w Europie, typy 2 i 7 są charakterystyczne dla Azji, a typy 3 i 6 dla Afryki. Każdy typ może mieć kilka podtypów, różniących się nieznacznie genotypami (0,5–1%) [35]. Charakterystycznymi typami dla krajów rozwiniętych Europy oraz USA są: 1A, 1B oraz 2 [1, 2].



#### 4. Rola JCV jako czynnika etiologicznego w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego i przewodu pokarmowego

##### 4.1. Udział JCV w postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii

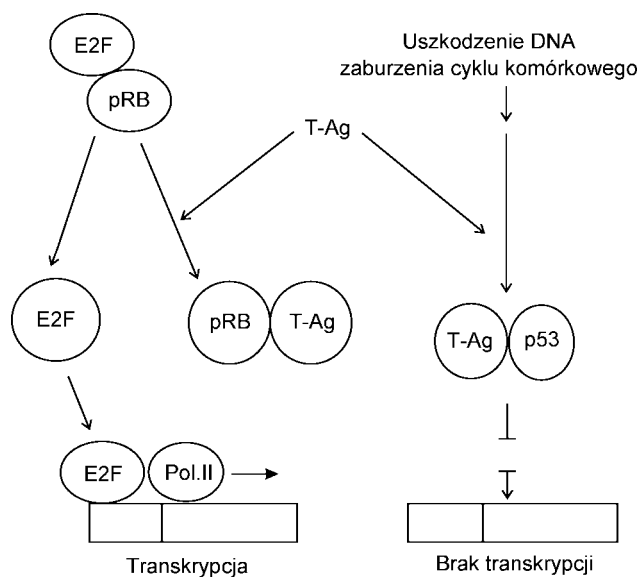
JCV jest głównie kojarzony jako czynnik etiologiczny zespołu klinicznego o nazwie postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia (PML) [38, 39]. W 1958 r. ukazał się pierwszy opis tego zespołu, charakteryzującego się niedowładem połowicznym, zaburzeniami mowy i widzenia, ośpieniem oraz nieuchronnym zgonem chorego w ciągu kilku miesięcy [12]. Należy podkreślić, że PML, rzadko opisywana, występuje najczęściej u starszych osób, u których już wcześniej stwierdzono schorzenie układu siateczkowo-śródbłonkowego [39]. Pierwsze trzy przypadki opisano u pacjentów chorych na białaczkę limfatyczną bądź na chorobę Hodgkina [12]. Uszkodzenia mózgu polegają na pojawianiu się licznych ognisk demielinizacji tkanki nerwowej oraz oligodendrocytów o nieprawidłowej budowie, które są głównym miejscem aktywnej infekcji JCV [12]. Te cechy kliniczne i patologiczne odzwierciedla nazwa zespołu chorobowego – postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia (PML). W leczeniu PML stosowano i wykazano niewielką skuteczność cytarabiny, ale w praktyce rokowanie w przypadku tej choroby jest zawsze niepomyślne [12]. PML aż do niedawna była stosunkowo rzadką chorobą. Większego znaczenia nabrała ostatnio, jako objaw lub powikłanie AIDS, co nie jest zaskakujące u tych chorych, mających tak bardzo upośledzoną odporność. PML powoduje śmierć około 5% chorych na AIDS [4]. Zasugerowano, że powiązanie pomiędzy zakażeniem HIV-1, a rozwojem PML wynika przynajmniej częściowo z produkcji licznych cytokin w centralnym układzie nerwowym w odpowiedzi na infekcję HIV-1 [43]. Związek przeciwwzapalny, cyklosporyna A, zapobiegając aktywacji czynnika transkrypcyjnego zwanego jądrowym czynnikiem aktywowanych komórek T 4 (*nuclear factor of activated T cells 4*, NFAT4), hamował zakażenie komórek gleju wirusem JC [43]. Z kolei sam NFAT4, jak wykazano, wiązał się do sekwencji promotorowych wirusa JC, aktywując w ten sposób transkrypcję zarówno genów wczesnych, jak i późnych, a produkty genów wczesnych dodatkowo wzmacniały efekt NFAT4 [43]. Udział NFAT4 w zakażeniu centralnego układu nerwowego przez JCV sugeruje zaangażowanie ścieżki sygnałowej z użyciem jonów wapnia w celu aktywacji tego czynnika [43].

Badania wykazały obecność genów wirusa JC w leukocytach 40,3% pacjentów chorych na AIDS [20]. Dla porównania u zdrowych ludzi procent ten wynosi tylko 8 [20]. W wyniku analizy próbek mózgu pobra-

nych od osób z PML, zarówno HIV-pozytywnych, jak i HIV-negatywnych, stwierdzono obecność nacieków zapalnych (*inflammatory infiltrates*) wewnątrz i wokół zmienionej chorobowo tkanki [71]. Nacieki te zawierały głównie limfocyty T CD8+, prawdopodobnie rozpoznające antygeny wirusowe [71].

##### 4.2. Mechanizm molekularny wpływu JCV na rozwój nowotworów

Drugą ważną grupą schorzeń, w których postuluje się udział wirusa JC jako czynnika etiologicznego, są nowotwory [69]. Zaburzając cykl komórkowy JCV wpływa na komórkę gospodarza powodując jej przejście z fazy G1 do fazy S, co w efekcie prowadzi do nieograniczonej i niekontrolowanej proliferacji komórkowej [66]. Głównym elementem wirusa JC, który odpowiada za rozwój nowotworu jest jedno z białek wczesnych wirusa, duży antygen T (T-Ag) [58, 69]. Molekularny mechanizm działania antygeny T polega na wiązaniu się do dwóch głównych czynników kontrolujących cykl komórkowy, tj. białek należących do rodziny pRB (*retinoblastoma protein family*): p107 i p130 oraz p53, powodując ich inaktywację i zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego [9, 42] (Rys. 3).



Rys. 3. Udział wirusa JC w nowotworzeniu

W cyklu komórkowym białka pRB i p53 zapobiegają zbyt wczesnemu podziałowi komórki (pRB) oraz nagromadzeniu się szkodliwych mutacji (p53). Związanie pRB z czynnikiem transkrypcyjnym E2F powoduje, że nie ulegają ekspresji kluczowe białka odpowiedzialne za przejście komórki z fazy G<sub>1</sub>(G<sub>0</sub>) do fazy S cyklu. Duży antygen T (T-Ag) wirusa JC wiąże się z pRB, przez co czynnik E2F zostaje uwolniony i aktywuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za proliferację materiału genetycznego i podział komórki. Dodatkowo, T-Ag wiąże białko p53, które pełni rolę w utrzymaniu integralności genomu poprzez wpływ na ekspresję czynników biorących udział w naprawie DNA w przypadku jego uszkodzenia, a gdy uszkodzenia są zbyt duże, w zahamowaniu podziału komórki i wyindukowaniu apoptozy. Procesy te prowadzą do akumulowania się zmian w materiale genetycznym i niekontrolowanego podziału komórki, która przez to może przekształcić się w komórkę nowotworową.

Białka pRb regulują przejście komórki z fazy G1(G0) do fazy S cyklu komórkowego, natomiast p53 w przypadku uszkodzenia genomu komórki zatrzymuje cykl w fazie G1, umożliwiając naprawę materiału genetycznego. Gdy uszkodzenia są zbyt duże, kieruje ono komórkę na drogę apoptozy [9, 42].

Antygen T wiąże się z pRB połączonym w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym E2F (E2F/pRB), co prowadzi do rozbitcia kompleksu E2F/pRB. Uwolniony w ten sposób czynnik transkrypcyjny E2F aktywuje liczne geny komórkowe, odpowiedzialne za wejście komórki w fazę S cyklu komórkowego [9, 70] (Rys. 3). Formy alternatywne dużego antygeny T, T'(135), T'(136) i T'(165) również wiążą białka z rodziny pRB oraz wzmacniają replikację wirusowego DNA [29]. Prawdopodobnie, mimo że posiadają taką samą sekwencję poczynając od końca aminowego, formy alternatywne T'(135), T'(136) i T'(165) wiążą czynniki p107 oraz p130 i zmieniają poziom ich fosforylacji w różnym stopniu, ale działając wspólnie, inaktywują białka regulatorowe cyklu komórkowego, w końcu prowadząc do transformacji komórkowej [8]. Aktywność samego antygeny T-Ag, jak również jego form alternatywnych, także zależy od fosforylacji konserwatywnej reszty treoniny w miejscu 125 (T125) [66]. Mutacja tego miejsca polegająca na zamianie treoniny na alaninę powoduje powstanie niestabilnej formy T-Ag, ale trzy białka alternatywne T' zachowują swoje właściwości i wiążą, chociaż ze słabszym powinowactwem, białka rodziny pRB, jednakże nie były zdolne do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F z kompleksów RB-E2F [66]. Co ciekawe, zarówno antygen T-Ag, jak i jego formy alternatywne T', z mutacją polegającą na zamianie T125 na asparaginian, wiążą białka pRB, p107 i p130, silniej niż białka typu dzikiego, a dodatkowo formy T' wydajnie uwalniały czynnik E2F z kompleksów RB-E2F [66]. Jak się wydaje, w fosforylacji treoniny 125 bierze udział kinaza zależna od cykliny, w kompleksie z nią (*cyclin-cyclin-dependent kinase*), co wskazywałoby na to, że te funkcje T-Ag i trzech form T', które odpowiadają za replikację wirusa i transformację onkogenną, są regulowane w sposób zależny od cyklu komórkowego [66].

W przypadku p53 antygen T wiąże się z odpowiednią domeną tego białka (odpowiedzialną za oddziaływanie z DNA), przez co blokuje dostęp p53, jako czynnika transkrypcyjnego, do odpowiednich sekwencji w DNA (kodujących czynniki biorące udział w naprawie DNA lub w apoptozie komórki) i tym samym hamuje ich transkrypcję [34, 42] (Rys. 3).

Wskazano również na wpływ dużego antygeny T na ścieżkę sygnałową aktywowaną przez substrat dla receptora insulinowego 1 (*insulin receptor substrate 1*, IRS-1), główną cząsteczkę sygnałową receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu I (*insulin-like growth*

*factor I receptor*, IGF-IR) [57]. Po translokacji IRS-1 do jądra, w czym uczestniczy T-Ag, IRS-1 wiąże białko Rad51 na miejscu uszkodzonego DNA powodując hamowanie jego naprawy na zasadzie rekombinacji homologicznej (*homologous recombination directed DNA repair*, HRR) [57]. W efekcie dochodzi do akumulacji mutacji w komórce, a wraz z nimi do niestabilności genetycznej, naruszającej integralność materiału genetycznego. Zarówno wadliwa naprawa uszkodzonego DNA, czy też defekty w zachowaniu telomerów, rozdziału chromosomów, mogą z kolei przyczynić się do rozwoju nowotworów [57]. Ponieważ wiadomo, że duży antygen T JCV posiada zdolność transformacji komórek *in vitro*, jak i przyczynia się do powstawania nowotworów u zwierząt doświadczalnych, opisany powyżej mechanizm jego wpływania na naprawę DNA może odgrywać ważną rolę w powstawaniu nowotworów u człowieka [57].

#### 4.2.1. Nowotwory przewodu pokarmowego

Liczne doświadczenia potwierdziły wysoką częstotliwość występowania sekwencji genu T-Ag, a także wydajną syntezę T-Ag w nowotworach przewodu pokarmowego, np. w raku przełyku, żołądka, jelita oraz okrężnicy, co ma, jak się wydaje, związek z postulowanym sposobem zakażenia tym wirusem, tj. poprzez zanieczyszczoną wodę i żywność [10, 19, 46, 61]. Na przykład w tkankach nowotworowych okrężnicy (*colon rectal carcinoma*) sekwencje DNA wirusa JC, jak również blisko spokrewnionego wirusa BK, zostały zidentyfikowane u 16 z 18 badanych pacjentów co stanowi 88,9% [10]. Natomiast badania przeprowadzone w Japonii wykazały, że duży antygen T został zidentyfikowany w 6 z 23 próbek tkanek raka okrężnicy, co stanowi 26,1%. [36]. Jednocześnie nie wykryto w nich sekwencji swoistych dla białka otoczki VP1 i agnoproteiny [36]. W doniesieniu z USA wykazano metodą PCR obecność wczesnych sekwencji wirusowych w 22 z 27 próbek raka okrężnicy [25]. W ponad 50% pozytywnych przypadków stwierdzono ekspresję białek T-Ag oraz agnoproteiny, ale nie białek otoczki [25]. Nieobecność tych ostatnich sugeruje, że w komórkach zmienionych nowotworowo nie dochodzi do replikacji wirusa zakończonej pojawieniem się wirionów potomnych [25, 36]. W komórkach rakach okrężnicy antygen T może wchodzić w interakcje z beta-keniną (*beta-catenin*), białkiem, którego ilość w cytozolu, a następnie w jądrze zwiększa się w wyniku aktywacji ścieżki sygnałowej Wnt [25]. W jądrze  $\beta$ -keninina wchodzi w interakcje ze swoistymi czynnikami transkrypcyjnymi, stymulując w ten sposób ekspresję genów, m.in. c-myc, którego produkt aktywuje cykl komórkowy i proliferację [25]. W przypadku równoczesnej produkcji i obecności tych dwóch białek,

tj. T-Ag oraz beta-kateniny, dochodzi do wzmocnienia transkrypcji z promotora genu *c-myc* [25, 58]. Ponadto, w nowotworach okrężnicy antygen T wirusa JC prowadzi, jak się wydaje, komórki do niestabilności genetycznej i epigenetycznej, właśnie poprzez interakcję m.in. z beta-kateniną i p53, co przejawia się w postaci zmienionych chromosomów [33, 47, 58]. Powód niestabilności chromosomalnej polegającej na delecjach, duplikacjach i rearanżacjach w komórkach raka okrężnicy jest ciągle kwestią w dużej mierze do wyjaśnienia. W przypadku infekcji poliomawirusami postulowany mechanizm transformacji nowotworowej polega na tym, że JCV obecny w przewodzie pokarmowym uaktywnia się w przypadku zmian nowotworowych, lub wywołuje je, i poprzez swoje białko duży antygen T prowadzi do wyżej wymienionych procesów uszkadzających materiał genetyczny [47]. Kiedy w ich wyniku w komórkach nowotworowych dojdzie do inaktywacji wystarczającej liczby tkankowo swoistych genów hamujących proces nowotworzenia, co zapewnia rozwój nowotworu, dalsze transformacje materiału genetycznego spowodowane działaniem wirusa JC mogą być potencjalnie niebezpieczne dla komórek nowotworowych i w jakiś sposób, metodą selekcji pozbywają się one wirusa [47]. Inne doniesienia wskazują, że obecność antygeny T-Ag w komórkach raka okrężnicy wpływa na wzór metylacji materiału genetycznego [33, 64]. W stu przebadanych próbkach tego nowotworu ze stwierdzonymi niestabilnościami mikrosatelitarnymi i chromosomalnymi sekwencje DNA właściwe dla T-Ag JCV wykryto metodą PCR w 77% przypadków [33]. Następnie metodą immunohistochemiczną w 56% tych pozytywnych przypadków potwierdzono obecność dużego antygeny T [33]. Ponadto sprawdzono wzór metylacji regionów promotorowych dziewięciu genów supresorowych, których zmieniona ekspresja ma, jak się sądzi, znaczenie w powstawaniu raka okrężnicy i stwierdzono znaczącą korelację ( $P = 0,01$ ) pomiędzy obecnością T-Ag, a stopniem metylacji promotorów tych genów, w porównaniu z próbkami, w których nie wykryto T-Ag [33].

W badaniach dotyczących nowotworów przełyku (*esophageal carcinomas*) duży antygen T wirusa JC wykryto w 10 z 19 analizowanych próbek (53%), a agnoproteinę w 8 próbkach (42%) [19]. W żadnej z 51 próbek z przełyku, z normalną tkanką czy też ze zmianami łagodnymi i przedrakowymi, nie stwierdzono obecności tych białek wirusowych [19]. Natomiast w wyniku analizy sekwencji DNA wirusa JC w wybranych 5 próbkach pochodzących z raka przełyku ustalono, że DNA JCV występuje we wszystkich próbkach (100%), a w badanych 13 próbkach kontrolnych w 11 z nich (85%) [19]. Tak duża częstość występowania wirusa JC w tkankach przełyku może potwierdzać hipotezę jego wnikania do organizmu drogą pokarmową [5, 19].

Podobnie jak w nowotworach przełyku, w nowotworach żołądka (*gastric cancers*) również stwierdzono następującą prawidłowość: obecność sekwencji DNA wirusa JC swoistych dla genu T-Ag w tkance nowotworowej i w otaczającej nowotwór tkance normalnej, ale tylko w tkance nowotworowej wykazano ekspresję T-Ag [61]. Z 37 analizowanych próbek nowotworu żołądka, sekwencje DNA swoiste dla dużego antygeny T JCV znaleziono w 21 (57%), a w badaniach 23 próbek, dotyczących obecności białka T-Ag, w 9 uzyskano pozytywny wynik (39%) [61]. Ponadto, doniesienie na temat wykrycia sekwencji DNA wirusa JC w nabłonku gruczołowym prostaty (prostatic glandular epithelium) stwarza możliwość udziału JCV w kancerogenezie tego gruczołu [72].

#### 4.2.2. Guzy mózgu

Dużą grupą nowotworów mających związek z wirusem JC są guzy mózgu (*brain tumors*) [68]. Eksperymenty na zwierzętach dowiodły potencjalnie ważnej roli JCV w etiologii tych nowotworów [68]. Kluczową rolę w tej onkogenezie mają, wspomniane wcześniej, trzy białka wirusa: T-Ag, t-ag i agnoproteina [68]. Przeprowadzone badania wykazały podwyższoną częstość występowania sekwencji genu VP1 oraz sekwencji TCR wirusa JC w guzach mózgu, co również wskazywałoby na JCV jako czynnik etiologiczny nowotworów mózgu [6, 13, 50]. Dla przykładu 69% pacjentów z różnymi nowotworami mózgu wykazuje obecność sekwencji genów wczesnych JCV w tych tkankach [18]. W innym badaniu stwierdzono występowanie sekwencji DNA charakterystycznych dla poliomawirusów w 50% badanych próbek różnych guzów mózgu, z czego 40,6% było swoistych dla JCV, a pozostałe dla wirusa BK [16]. Sekwencje te wyizolowano z takich guzów mózgu jak: rdzeniak (medulloblastoma), wyściółczak (ependymoma), glejak wielopostaciowy (glioblastoma), gwiaździak (astrocytoma), skąpodrzewiak (oligodendroglioma) oraz innych nowotworów pochodzenia glejowego [6, 13, 50]. O skali oddziaływania JCV na ekspresję genów w astrocytach świadczą eksperymenty *in vitro*, z użyciem techniki mikromacierzy (*oligonucleotide-based microarray*), pozwalającej zmierzyć zmiany w wielkości transkrypcji 12600 genów [54]. Zauważono, że pod wpływem JCV nastąpiło wzmocnienie transkrypcji prawie 355 genów, a zmniejszenie w przypadku 130 genów [54]. Wiele z tych genów, których ekspresja wzrosła, koduje białka, które, jak się sądzi, pełnią rolę w proliferacji komórki [54]. Podobne badania, przeprowadzone z użyciem ludzkich komórek zarodkowych gleju (*primary human fetal glial cells*) potwierdziły powyższe doniesienie [67]. Stwierdzono w nich zmiany w ekspresji w ponad 400 genach [67]. Podobnie, produkty wielu

z nich wpływają na wzrost komórki i oddziaływania międzykomórkowe [67]. Ponadto, zauważono zwiększenie ekspresji genów zależnych od interferonu: STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), ISG56 (*interferon stimulating gene 56*), MxA (*myxovirus resistance 1*), syntetaza 2'5'-oligoadenylowa (*2'5'-oligoadenylate synthetase*) i cig5 [67]. Wskazuje to na silną odpowiedź przeciwwirusową, jaką wzbudza JCV, co prawdopodobnie przyczynia się do jego kontroli u osób bez zaburzeń układu immunologicznego [67].

Sekwencje wirusa JC można wykryć w tkance nowotworowej, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym, choć badanie płynu wydaje się obniżać liczbę wykrytych pozytywnych przypadków. Na przykład 9 spośród 22 próbek nowotworów mózgu zawierało sekwencje wirusa JC (40,9%), ale spośród 15 próbek płynu mózgowo-rdzeniowego pobranych od chorych na raka mózgu, tylko 2 były pozytywne (13,3%) [6].

Na zakończenie warto dodać, że kwestia powiązania wirusa JC z guzami mózgu i jego rola w procesie nowotworzenia pozostaje nadal kontrowersyjna. Badania z użyciem 60 próbek nowotworów mózgu (w preparatach parafinowych), z których 55 było pochodzenia glejowego (gliomas), 5 rdzeniakami (medulloblastomas) oraz 15 próbek pochodzących z mózgow z przerostem astrocytów (gliosis) ujawniły obecność DNA JCV swoistego dla regionu VP3 lub T-Ag tylko w 5 przypadkach (3 nowotwory i 2 przerosty), a żadna próbka nie była pozytywna w przypadku zastosowania przeciwciał swoistych dla antygeny T [45]. Dla kontrastu wszystkie 4 próbki kontrolne uzyskane w wyniku biopsji post mortem od pacjentów HIV-pozytywnych ze zdiagnozowanym PML zawierały sekwencje DNA JCV oraz antygen T [45]. Inne badania przeprowadzone w dwóch różnych laboratoriach z użyciem tych samych 225 próbek guzów mózgu wykazały obecność sekwencji poliomawirusów odpowiednio: w 9 (4%) przypadkach, z czego 3 były swoiste dla JCV, 3 dla wirusa BK i 3 dla wirusa SV40 (w jednym laboratorium); i w 1 przypadku, sekwencji swoistej dla wirusa SV40 (w drugim laboratorium) [59]. Z tych badań wynika, że DNA JCV, jak również innych poliomawirusów, jest jednak stosunkowo rzadko wykrywalny w próbkach nowotworów mózgu.

## 5. Podsumowanie

Wirus JC jest mało znanym, ale powszechnie występującym wirusem w populacji światowej. Jest on jednym z najbardziej powszechnych wirusów DNA na świecie. Ponieważ zasięg JCV obejmuje cały glob, fakt ten jest wykorzystywany do konstruowania filogenezy tego wirusa oraz map migracji populacji ludzkiej [49,

60]. W ostatnich latach notuje się wzrost zainteresowania wirusem JC jako czynnikiem etiologicznym PML i jego związkami z AIDS [4]. Szereg doniesień wskazuje także na pośredni i/lub bezpośredni udział JCV w procesie nowotworzenia [69]. Potwierdzeniem tego taktu mogą być oddziaływania jednego z białek wirusa – T-Ag z białkami supresorowymi nowotworów, co w konsekwencji zmienia ich działanie [9, 42]. Drugim argumentem jest stosunkowo wysoka częstotliwość występowania sekwencji wirusowych w tkankach nowotworowych jelita i mózgu [10, 61, 68]. Istotnym czynnikiem w cyklu rozwojowym JCV, mającym znaczenie dla jego patogenności, jest zmiana statusu immunologicznego gospodarza [65]. Znaczne osłabienie układu siateczkowo-śródbłonkowego wpływa na uaktywnienie wirusa w mózgu i nieuchronny zgon chorego w ciągu kilku miesięcy [65]. Dokładne poznanie tego wirusa oraz jego cyklu życiowego i miejsc występowania w zakażonych organizmie, sposobu transformacji do formy wirulentnej, przyczyni się do opracowania lepszych metod leczenia zakażenia tym wirusem.

## Piśmiennictwo

1. Agostini H.T., Deckhut A., Jobes D.V., Girones R., Schlunck G., Prost M.G., Frias C., Perez-Trallero E., Ryschkewitsch C.F., Stoner G.L.: Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J. Gen. Virol.* **82**, 1221–1331 (2001)
2. Agostini H.T., Ryschkewitsch C.F., Stoner G.L.: Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 159–164 (1996)
3. Alexandrov A.I., Botchan M.R., Cozzarelli N.R.: Characterization of simian virus 40 T-antigen double hexamers bound to a replication fork. The active form of the helicase. *J. Biol. Chem.* **277**, 44886–44897 (2002)
4. Berger J.R.: Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome: explaining the high incidence and disproportionate frequency of the illness relative to other immunosuppressive conditions. *J. Neurovirol.* **1**, 38–41 (2003)
5. Boffil-Mass S., Formiga-Cruz M., Clemente-Casares P., Calafell F., Girones R.: Potential Transmission of Human Polyomaviruses through the Gastrointestinal Tract after Exposure to Virions or Viral DNA. *J. Virol.* **75**, 10290–10299 (2001)
6. Boldorini R., Pagani E., Car P.G., Omodeo-Zorini E., Borghi E., Tarantini L., Bellotti C., Ferrante P., Monga G.: Molecular characterisation of JC virus strains detected in human brain tumours. *Pathology*, **35**, 248–253 (2003)
7. Boldorini R., Veggiani C., Barco D., Monga G.: Kidney and urinary tract polyomavirus infection and distribution: molecular biology investigation of 10 consecutive autopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **129**, 69–73 (2005)
8. Bollag B., Kilpatrick L.H., Tyagarajan S.K., Tevethia M.J., Frisque R.J.: JC virus T'135, T'136 and T'165 proteins interact with cellular p107 and p130 in vivo and influence viral transformation potential. *J. Neurovirol.* **12**, 428–442 (2006)
9. Caracciolo V., Reiss K., Khalili K., De Falco G., Giordano A.: Role of the interaction between large T antigen and Rb family

- members in the oncogenicity of JC virus. *Oncogene*, **25**, 5294–5301 (2006)
10. Casini B., Borgese L., Del Nonno F., Galati G., Izzo L., Caputo M., Perrone Donnorso R., Castelli M., Risuleo G., Visca P.: Presence and incidence of DNA sequences of human polyomaviruses BKV and JCV in colorectal tumor tissues. *Anticancer Res.* **25**, 1079–1085 (2005)
  11. Chang H., Wang M., Tsai R.T., Lin H.S., Huan J.S., Wang W.C., Chang D.: High incidence of JC viruria in JC-seropositive older individuals. *J. Neurovirol.* **8**, 447–451 (2002)
  12. Collier L., Oxford J.: *Wirusologia. Podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*, PZWL, Warszawa, 1996, 328
  13. Croul S., Otte J., Khalili K.: Brain tumors and polyomaviruses. *J. Neurovirol.* **9**, 173–182 (2003)
  14. Darbinyan A., Darbinian N., Safak M., Radhakrishnan S., Giordano A., Khalili K.: Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. *Oncogene*, **21**, 5574–5581 (2002)
  15. Darbinyan A., Siddiqui K.M., Slonina D., Darbinian N., Amini S., White M.K., Khalili K.: Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. *J. Virol.* **78**, 8593–8600 (2004)
  16. Delbue S., Pagani E., Guerini F.R., Agliardi C., Mancuso R., Borghi E., Rossi F., Boldorini R., Veggiani C., Car P.G., Ferrante P.: Distribution, characterization and significance of polyomavirus genomic sequences in tumors of the brain and its covering. *J. Med. Virol.* **77**, 447–454 (2005)
  17. Del Valle L., Enam S., Lara C., Miklossy J., Khalili K., Gordon J.: Primary central nervous system lymphoma expressing the human neurotropic polyomavirus, JC virus, genome. *J. Virol.* **78**, 3462–3469 (2004)
  18. Del Valle L., Gordon J., Assimakopoulou M., Enam S., Geddes J.F., Varakis J.N., Katssetos C.D., Croul S., Khalili K.: Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-antigen in tumors of the central nervous system. *Cancer Res.* **61**, 4287–4293 (2001)
  19. Del Valle L., White M.K., Enam S., Oviedo S.P., Bromer M.Q., Thomas R.M., Parkman H.P., Khalili K.: Detection of JC virus DNA sequences and expression of viral T antigen and agnoprotein in esophageal carcinoma. *Cancer*, **103**, 516–527 (2005)
  20. Dubois V., Dutronc H., Lafon M.E., Poinot V., Pellegrin J.L., Ragnaud J.M., Ferrer A.M., Fleury H.J.A.: Latency and Reactivation of JC Virus in Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2288–2292 (1997)
  21. Eash S., Manley K., Gasparovic M., Querbes W., Atwood W.J.: The human polyomaviruses. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 865–876 (2006)
  22. Eash S., Tavares R., Stopa E.G., Robbins S.H., Brossay L., Atwood W.J.: Differential Distribution of the JC Virus Receptor-Type Sialic Acid in Normal Human Tissues. *Am. J. Pathol.* **164**, 419–428 (2004)
  23. Elphick G.F., Querbes W., Jordan J.A., Gee G.V., Eash S., Manley K., Dugan A., Stanifer M., Bhatnagar A., Kroeze W.K., Roth B.L., Atwood W.J.: The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science*, **306**, 1380–1383 (2004)
  24. Elsner C., Dorries K.: Human polyomavirus JC control region variants in persistently infected CNS and kidney tissue. *J. Gen. Virol.* **79**, 789–799 (1998)
  25. Enam S., Del Valle L., Lara C., Gan D.D., Ortiz-Hidalgo C., Palazzo J.P., Khalili K.: Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Res.* **62**, 7093–7101 (2002)
  26. Endo S., Okada Y., Orba Y., Nishihara H., Tanaka S., Nagashima K., Sawa H.: JC virus agnoprotein colocalizes with tubulin. *J. Neurovirol.* **1**, 10–14 (2003)
  27. Fedele C.G., Ciardi M.R., Della S., Contreras G., Perez J.L., De Ona M., Vidal E., Tenorio A.: Identical rearranged forms of JC polyomavirus transcriptional control region in plasma and cerebrospinal fluid of acquired immunodeficiency syndrome patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurovirol.* **9**, 551–558 (2003)
  28. Fedele C.G., Polo C., Tenorio A., Niubo J., Ciardi M.R., Perez J.L.: Analysis of the transcriptional control region of JC polyomavirus in cerebrospinal fluid from HIV-negative patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Med. Virol.* **78**, 1271–1275 (2006)
  29. Frisque R.J., Bollag B., Tyagarajan S.K., Kilpatrick L.H.: T' proteins influence JC virus biology. *J. Neurovirol.* **9** (Suppl. 1), 15–20 (2003)
  30. Frisque R.J., Bream G.L., Cannella M.T.: Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* **51**, 458–69 (1984)
  31. Gee G.V., Dugan A.S., Tsomaia N., Mierke D.F., Atwood W.J.: The role of sialic acid in human polyomavirus infections. *Glycoconjug. J.* **23**, 19–26 (2006)
  32. Gee G.V., Tsomaia N., Mierke D.F., Atwood W.J.: Modeling a Sialic Acid Binding Pocket in the External Loops of JC Virus VP1. *J. Biol. Chem.* **279**, 49172–49176 (2004)
  33. Goel A., Li M.S., Nagasaka T., Shin S.K., Fuerst F., Ricciardiello L., Wasserman L., Boland C.R.: Association of JC virus T-antigen expression with the methylator phenotype in sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology*, **130**, 1950–1961 (2006)
  34. Goździcka-Józefiak A. (red.): *Wirusologia molekularna*. Wyd. Nauk. UAM, Poznań, 2005, 103–104
  35. Guo J., Kitamura T., Ebihara H., Sugimoto C., Kunitake T., Takehisa J., Na Y.Q., Al-Ahdal M.N., Hallin A., Kawabe K., Taguchi F., Yogo Y.: Geographical distribution of the human polyomavirus JC virus type A and B and isolation of new type from Ghana. *J. Gen. Virol.* **77**, 919–927 (1996)
  36. Hori R., Murai Y., Tsuneyama K., Abdel-Aziz H.O., Nomoto K., Takahashi H., Cheng C.M., Kuchina T., Harman B.V., Takano Y.: Detection of JC virus DNA sequences in colorectal cancers in Japan. *Virchows Arch.* **447**, 723–730 (2005)
  37. Kaniowska D., Kaminski R., Amini S., Radhakrishnan S., Rappaport J., Johnson E., Khalili K., Del Valle L., Darbinyan A.: Cross-interaction between JC virus agnoprotein and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat modulates transcription of the HIV-1 long terminal repeat in glial cells. *J. Virol.* **80**, 9288–9299 (2006)
  38. Khalili K., Gordon J., White M.K.: The polyomavirus, JCV and its involvement in human disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **577**, 274–287 (2006)
  39. Khalili K., White M.K.: Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult. Scler.* **12**, 133–142 (2006)
  40. Khalili K., White M.K., Sawa H., Nagashima K., Safak M.: The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J. Cell. Physiol.* **204**, 1–7 (2005)
  41. Kim J., Woolridge S., Biffi R., Borghi E., Lassak A., Ferrante P., Amini S., Khalili K., Safak M.: Members of the AP-1 family, c-Jun and c-Fos, functionally interact with JC virus early regulatory protein large T antigen. *J. Virol.* **77**, 5241–5252 (2003)
  42. Krynska B., Lewin-Kowalik J., Sieron A.L.: Disturbance of the normal cell cycle by T antigens of SV40 viruses and JC cause some tumors. *Post. Hig. Med. Dośw.* **52**, 237–257 (1998)

43. Manley K., O'hara B.A., Gee G.V., Simkevich C.P., Sedivy J.M., Atwood W.J.: NFAT4 is required for JC virus infection of glial cells. *J. Virol.* **80**, 12079–12085 (2006)
44. Monaco M.C., Jensen P.N., Hou J., Durham L.C., Major E.O.: Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J. Virol.* **72**, 9918–9923 (1998)
45. Munoz-Marmol A.M., Mola G., Ruiz-Larroya T., Fernandez-Vasalo A., Vela E., Mate J.L., Ariza A.: Rarity of JC virus DNA sequences and early proteins in human gliomas and medulloblastomas: the controversial role of JC virus in human neurooncogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **32**, 131–140 (2006)
46. Murai Y., Zheng H.C., Aziz H.O., Mei H., Kutsuna T., Nakanishi Y., Tsuneyama K., Takano Y.: High JC virus load in gastric cancer and adjacent non-cancerous mucosa. *Cancer Sci.* **98**, 25–31 (2007)
47. Niv Y., Goel A., Boland C.R.: JC virus and colorectal cancer: a possible trigger in the chromosomal instability pathways. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **21**, 85–89 (2005)
48. O'Neill F.J., Greenlee J.E., Dorries K., Clawson S.A., Carney H.: Propagation of archetype and nonarchetype JC virus variants in human fetal brain cultures: demonstration of interference activity by archetype JC virus. *J. Neurovirol.* **9**, 567–576 (2003)
49. Pavesi A.: Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times. *J. Gen. Virol.* **86**, 1315–1326 (2005)
50. Pina-Oviedo S., De Leon-Bojorge B., Cuesta-Mejias T., White M.K., Ortiz-Hidalgo C., Khalili K., Del Valle L.: Glioblastoma multiforme with small cell neuronal-like component: association with human neurotropic JC virus. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **111**, 388–396 (2006)
51. Prins C., Frisque R.J.: JC virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells. *J. Neurovirol.* **7**, 250–264 (2001)
52. Qu Q., Sawa H., Suzuki T., Semba S., Henmi C., Okada Y., Tsuda M., Tanaka S., Atwood W.J., Nagashima K.: Nuclear Entry Mechanism of the Human Polyomavirus JC Virus-like Particle. *J. Biol. Chem.* **279**, 27735–27742 (2004)
53. Querbes W., O'Hara B.A., Williams G., Atwood W.J.: Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J. Virol.* **80**, 9402–9413 (2006)
54. Radhakrishnan S., Otte J., Enam S., Del Valle L., Khalili K., Gordon J.: JC virus-induced changes in cellular gene expression in primary human astrocytes. *J. Virol.* **77**, 10638–10644 (2003)
55. Raha T., Grace Cheng S.W., Green M.R.: HIV-1 Tat Stimulates Transcription Complex Assembly through Recruitment of TBP in the Absence of TAFs. *PloS Biology* **3**(2), e44 (2005) (doi:10.1371/journal.pbio.0030044), na stronic: <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371%2Fjournal.pbio.0030044>
56. Ravichandran V., Sabath B.F., Jensen P.N., Houff S.A., Major E.O.: Interactions between c-Jun, nuclear factor 1, and JC virus promoter sequences: implications for viral tropism. *J. Virol.* **80**, 10506–10513 (2006)
57. Reiss K., Khalili K., Giordano A., Trojanek J.: JC virus large T-antigen and IGF-I signaling system merge to affect DNA repair and genomic integrity. *J. Cell. Physiol.* **206**, 295–300 (2006)
58. Ricciardiello L., Baglioni M., Giovannini C., Pariali M., Cenacchi G., Ripalti A., Landini M.P., Sawa H., Nagashima K., Frisque R.J., Goel A., Boland C.R., Tognon M., Roda E., Bazzoli F.: Induction of Chromosomal Instability in Colonic Cells by the Human Polyomavirus JC Virus. *Cancer Res.* **63**, 7256–7262 (2003)
59. Rollison D.E., Utaipat U., Ryschkewitsch C., Hou J., Goldthwaite P., Daniel R., Helzlsouer K.J., Burger P.C., Shah K.V., Major E.O.: Investigation of human brain tumors for the presence of polyomavirus genome sequences by two independent laboratories. *Int. J. Cancer*, **113**, 769–774 (2005)
60. Shackelton L.A., Rambaut A., Pybus O.G., Holmes E.C.: JC virus evolution and its association with human populations. *J. Virol.* **80**, 9928–9933 (2006)
61. Shin S.K., Li M.S., Fuerst F., Hotchkiss E., Meyer R., Kim I.T., Goel A., Boland C.R.: Oncogenic T-antigen of JC virus is present frequently in human gastric cancers. *Cancer*, **107**, 481–488 (2006)
62. Smith R.W. P., Nasheuer H.P.: Initiation of JC virus DNA replication in vitro by human and mouse DNA polymerase – primase. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2030–2037 (2003)
63. Sock E., Wegner M., Fortunato E.A., Grummt F.: Large T-antigen and sequences within the regulatory region of JC virus both contribute to the features of JC virus DNA replication. *Virology*, **197**, 537–548 (1993)
64. Strazzullo M., Cossu A., Balduin P., Colombino M., Satta M.P., Tanda F., De Bonis M.L., Cerase A., D'Urso M., D'Esposito M., Palmieri G.: High-resolution methylation analysis of the hMLH1 promoter in sporadic endometrial and colorectal carcinomas. *Cancer*, **98**, 1540–1546 (2003)
65. Sweet T.M., Del Valle L., Khalili K.: Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *J. Cell. Physiol.* **191**, 249–256 (2002)
66. Tyagarajan S.K., Frisque R.J.: Stability and function of JC virus large T antigen and T' proteins are altered by mutation of their phosphorylated threonine 125 residues. *J. Virol.* **80**, 2083–2091 (2006)
67. Verma S., Ziegler K., Ananthula P., Co J.K., Frisque R.J., Yanagihara R., Nerurkar V.R.: JC virus induces altered patterns of cellular gene expression: interferon-inducible genes as major transcriptional targets. *Virology*, **345**, 457–467 (2006)
68. White M.K., Gordon J., Reiss K., Del Valle L., Croul S., Giordano A., Darbinyan A., Khalili K.: Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res. Rev.* **50**, 69–85 (2005)
69. White M.K., Khalili K.: Expression of JC virus regulatory proteins in human cancer: potential mechanisms for tumorigenesis. *Eur. J. Cancer*, **41**, 2537–2548 (2005)
70. White M.K., Khalili K.: Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses. *Oncogene*, **25**, 5286–5293 (2006)
71. Wuthrich C., Kesari S., Kim W.K., Williams K., Gelman R., Elmer D., De Girolami U., Joseph J.T., Hedley-Whyte T., Korallnik I.J. Characterization of lymphocytic infiltrates in progressive multifocal leukoencephalopathy: co-localization of CD8(+) T cells with JCV-infected glial cells. *J. Neurovirol.* **12**, 116–128 (2006)
72. Zambrano A., Kalantari M., Simoneau A., Jensen J.L., Villarreal L.P.: Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate*, **53**, 263–276 (2002)

Tomasz Dzieciatkowski<sup>1</sup>, Agnieszka Rola<sup>2</sup>, Anna Midak-Siewirska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie  
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa. e-mail: [dzieciatkowski@wp.pl](mailto:dzieciatkowski@wp.pl)

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

Wpłynęło w październiku 2007 r.

1. Wstęp. 2. Budowa adenowirusów. 3. Zakażenia górnych dróg oddechowych i zapalenia płuc. 4. Okulistyczne następstwa zakażenia adenowirusami. 5. Zakażenia układu pokarmowego. 6. Krwotoczne zapalenia pęcherza. 7. Neuroinfekcje powodowane przez adenowirusy. 8. Diagnostyka zakażeń ludzkimi adenowirusami. 9. Leczenie chorób o etiologii adenowirusowej. 10. Zapobieganie i profilaktyka. 11. Podsumowanie

### Adenoviral infections in humans

**Abstract:** Human adenoviruses (HAdV) are a group of nonenveloped, double-stranded DNA viruses, which are endemic in the pediatric population. Adenoviruses cause a variety of infectious diseases in humans, such as respiratory disease, hemorrhagic cystitis, epidemic keratoconjunctivitis, encephalopathy and gastroenteritis. Fifty-one different serotypes of HAdVs have been identified on the basis of neutralization with type specific animal antisera, and these serotypes can be classified into six subgroups (A to F) on the basis of their ability to agglutinate red blood cells. Adenoviruses are now also recognized as important pathogens causing severe morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially in transplant recipients. The aim of this paper is the presentation of current knowledge about infections caused by human adenoviruses as well as commonly used diagnostic procedures.

1. Introduction. 2. Adenovirus morphology. 3. Upper respiratory tract infections and pneumonia. 4. Ophthalmologic consequences of adenoviral infection. 5. Enteric infections with adenoviruses. 6. Hemorrhagic cystitis. 7. Neuroinfections caused by adenoviruses. 8. Diagnostics of adenoviral infections. 9. Chemotherapy. 10. Prevention and prophylaxis. 11. Summary

---

**Słowa kluczowe:** adenowirusy, zapalenie rogówki, biegunki wirusowe, krwotoczne zapalenie pęcherza, neuroinfekcja, diagnostyka  
**Key words:** adenoviruses, keratoconjunctivitis, viral diarrhea, hemorrhagic cystitis, neuroinfections, diagnosis

---

## 1. Wstęp

Adenowirusy (AdV) są szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie patogenami, wywołującymi głównie zakażenia górnych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i oczu [3]. Pierwsze doniesienia o zakażeniach adenowirusami pochodzą z XIX wieku z Niemiec, gdzie u robotników fabrycznych zanotowano liczne przypadki występowania chorób oczu charakteryzujących się zapaleniami rogówki. W roku 1953 Rowe i wsp. prowadzili prace nad wyprowadzeniem linii komórkowych z usuniętych dzieciom migdałków w celu użycia ich do namnażania wirusa polio [47]. Niestety w aż 33 spośród 53 przypadków, w hodowlach w krótkim czasie doszło do wolno postępującego procesu cytopatycznego. Czynnikiem odpowiedzialny za ten efekt nazwany został od tkanki, w której występował (ang. adenoid), co dało początek nazwie całej rodziny wirusów.

Rodzina *Adenoviridae* dzieli się na dwie podrodziny: *Mastadenovirus* i *Aviadenovirus*, których naturalnymi gospodarzami są odpowiednio ssaki i ptaki [3]. Ludzkie adenowirusy podzielono na sześć podrodzajów oznaczonych literami od A do F, w obrębie których znajduje się 51 serotypów znacznie różniących się pod względem patogenności [3, 51]. Ze względu na róż-

nicowany tropizm tkankowy mogą one wywoływać rozmaite objawy chorobowe. Zakażenia adenowirusami stanowią aż 13% wszystkich infekcji wirusowych u człowieka, stąd pod względem częstości występowania stawia je na drugim miejscu po rodzinie *Herpesviridae*. Szerzą się głównie drogą kropelkową oraz fekalno-oralną; sporadycznie źródłem zakażenia może być zanieczyszczona woda. Adenowirusy należące do podrodzaju A są odpowiedzialne głównie za biegunki u dzieci. Podrodzaj B wywołuje głównie stany zapalne dróg oddechowych wśród dzieci oraz młodych rekrutów. Najbardziej patogenny jest typ AdV7, powodujący infekcje dróg oddechowych. Z kolei podrodzaj C odpowiada za endemicznie występujące przewlekłe zapalenia gardła u pacjentów pediatrycznych. Stwierdzono, że co najmniej 50% dzieci w wieku do 4 lat przeszło infekcję wywołaną przez wirusy AdV1 lub AdV2. Wirusy należące do tego podrodzaju są odpowiedzialne za 50% wszystkich zakażeń adenowirusowych zgłaszanych do WHO. Wśród 28 serotypów z podrodzaju D typ AdV8 odpowiedzialny jest za ostre stany zapalne spojówki, powodując epidemiczne zakażenia wśród ludzi żyjących w gęsto zaludnionych rejonach o suchym klimacie [3, 51]. Prowadzone w ostatnich latach badania nad należącymi do tego podrodzaju adenowirusami typu 36 i 37 wykazały ich przypuszczalny udział

Tabela I

Klasyfikacja ludzkich adenowirusów [3, 48]

Podgrupa	Serotypy występujące w obrębie podgrupy	Choroby wywoływane u człowieka	Zdolność do potencjalnej onkogenezy u zwierząt
A	12, 18, 31	zaburzenia jelitowe	wysoka
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	zakażenia górnych dróg oddechowych, zapalenia płuc, krwotoczne zapalenie pęcherza	słaba
C	1, 2, 5, 6	zakażenia górnych dróg oddechowych u dzieci	niska
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32–33, 36–39, 42–49, 51	zapalenia rogówki, zaburzenia jelitowe	niska
E	4	zakażenia górnych dróg oddechowych, zapalenia płuc	niska
F	40, 41	biegunki	niska

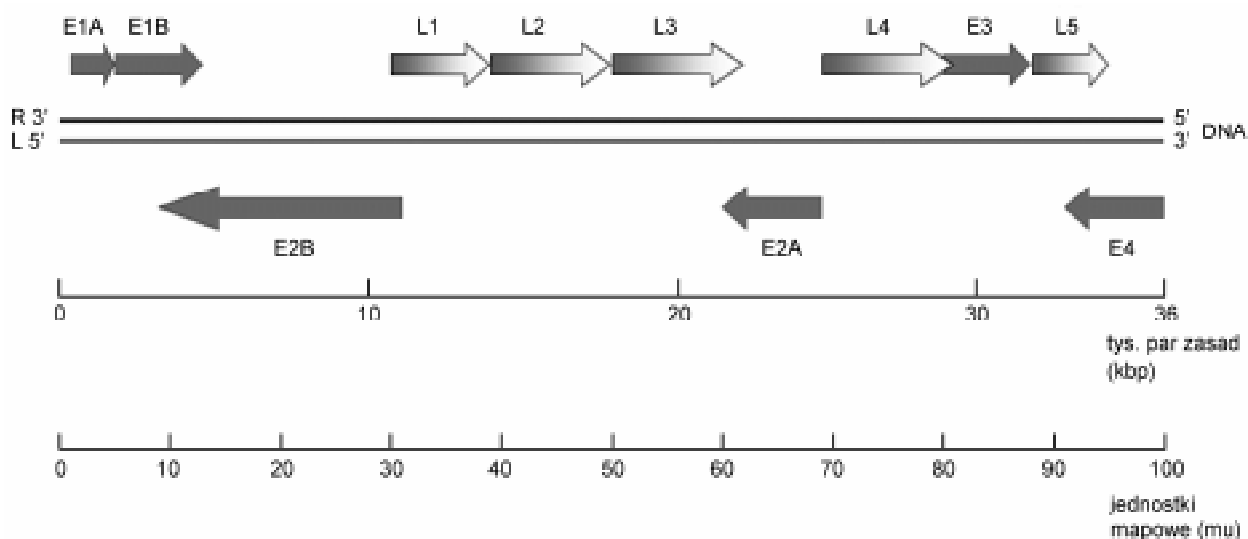
w wywoływaniu otyłości u ludzi – doniesienia te są jednak nieliczne i temat wymaga dalszych prac [2, 27]. Wirusy z podrodzaju E, wywołują natomiast głównie zakażenia dróg oddechowych, a w Europie oraz USA występują bardzo rzadko. W roku 1980 stwierdzono, że adenowirus wywołujący biegunkę wśród niemowląt należy do odrębnego podrodzaju określanego od-tąd jako podrodzaj F, do którego zaliczono tylko dwa adenowirusy AdV40 i AdV41 wywołujące zakażenia przez cały rok [3, 51].

## 2. Budowa adenowirusów

Kompletny wirion adenowirusów często opisywany jest jako zbliżony wyglądem do sztucznego satelity. Jest on zbudowany z pojedynczej dwuniciowej cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego o wielkości ok. 33–40 tysięcy par zasad, zamkniętej w kapsydie tworzącym swoisty płaszcz białkowy. Ikoseadralny

kapsyd składa się z 252 jednostek strukturalnych, z których 12 jest pentamerami a pozostałe heksamerami [54]. Na zakończeniu każdego z pentonów występuje wychodzące na zewnątrz cząstki wirusowej trimerowe białko, tzw. włókno [51]. Natomiast 240 heksonów tworzy boczne ściany i krawędzie cząstki wirusowej mającej od 70 do 100 nm średnicy. Obserwacje w mikroskopie elektronowym oraz krystalografia rentgenowska wykazały, iż genom adenowirusów przybiera postać ośmiu domen o charakterze formy superzwiniętej skondensowanej wokół białek. Często obrazuje się ją jako rozetę, na zewnątrz której występuje osiem pętli połączonych w centralnej części z białkami [51, 54].

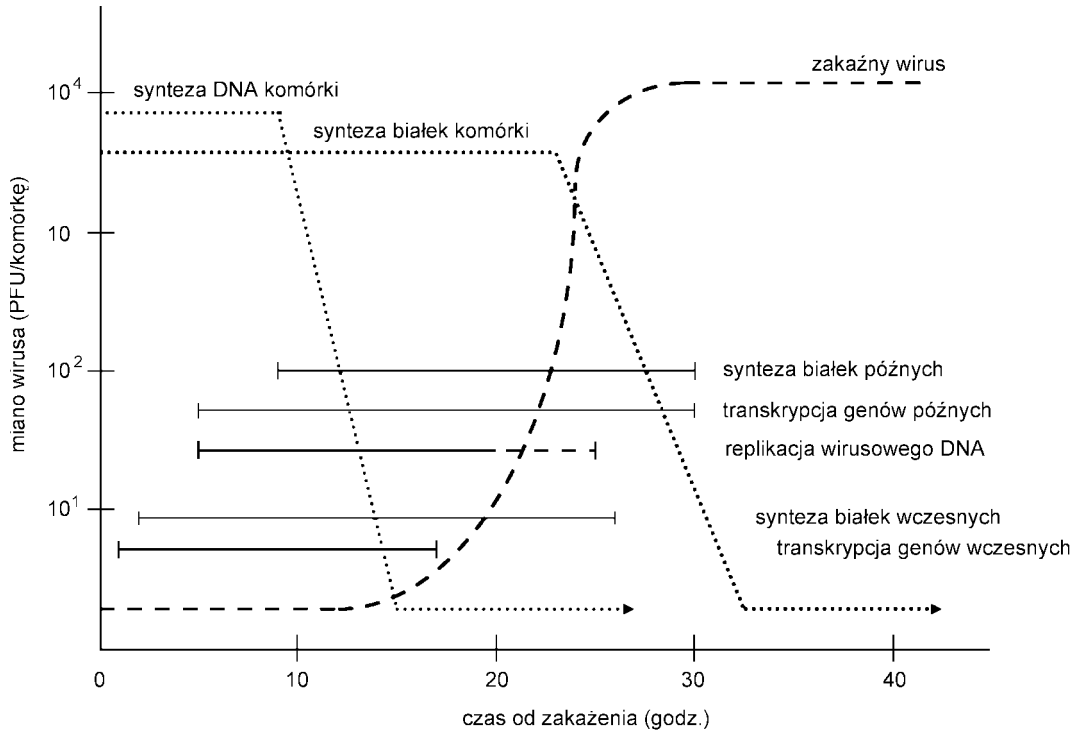
Zastosowanie różnorodnych metod genetycznych, jak również hybrydyzacji mRNA do fragmentów DNA wirusowego umożliwiło stworzenie mapy genomu adenowirusów. Białka wczesne odpowiedzialne za funkcje regulatorowe kodowane są przez ORF: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4. W genomie znajdują się również geny oznaczane od L1 do L5, które kodują 1–5 białek



Rys. 1. Mapa genomu adenowirusów na przykładzie AdV2.

Strzałki szare oznaczają geny z grupy wczesnych (E – early), których produkty pełnią działanie regulatorowe. Strzałki cieniowane oznaczają geny późne (L – late), kodujące białka strukturalne wirusa [25, 51, 55].





Rys. 2. Schemat cyklu życiowego adenowirusów na przykładzie linii komórkowej HeLa zakażonej AdV2 [48, 51].  
Widoczne szybkie tempo replikacji wirusa oraz jego negatywny wpływ na syntezę DNA i białek komórki zakażonej (za zgodą Wydawcy).

późnych pełniących funkcje strukturalne [25]. Szczególną uwagę poświęca się białkom E1A i E1B, które ze względu na możliwość łączenia się z białkami regulującymi cykl komórkowy gospodarza mogą odgrywać potencjalną rolę w powstawaniu nowotworów [51, 55]. Do chwili obecnej nie potwierdzono onkogenego wpływu adenowirusów na komórki ludzkie, zaś wszystkie obserwacje opierają się wyłącznie na pracach na modelach zwierzęcych [51].

Transkrypcja genomu adenowirusów przebiega w obrębie jądra zakażonej komórki w dwóch oddzielonych od siebie przedziałach czasowych, określanych jako fazy wczesne i późne. Fazy te rozdzielone są wyraźną przerwą, w której zachodzi replikacja wirusowego DNA. W fazie wczesnej z największą wydajnością wyrażane są geny dla E1A, E1B i E4, podczas gdy ekspresja późnych genów kierowana jest przez promotor (MLP) przebiega na minimalnym poziomie [57].

Po rozpoczęciu replikacji DNA wirusowego rozpoczyna się transkrypcja późnych genów. W wyniku tego procesu powstaje pięć kaset transkryptów oznaczonych od L1 do L5 syntetyzowanych w wyniku skomplikowanej obróbki pierwotnego transkryptu przebiegającej na drodze splicingu. Po rozpoczęciu replikacji DNA dochodzi do wysokiej ekspresji genów IVa2 i pIX, a promotor MLP ulega odblokowaniu i aktywacji oraz następuje zahamowanie ekspresji wczesnych genów. Ogólnie przyjmuje się, że rozpoczęcie procesu replikacji DNA wyznacza granicę pomiędzy transkrypcją dwóch klas mRNA – wczesnych i późnych. Powstające cząsteczki mRNA służą jako matryca do

wytworzenia białek strukturalnych oraz białek biorących udział w procesie pakowania DNA i dojrzewania cząstek wirusowych w jądrze komórkowym [57].

### 3. Zakażenia górnych dróg oddechowych i zapalenia płuc

Typowe adenowirusowe zapalenia gardła i górnych dróg oddechowych dotyczą głównie dzieci pomiędzy 6 miesiącem a 5 rokiem życia i powodują zazwyczaj łagodne, samoograniczające się schorzenia, często jednak przebiegające z wysoką gorączką [5, 20]. Klinicznie nie są one odróżnialne od podobnych infekcji o etiologii wirusowej [5]. W badaniach laboratoryjnych wykryć można natomiast: leukocytozę powyżej 15 000 komórek/ml, OB > 30 mm/godz. oraz podwyższony poziom białka C-reaktywnego w surowicy. Wszystkie te parametry są atypowe dla zakażeń ortowirusami [48].

Kolejnym schorzeniem powszechnie wywoływanym przez AdV (19% wszystkich przypadków) jest zapalenie migdałków podniebiennych. W tym przypadku rutynowe badania laboratoryjne są zwodnicze, gdyż podobne wyniki obserwuje się przy zakażeniach streptokokami [48]. Podstawową różnicą jest wiek pacjenta – infekcje adenowirusowe najczęściej obserwuje się u dzieci poniżej 3 roku życia, zaś zapalenia o etiologii bakteryjnej spotyka się zwłaszcza u osób pomiędzy 5 a 17 rokiem. Zakażenia adenowirusowe powodują także powstawanie na błonach śluzowych

gardła i migdałków charakterystycznych delikatnych nalotów o białawej barwie [44, 48].

Około 20% zapaleń płuc u pacjentów pediatrycznych wiązanych jest z zakażeniem adenowirusami. Najczęściej izolowanymi z tych przypadków serotypami są typy: 7, 21 oraz 3 [40]. Adenowirusowe zapalenie płuc jest klinicznie nierozróżnialne od chorób płuc wywołanych przez inne rodziny wirusów. W obrazie rentgenowskim widoczne są rozproszone obszary przejaśnień oraz cechy niedodmy płuc [21], podobne do obserwowanych przy zakażeniach powodowanych przez *Mycoplasma pneumoniae*. Śmiertelność u dzieci może być wysoka i dochodzić do 30%. Szczególnie niebezpieczne następstwa może mieć zakażenie AdV7, bowiem 27 do 65% pacjentów wykazuje objawy trwałego uszkodzenia płuc [23, 53]. Czynnikiem predysponującym są młody wiek oraz współistniejące zakażenie wirusem odry, którego przejściowe działanie supresyjne na odpowiedź typu komórkowego ułatwia namnażanie adenowirusów [48].

Grupą, w której adenowirusowe zakażenia dróg oddechowych niosą szczególne zagrożenie życia są pacjenci po zabiegach transplantacyjnych, zwłaszcza po przeszczepach szpiku [10]. Infekcje adenowirusowe u dorosłych obserwuje się częściej w późnym okresie pooperacyjnym (>90 dnia) i wykrywa u około 14% pacjentów [34]. Istotnym czynnikiem ryzyka jest ostra postać choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (Graft versus Host Disease – GvHD), współistniejące zakażenia herpeswirusami (zwłaszcza wirusem cytomegalii) oraz izolowanie adenowirusów z rozmaitych materiałów klinicznych [17]. Mimo prób stosowania terapii przeciwwirusowej częstotliwość zgonów jest wysoka i może sięgać 50% [17, 24]

Ze względu na możliwość wystąpienia przy zapaleniu płuc o etiologii adenowirusowej objawów sugerujących zakażenie bakteryjne, powszechne jest stosowanie antybiotyków. Działanie takie jest zbędne i nie przynosi żadnych korzyści terapeutycznych – o jego częstotliwości może zaś świadczyć, że w czterech przeprowadzanych badaniach do 86% pacjentów z infekcją wywołaną przez adenowirusy początkowo poddanych było antybiotykoterapii [48, 58].

#### 4. Okulistyczne następstwa zakażenia adenowirusami

Jednym z najwcześniej opisanych skutków zakażenia wywołanego przez przedstawicieli rodziny *Adenoviridae* jest adenowirusowe zapalenie rogówki. Choroba dotyczy głównie dorosłych i jest wywoływana przez typy 8, 19 oraz 37, należące do podgrupy D [18]. Epidemie są stwierdzane zazwyczaj na terenie fabryk, szpitali, baz wojskowych i innych dużych, od-

izolowanych skupisk ludzkich [15, 50]. Wirus przenosi się przez dotyk nieumytych rąk personelu medycznego lub niedostatecznie odkażone płyny i instrumenty okulistyczne [28]. Sporadycznie źródłem zakażenia może być kontakt z ręcznikami, gdzie wirus w formie aktywnej potrafi przetrwać do kilku tygodni [18].

Pierwotnymi objawami choroby są ból, łzawienie, światłowstręt i zapalenie spojówek. Po 3–4 dniach pojawiają się na rogówce pierwsze punktowe zmiany, które zazwyczaj zanikają samoistnie po upływie następnym 2 tygodni [8]. Przypadki dłużej trwających zakażeń, które prowadzą do trwałych zmian w oku są sporadyczne i dotyczą głównie pacjentów z nieprawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym.

#### 5. Zakażenia układu pokarmowego

Adenowirusy wykrywane są w od 4 do 15% próbek kału pobranych od dzieci z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi [6] i są drugim w kolejności, po rotawirusach, czynnikiem etiologicznym biegunek u pacjentów pediatrycznych. Najczęściej wykrywanymi są serotypy 40 i 41 [30, 56], należące do podgrupy F, choć udaje się izolować z próbek kału także AdV1, 3, 7 i 31 [30].

Biegunki adenowirusowe dotyczą głównie dzieci do 2 lat, bowiem u większości pacjentów w wieku lat 4 wykrywane są przeciwciała skierowane przeciwko AdV40 i 41 [29]. Stolce są zazwyczaj wodniste, bez krwawych podbiegnięć. Pasma śluzu wykrywa się w 19–57% przypadków. Ilość dziennych wypróżnień może sięgać 15, choć zazwyczaj jest mniejsza. Biegunka o wywołania przez *Adenoviridae* trwa najczęściej do 11 dni, zauważalnie dłużej od choroby wywołanej przez rotawirusy [29]. Typowa dla jej przebiegu jest także zauważalna gorączka oraz wymioty. W przeciwieństwie do zakażeń rotawirusami rzadkie są infekcje w obrębie jednej rodziny.

Zakażenia układu pokarmowego wywołane przez enterotropowe szczepy adenowirusów są zazwyczaj łagodne, z tendencjami do samoograniczenia. Możliwe są jednak przypadki ciężkie, które prowadzą do zejść śmiertelnych – dotyczą one głównie pacjentów poddanych immunosupresji [19, 26] i osób z AIDS [14, 43].

#### 6. Krwotoczne zapalenia pęcherza

Adenowirusy, zwłaszcza typ 11, są podstawowym czynnikiem etiologicznym krwotocznych zapaleń pęcherza dzieci [52]. Choroba ta występuje częściej u chłopców niż u dziewczynek i manifestuje się krwio- i częstomoczem, ze współistniejącą gorączką. U pacjentów tych nie ma podwyższonego poziomu kreatyniny w surowicy, a w wirusologicznym badaniu moczu ob-

serwuje się złuszczone komórki nabłonka, w których metodami immunofluorescencyjnymi wykryć można antygeny adenowirusów [48]. Wirusa łatwo także wyizolować z moczu w hodowlach komórkowych.

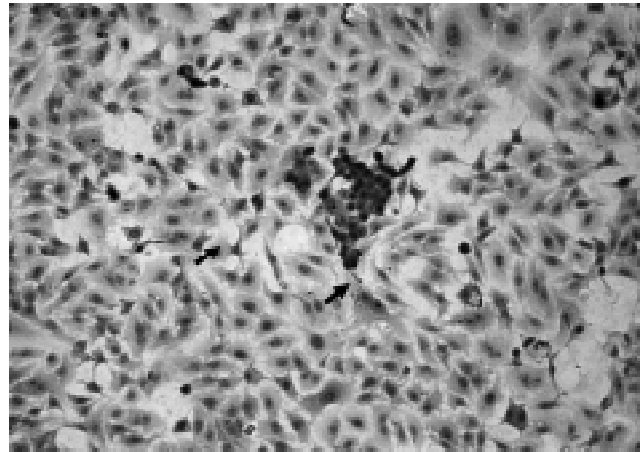
Znacznie cięższy przebieg mają adenowirusowe zapalenia pęcherza u pacjentów po przeszczepie komórek krwiotwórczych oraz transplantacjach narządów unaczynionych. Zakażenia te występują dość rzadko – wykrywa się je zaledwie u 0,3–1% osób poddanych przeszczepowi szpiku [17] oraz u 4–10% pacjentów po przeszczepie wątroby [38]. Czynnikiem ryzyka są w tym przypadku płeć żeńska, dodatni poziom przeciwciał antyadenowirusowych oraz ostra choroba przeszczep przeciw gospodarzowi. Szczyt częstotliwości jej występowania pojawia się w 3–4 tygodniu po operacji. Choroba trwa około 2–4 tygodni i przebiega podobnie do opisywanej u dzieci, jednak u większości chorych obserwuje się podwyższony poziom kreatyniny. Pozytywne wyniki daje leczenie pulsem sterydowym (do 3 tygodni) [22], dożylne podawanie cidofowiru oraz obniżenie stosowanych dawek leków immunosupresyjnych [41].

## 7. Neuroinfekcje powodowane przez adenowirusy

Neurologiczne powikłania zakażeń adenowirusami są rzadkie; niosą jednak ze sobą wysokie ryzyko zgonu. Adenowirusy były izolowane zarówno z płynu mózgowo-rdzeniowego, jak i biopłatów tkanek mózgowych, głównie od pacjentów z *meningoencephalitis* [11]. Choroba częściej dotyczy noworodków [46] oraz osób z niewydolnością układu immunologicznego [16]. W diagnostyce ważne jest zastosowanie testów biologii molekularnej, gdyż ze względu na niskie miana wirusa w badanych materiałach metody konwencjonalne często dysponują zbyt niską czułością.

## 8. Diagnostyka zakażeń ludzkimi adenowirusami

Ze względu na dobre namnażanie się adenowirusów w warunkach hodowli komórkowych przez długie lata stanowiła ona „złoty standard” w diagnostyce zakażeń AdV. Do namnażania adenowirusów używa się głównie ustalonych linii HEp-2, HeLa oraz A549 lub pierwotnych hodowli nerki małpiej. Specyficzny efekt cytopatyczny pojawia się najczęściej w ciągu od 5 do 14 dni [31]. Wyjątek stanowią wirusy należące do podgrupy F, których namnażanie *in vitro* stanowi wciąż poważny problem. Najlepszy ich wzrost osiąga się w linii Graham 239, która jest wyprowadzona z embrionalnych komórek ludzkiej nerki transformowanych DNA adenowirusa typu 5. Materiałem stosowanym do zakażenia linii komórkowych mogą być



Rys. 3. Typowy rozproszony efekt cytopatyczny wywołany przez adenowirusa typu 5 (AdV5) w hodowli komórkowej linii A549. Strzałki wskazują komórki zniszczone działaniem wirusa. Powiększenie mikroskopu x400.

rozmaite próbki kliniczne, jak mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, surowica krwi oraz próbki tkanek [48].

Z metod serologicznych najpowszechniej stosowane są testy aglutynacji lateksowej do wykrywania adenowirusów biegunkowych [56], metody immunofluorescencyjnej detekcji antygenów [13, 32] oraz testy ELISA do określania miana przeciwciał w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym [37]. Stwierdzenie występowania przeciwciał klasy IgM (markerów świeżo przebytego zakażenia) ma wysoką wartość diagnostyczną, bowiem przeciwciała klasy IgG ze względu na rozpowszechnienie adenowirusów w populacji ludzkiej są mniej istotne i są głównie używane do określania statusu immunologicznego pacjentów oraz do monitorowania przebiegu zakażenia i terapii.

Ze względu na coraz częstsze stwierdzanie zakażeń adenowirusami wśród osób poddanych immunosupresji, niezbędne stało się wprowadzenie do diagnostyki metod biologii molekularnej. Historycznie pierwszymi były testy oparte na hybrydyzacji kwasów nukleinowych [45], lecz ze względu na czaso- i materiałochłonność nie zyskały one szerokiej popularności. Zdecydowanie większe zastosowanie diagnostyczne w wykrywaniu adenowirusów ma reakcja łańcuchowej polimeryzacji (PCR) [1]. Konwencjonalne testy PCR mają jednak ograniczoną czułość, która utrudnia detekcję wirusa w tych materiałach klinicznych, gdzie poziom wirusa osiąga niskie miana – zwłaszcza w płynie mózgowo-rdzeniowym. Metody te służą głównie do stwierdzania obecności wirusa w hodowli komórkowej przed wystąpieniem specyficznego efektu cytopatycznego i stopniowo są zastępowane przez czulszy wariant, jakim jest real-time PCR [32]. Technika ta stała się obecnie najlepszym testem w diagnostyce zakażeń adenowirusami, zwłaszcza w przypadkach neurologicznych oraz u pacjentów poddanych immunosupresji [12].

Jej szybkość wykonania i wysoka czułość umożliwiają wykrycie wirusa na niskim poziomie i wdrożenie odpowiedniego leczenia [35].

## 9. Leczenie chorób o etiologii adenowirusowej

W chwili obecnej nie ma skutecznej terapii, która byłaby specyficzna dla zakażeń wywoływanych przez adenowirusy – na szczęście konieczność jej stosowania dotyczy niemal wyłącznie pacjentów z dysfunkcjami układu odpornościowego [35, 59]. Cidofowir i rybawiryna wykazują wprawdzie działanie przeciwwirusowe w warunkach *in vitro*. Brak jest przeprowadzonych pełnych badań klinicznych, które udowodniłyby ich przydatność w leczeniu *in vivo*. Nieliczne dostępne dane literaturowe podają informacje o skutecznym wyniku dożylnego leczenia rybawiryną adenowirusowego zapalenia płuc u pacjentów pediatrycznych [7], podobnie jak krwotocznego zapalenia pęcherza u biorców przeszczepów [9]. Inni autorzy uważają jednak rybawirynę za preparat nieskuteczny w leczeniu pacjentów po zabiegach transplantacyjnych [33, 39]. W grupie tej sugerowana jest raczej kuracja cidofowirem, jako lekiem o większej skuteczności przeciw adenowirusom *ex vivo* [4, 35, 42]. Brak jest jednak danych o poziomie kopijności wirusa w czasie i po zakończeniu terapii, co mogłoby jednoznacznie potwierdzić efektywność prowadzonego leczenia.

## 10. Zapobieganie i profilaktyka

Ze względu na typowe dla adenowirusów przeniesienie drogą fekalno-oralną, jedną z najskuteczniejszych metod zapobiegania ich transmisji jest częste mycie rąk i przedmiotów po kontakcie z chorym. Do odkażania należy stosować 60% etanol, który wykazuje wysoką skuteczność działania wobec AdV [49], w przeciwieństwie do izopropanolu czy chlorheksydyny [18].

W przypadku zakażeń szpitalnych sugerowane jest odizolowanie zakażonych pacjentów, jak również noszenie pełnego ubioru ochronnego przez personel medyczny. Należy ponadto bezwzględnie przestrzegać nakazu noszenia jednorazowych rękawiczek oraz okularów, w celu zapobieżenia przypadkom zapaleń rogówki spowodowanych przez adenowirusy. Do dezynfekcji powierzchni zalecany jest roztwór chloraminy T [18].

W 1971 roku została wprowadzona na rynek amerykański szczepionka doustna zawierająca żywego, nieatenuowanego wirusa, serotypów 4 i 7. Niespecyficzne namnażenie wirusów w komórkach nabłonka jelita cienkiego nie powodowało objawów chorobowych, a skutkowało wytworzeniem specyficznej odpowiedzi humoralnej [48]. Program szczepień wdrożono w USA

początkowo dla dzieci i młodych mężczyzn w dużych zbiorowiskach. Jego zastosowanie obniżyło wśród żołnierzy armii amerykańskiej częstotliwość zakażeń adenowirusami o 95–99%, a ogólną ilość infekcji dróg oddechowych o 50–60% [36]. Ze względu na liczne działania niepożądane oraz brak możliwości jej stosowania u osób z niedoborami immunologicznymi, została ona wycofana z użycia. Do chwili obecnej brak jest nowoczesnych i bezpiecznych u użyciu szczepionek podjednostkowych, zwłaszcza skierowanym przeciwko wariantom biegunkowym AdV40 i 41, niezwykle istotnym z pediatrycznego punktu widzenia [48].

## 11. Podsumowanie

Rozwój transplantologii, zarówno w dziedzinie przeszczepów narządów unaczynionych i komórek krwiotwórczych powoduje, że w związku z wytworzoną głęboką immunosupresją zakażenia ludzkimi adenowirusami mogą przebiegać częściej i z nasilonymi objawami. Dodatkowo w grupie pacjentów z obniżoną wydolnością układu immunologicznego poważnym problemem stają się infekcje mieszane, spowodowane przez nadkażenia bakteryjne.

Choć w większości przypadków zakażeń u osób z prawidłową czynnością układu odpornościowego zakażenia adenowirusowe nie wymagają leczenia, brak jest niestety zweryfikowanych skutecznych form terapii przeciwwirusowej. Dostępna do 2001 roku szczepionka zapobiegała wyłącznie zakażeniom adenowirusami wywołującymi infekcje oddechowe i zawierała żywe wiriony – z tego też powodu nie było możliwe stosowanie jej u pacjentów poddanych immunosupresji. Nie eliminowała także zagrożenia ze strony adenowirusów biegunkowych należących do podgrupy F, które są największym zagrożeniem dla dzieci. Tym bardziej konieczne jest zastosowanie najczulszych metod diagnostycznych w celu ograniczenia ryzyka rozprzestrzeniania się chorób o etiologii adenowirusowej.

## Piśmiennictwo

1. Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G.: Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2659–2667 (1990)
2. Atkinson R.L.: Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clin. Proc.* **82**, 1192–1198 (2007)
3. Benkó M., Harrach B., Both G.W., Russell W.C., Adair B.M., Ádám E., de Jong J.C., Hess M., Johnson M., Kajon A., Kidd A.H., Lehmkuhl H.D., Li Q.-G., Mautner V., Pring-Akerblom P., Wadell G.: Family *Adenoviridae*, [w:] Virus taxonomy. VIII th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (red.), Academic Press, New York, N.Y. 2004, s. 1162

4. Bordigoni P., Carret A.S., Venard V., Witz F., Le Faou A.: Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1290–1297 (2001)
5. Brandt C.D., Kim H.W., Vargosko A., Jeffries B., Arrobio J., Rindge B., Parrott R., Chanock R.: Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am. J. Epidemiol.* **90**, 485–500 (1969)
6. Brandt C.D., Kim H.W., Rodriguez W.J., Arrobio J.O., Jeffries B.C., Stallings E.P., Lewis C., Miles A.J., Gardner M.K., Parrott R.H.: Adenoviruses and pediatric gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **151**, 437–443 (1985)
7. Buchdahl R.M., Taylor P., Warner J.D.: Nebulised ribavirin for adenovirus pneumonia. *Lancet*, **2**, 1070–1071 (1985)
8. Butt A.L., Chodosh J.: Adenoviral keratoconjunctivitis in a tertiary care eye clinic. *Cornea*, **25**, 199–202 (2006)
9. Cassano W.F.: Intravenous ribavirin therapy for adenovirus cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **7**, 247–248 (1991)
10. Chakrabarti S., Mautner V., Osman H., Collingham K.E., Fegan C.D., Klapper P.E., Moss P.A., Milligan D.W.: Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood*, **100**, 1619–1627 (2002)
11. Chatterjee N.K., Samsonoff W.A., Balasubramaniam N., Rush-Wilson K., Spargo W., Church T.M.: Isolation and characterization of adenovirus 5 from the brain of an infant with fatal cerebral edema. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 830–833 (2000)
12. Claas E.C., Schilham M.W., de Brouwer C.S., Hubacek P., Echavarría M., Lankester A.C., van Tol M.J., Kroes A.C.: Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1738–1744 (2005)
13. Darougar S., Walpita P., Thaker U., Viswalingam N., Wishart M.S.: Rapid culture test for adenovirus isolation. *Br. J. Ophthalmol.* **68**, 405–408 (1984)
14. Dionisio D., Arista S., Vizzi E., Manneschi L.I., Di Lollo S., Trotta M., Sterrantino G., Mininni S., Leoncini F.: Chronic intestinal infection due to subgroup F type 40 adenovirus in a patient with AIDS. *Scand. J. Infect. Dis.* **29**, 305–307 (1997)
15. Dominguez-Berjon M.F., Hernando-Briongos P., Miguel-Arroyo P.J., Echevarria J.E., Casas I.: Adenovirus transmission in a nursing home: analysis of an epidemic outbreak of keratoconjunctivitis. *Gerontology*, **53**, 250–254 (2007)
16. Fianchi L., Scardocci A., Cattani P., Tartaglione T., Pagano L.: Adenovirus meningoencephalitis in a patient with large B-cell lymphoma. *Ann. Hematol.* **82**, 313–315 (2003)
17. Flomenberg P., Babbitt J., Drobyski W.R., Ash R.C., Carrigan D.R., Sedmak G.V., McAuliffe T., Camitta B., Horowitz M.M., Bunin N.: Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **169**, 775–781 (1994)
18. Ford E., Nelson K.E., Warren D.: Epidemiology of epidemic keratoconjunctivitis. *Epidemiol. Rev.* **9**, 244–261 (1987)
19. Forrest G.: Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 16–21 (2004)
20. Gray G.C., Goswami P.R., Malasig M.D., Hawksworth A.W., Trump D.H., Ryan M.A., Schnurr D.P.: Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 663–670 (2000)
21. Han B.K., Son J.A., Yoon H.K., Lee S.I.: Epidemic adenoviral lower respiratory tract infection in pediatric patients: radiographic and clinical characteristics. *Am. J. Roentgenol.* **170**, 1077–1080 (1998)
22. Hofland C.A., Eron L.J., Washecka R.M.: Hemorrhagic adenovirus cystitis after renal transplantation. *Transplant. Proc.* **36**, 3025–3027 (2004)
23. Hong J.Y., Lee H.J., Piedra P.A., Choi E.H., Park K.H., Koh Y.Y., Kim W.S.: Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1423–1429 (2001)
24. Ikegame K., Takimoto T., Takahashi R., Murakami M., Tamaki H., Fujioka T., Kawakami M., Hirabayashi N., Soma T., Sugiyama H., Ogawa H.: Lethal adenovirus infection in a patient who had undergone nonmyeloablative stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.* **74**, 95–100 (2001)
25. Imperiale M.J., Akusjnarvi G., Leppard K.N.: Post-transcriptional control of adenovirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 139–171 (1995)
26. Jalal H., Bibby D.F., Tang J.W., Bennett J., Kyriakou C., Peggs K., Cubitt D., Brink N.S., Ward K.N., Tedder R.S.: First reported outbreak of diarrhea due to adenovirus infection in a hematology unit for adults. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2575–2580 (2005)
27. Jaworowska A., Bazylak G.: Infekcje wirusowe w etiologii rozwoju otyłości. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **60**, 227–236 (2006)
28. Koo D., Bouvier B., Wesley M., Courtright P., Reingold A.: Epidemic keratoconjunctivitis in a university medical center ophthalmology clinic; need for re-evaluation of the design and disinfection of instruments. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **10**, 547–552 (1989)
29. Kotloff K.L., Losonsky G.A., Morris J.G. Jr, Wasserman S.S., Singh-Naz N., Levine M.M.: Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. *Pediatrics*, **84**, 219–225 (1989)
30. Krajden M., Brown M., Petrasko A., Middleton P.J.: Clinical features of adenovirus enteritis: a review of 127 cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, 636–641 (1990)
31. Krisher K.K., Menegus M.A.: Evaluation of three types of cell culture for recovery of adenovirus from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1323–1324 (1987)
32. Kuypers J., Wright N., Ferrenberg J., Huang M.L., Cent A., Corey L., Morrow R.: Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2382–2388 (2006)
33. La Rosa A.M., Champlin R.E., Mirza N., Gajewski J., Giralt S., Rolston K.V., Raad I., Jacobson K., Kontoyiannis D., Elting L., Whimbey E.: Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 871–876 (2001)
34. Leen A.M., Bollard C.M., Myers G.D., Rooney C.M.: Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**, 243–251 (2006)
35. Lenaerts L., Naesens L.: Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res.* **71**, 172–180 (2006)
36. McNeill K.M., Hendrix R.M., Lindner J.L., Benton F.R., Monteith S.C., Tuchs Cheres M.A., Gray G.C., Gaydos J.C.: Large, persistent epidemic of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease in U.S. army trainees. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 798–801 (1999)
37. Meurman O., Ruuskanen O., Sarkkinen H.: Immunoassay diagnosis of adenovirus infections in children. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1190–1195 (1983)

38. Michaels M.G., Green M., Wald E.R., Starzl T.E.: Adenovirus infection in pediatric liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **165**, 170–174 (1992)
39. Morfin F., Dupuis-Girod S., Mundweiler S., Falcon D., Carrington D., Sedlacek P., Bierings M., Cetkovsky P., Kroes A.C., van Tol M.J., Thouvenot D.: In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir Ther.* **10**, 225–229 (2005)
40. Munoz F.M., Piedra P.A., Demmler G.J.: Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. *Clin. Infect. Dis.* **127**, 1194–1200 (1998)
41. Nagafuji K., Aoki K., Henzan H., Kato K., Miyamoto T., Eto T., Nagatoshi Y., Ohba T., Obama K., Gondo H., Harada M.: Cidofovir for treating adenoviral hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **34**, 909–914 (2004)
42. Neofytos D., Ojha A., Mookerjee B., Wagner J., Filicko J., Ferber A., Dessain S., Grosso D., Brunner J., Flomenberg N., Flomenberg P.: Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 74–81 (2007)
43. Pollok R.C., Farthing M.J.: Enteric viruses in HIV-related diarrhoea. *Mol. Med. Today*, **6**, 483–487 (2000)
44. Putto-Laurila A., Mertsola J., Ruuskanen O.: Viral causes of tonsillitis and fever unresponsive to antibiotic therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 71–72 (1999)
45. Ranki M., Virtanen M., Palva A., Laaksonen M., Pettersson R., Kaariainen L., Halonen P., Soderlund H.: Nucleic acid sandwich hybridization in adenovirus diagnosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **104**, 307–318 (1983)
46. Rieger-Fackeldey E., Aumeier S., Genzel-Boroviczeny O.: Disseminated adenovirus infection in two premature infants. *Infection*, **28**, 237–239 (2000)
47. Rowe W.P., Huebner R.J., Gilmore L.K.: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**, 570–573 (1953)
48. Ruuskanen O., Meurman O., Akusjärvi G.: Adenoviruses. [w:] *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (red.) ASM Press, Washington 2002, s. 515–535
49. Sattar S.A., Abebe M., Bueti A.J., Jampani H., Newman J., Hua S.: Activity of an alcohol-based hand gel against human adeno-, rhino-, and rotaviruses using the fingerpad method. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **21**, 516–519 (2000)
50. Schrauder A., Altmann D., Laude G., Claus H., Wegner K., Kohler R., Habicht-Thomas H., Krause G.: Epidemic conjunctivitis in Germany, 2004. *Euro Surveill.* **11**, 185–187 (2006)
51. Shenk T.: Adenoviridae: The viruses and their replication. [w:] *Fundamental virology*. Knipe D.M., Howley P.M. (red.) Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia 2001, s. 1053–1088.
52. Shindo K., Kitayama T., Ura T., Matsuya F., Kusaba Y., Kanetake H., Saito Y.: Acute hemorrhagic cystitis caused by adenovirus type 11 after renal transplantation. *Urol. Int.* **41**, 152–155 (1986)
53. Similä S., Linna O., Lanning P., Heikkinen E., Ala-Houhala M.: Chronic lung damage caused by adenovirus type 7: a ten-year follow-up study. *Chest*, **80**, 127–131 (1981)
54. Stewart P.L., Burnett R.M.: Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 25–38 (1995)
55. Strauss J.H., Strauss E.G.: Family Adenoviridae. [w:] *Viruses and human disease*. Strauss J.H., Strauss E.G. (red.) Academic Press, San Diego 2002, s. 253–259
56. Uhnoo I., Wadell G., Svensson L., Johansson M.E.: Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 365–372 (1984)
57. Van der Vliet P.C.: Adenovirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 1–30 (1995)
58. Van Lierde S., Corbeel L., Eggermont E.: Clinical and laboratory findings in children with adenovirus infections. *Eur. J. Pediatr.* **148**, 423–425 (1989)
59. van Tol M.J., Claas E.C., Heemskerk B., Veltrop-Duits L.A., de Brouwer C.S., van Vreeswijk T., Sombroek C.C., Kroes A.C., Beersma M.F., de Klerk E.P., Egeler R.M., Lankester A.C., Schilham M.W.: Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant.* **35**, S73–76 (2005)

Adrian Reśliński, Joanna Kwiecińska, Eugenia Gospodarek

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz  
tel. (52) 585 40 470, e-mail: kizmikrob@cm.umk.pl

Wpłynęło listopad 2007

1. Wstęp. 2. Przebieg apoptozy. 3. Hamowanie apoptozy przez bakterie. 3.1. Bezpośrednie oddziaływanie z elementami szlaku apoptozy. 3.2.1. Udział czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. 3.2.2. Udział szlaku PI3K/Akt. 4. Podsumowanie

### Bacterial antiapoptotic properties

**Abstract:** Apoptosis or programmed cell death is an active, genetically controlled process. It is an integral part of life that maintains homeostasis in multicellular organisms. In contrast to necrosis, apoptosis allows the organism to eliminate unnecessary or damaged cells without an inflammatory reaction.

Programmed cell death also plays an important role in the pathogenesis of various infectious diseases. There is much evidence, that bacteria have the ability to induce and/or block apoptosis. Bacteria can inhibit programmed cell death in a direct or indirect way. In the first case, bacteria directly interact with the apoptotic pathway. Indirect effect on apoptosis is mediated through signal transduction pathways inside the host cell such as the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathways.

Many mechanisms by which bacterial pathogens inhibit the host cell apoptotic pathways are not fully understood. Further studies are necessary for a better understanding of the host-pathogen relationship.

1. Introduction. 2. Course of apoptosis. 3. Inhibition of apoptosis by bacteria. 3.1. Direct interaction with the elements of an apoptotic pathway. 3.2.1. Contribution of nuclear factor NF- $\kappa$ B. 3.2.2. Contribution of PI3K/Akt pathway. 4. Summary

---

**Słowa kluczowe:** apoptoza, czynnik jądrowy NF- $\kappa$ B, szlak PI3K/Akt

**Key words:** apoptosis, nuclear factor NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt pathway

---

## 1. Wstęp

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki jest procesem umożliwiającym utrzymanie homeostazy w organizmach wielokomórkowych. Uczestniczy w wielu procesach: w usuwaniu komórek z nieodwracalnie uszkodzonym DNA, ontogenezie, odnowie tkankowej czy odpowiedzi immunologicznej. W odróżnieniu od martwicy, nie wywołuje odczynu zapalnego w trakcie usuwania komórek [6].

Apoptoza wpływa także na patogenezę chorób zakaźnych. Bakterie wykształciły wiele mechanizmów indukujących zaprogramowaną śmierć zakażonych komórek [69, 76]. W ostatnich latach pojawiły się liczne dowody wskazujące na to, że drobnoustroje wykazują właściwości antyapoptotyczne. Konsekwencją tego może być nabywanie przez zakażone komórki cech nowotworowych, co obserwuje się w przypadku zakażeń z udziałem *Helicobacter pylori* [67] lub *Chlamydia trachomatis* [33]. Prawdopodobnie działanie antyapoptotyczne *Neisseria meningitidis* jest jednym z mechanizmów modyfikujących odpowiedź immunologiczną zakażonego organizmu. Umożliwia tym bakteriom adaptację do warunków panujących w komórkach gospodarza i dalszy rozwój zakażenia [46]. Podobne znaczenie mają właściwości antyapoptotyczne *Salmonella Typhimurium* [32]. Wykazano, że hamowanie apoptozy

monocytów przez bakterie *Bartonella henselae* prowadzi do przedłużonego wytwarzania czynnika wzrostu VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*), mającego znaczenie w patogenezie takich chorób jak naczyniowatość bakteryjna czy płamica wątrobowa [30].

## 2. Przebieg apoptozy

Apoptoza jest złożonym procesem, któremu może podlegać właściwie każda komórka organizmu. Jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania każdego organizmu. Podlega szeregowi regulacji, również ze strony bakterii lub ich metabolitów.

Do zapoczątkowania apoptozy niezbędna jest inicjacja, która może przebiegać jedną z dwóch głównych dróg: zewnątrzpochodną, do których zaliczana jest ścieżka receptorowa i szlak zależny od perforyn i granzymów oraz wewnątrzpochodną, zależną od mitochondrium lub siateczki śródplazmatycznej [25].

Droga zewnątrzpochodna wymaga połączenia ligandu z odpowiednim receptorem na powierzchni komórki docelowej. Z tego powodu określana jest mianem receptorowej. Do receptorów, które biorą udział w tej drodze inicjacji apoptozy, należą: Fas, TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*), TNFR (*tumor necrosis factor receptor*). Ich charakterystyczną cechą

jest obecność domeny śmierci (*death domain*, DD). W wyniku połączenia receptora z ligandem dochodzi do jego oligomeryzacji i rekrutacji białek adaptorowych związanych z DD Fas (*adaptor protein Fas-associated death domain*, FADD), które razem z prokaspazą-8 tworzą kompleks DISC (*death-inducing signaling complex*). DISC ma zdolność proteolizy zymogenu kaspazy-8 do jej aktywnej formy, co uruchamia kaskadę kaspaz [25].

W drodze wewnątrzprochodnej w inicjacji apoptozy biorą udział cząsteczki, które znajdują się w obrębie mitochondrium, a od cytoplazmy komórkowej oddziela je podwójna błona mitochondrialna. Zaburzenia w polaryzacji tej błony wywołują zmiany przepuszczalności, m.in. dla cząsteczek cytochromu c, białka Smac/DIABLO (*second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI*, Smac/DIABLO).

Za utrzymanie właściwej polaryzacji błon mitochondrialnych odpowiadają białka z rodziny Bcl-2 (*B cell leukemia/lymphoma-2*, Bcl-2). Jedną grupą tych białek, do których należą Bcl-<sub>XL</sub>, Bcl-2, A1/Bfl-1, Mcl-1, zwiększa integralność błon mitochondrium. Białka Bak, Bok/Mtd, Bax, Bcl-<sub>XS</sub>, Bid, Bim/Bod, Bad, MAP-1, Bmf zaliczane są do drugiej grupy, którą określa się jako proapoptotyczne [41].

Po uwolnieniu cząsteczek cytochromu c do cytoplazmy, łączą się one z czynnikiem aktywującym proteazy apoptozy (*apoptosis protease-activating factor 1*, Apaf-1), ATP i prokaspazą-9. Dochodzi do aktywacji kaspazy-9, która zapoczątkowuje kaskadę kaspaz [25].

Trzecia ścieżka aktywacji apoptozy przebiega z udziałem perforyn, które są zlokalizowane w błonie komórkowej. Perforyny wiążą wybiórczo granzym B,

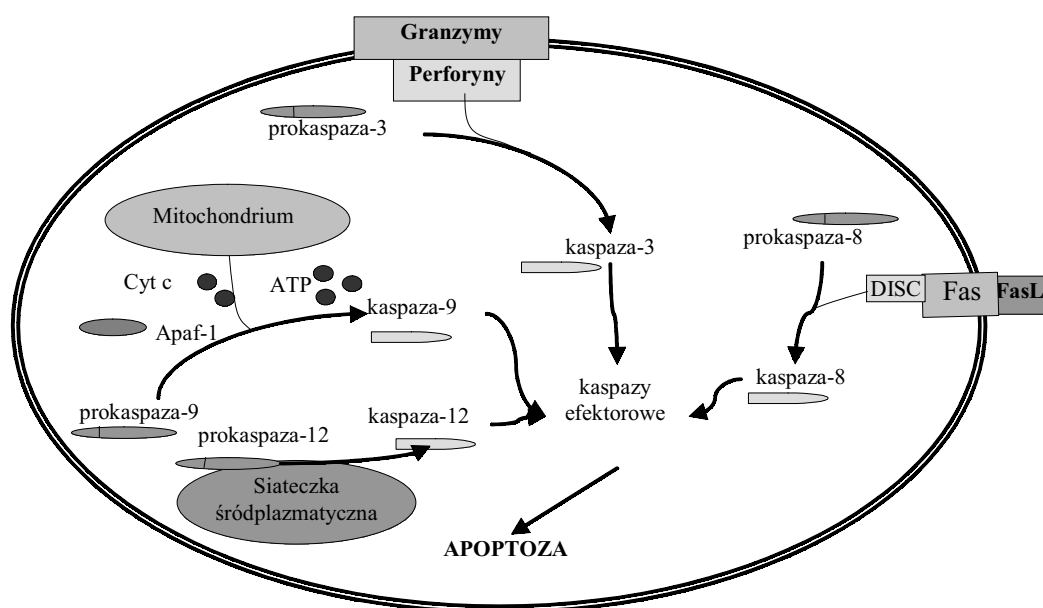
czego konsekwencją jest uszkodzenie błony komórkowej i uaktywnienie bezpośrednio kaspazy-3.

Czwarta ścieżka, zależna od siateczki śródplazmatycznej i zależna od aktywacji kaspazy-12 pozostaje nadal słabo poznana.

Bez względu na rodzaj drogi inicjacji, kolejne etapy apoptozy przebiegają jednakowo. Obejmują one aktywację kaspaz wykonawczych, do których zaliczane są kaspazy-3, -6, -7. W wyniku ich działania dochodzi do uaktywnienia białek odpowiedzialnych za kondensację i fragmentację DNA, zagęszczenie cytoplazmy i wytworzenie charakterystycznych dla apoptozy ciałek apoptotycznych, które zawierają elementy cytoplazmy, organelli komórkowych i chromatyny [25]. Schemat przebiegu apoptozy przedstawia rys. 1.

### 3. Hamowanie apoptozy przez bakterie

Bakterie wykształciły wiele mechanizmów hamujących apoptozę. Mogą wywierać bezpośredni lub pośredni wpływ na zaprogramowaną śmierć komórek. Pierwszą możliwością jest związana z bezpośrednim niszczeniem lub blokowaniem czynników uczestniczących w apoptozie. Natomiast działanie pośrednie jest zależne od szlaków przekąźnikowych zlokalizowanych wewnątrz zakażonej komórki takich, jak NF- $\kappa$ B czy PI3K/Akt. Są one aktywowane przez struktury bakteryjne wiążące się z receptorem na powierzchni komórki gospodarza lub przez substancje wytwarzane przez drobnoustroje i transportowane do ich wnętrza. Nie wszystkie mechanizmy są w pełni poznane, a wiele z nich opartych jest w dużym stopniu na hipotezach (tab. I).



Rys. 1. Przebieg apoptozy



Tabela I

Hamowanie apoptozy przez bakterie

Bezpośrednie oddziaływanie bakterii z elementami szlaku apoptozy	Pośredni wpływ na apoptozę	
	Udział czynnika jądrowego NF-κB	Udział szlaku PI3K/Akt
<i>Chlamydia trachomatis</i> [59, 70] <i>Neisseria gonorrhoeae</i> [3] <i>Mycobacterium tuberculosis</i> [1] <i>Neisseria meningitidis</i> [45, 46] <i>Escherichia coli</i> O103 [20] <i>Escherichia coli</i> K1 [68]	<i>Rickettsia rickettsii</i> [9] <i>Ehrlichia chaffeensis</i> [84] <i>Helicobacter pylori</i> [42, 56, 81] <i>Escherichia coli</i> [16] <i>Staphylococcus epidermidis</i> [48] <i>Staphylococcus aureus</i> [40] <i>Bartonella henselae</i> [30] <i>Neisseria gonorrhoeae</i> [4] <i>Chlamydia pneumoniae</i> [75]	<i>Chlamydia trachomatis</i> [74] <i>Salmonella Typhimurium</i> [32] <i>Porphyromonas gingivalis</i> [82]

### 3.1. Bezpośrednie oddziaływanie z elementami szlaku apoptozy

Do bakterii wywierających bezpośredni wpływ na zaprogramowaną śmierć komórki należą *Chlamydia* spp., które hamują apoptozę poprzez proteolityczną degradację białek BH3-only (*Bcl-2* homology domain 3 only) takich, jak: Bim, Puma, Bad [15], Bmf, Noxa, tBid [83] i Bik [12]. Białka BH3-only są czynnikami proapoptotycznymi. Aktywują białka Bax i Bak, powodujące uwolnienie cytochromu c z mitochondrium [29]. Jak wynika z badań Pirbhai i wsp. [59] za proteolityczną degradację białek BH3-only w komórkach zakażonych przez *C. trachomatis* jest odpowiedzialna wydzielana do cytozolu proteaza CPAF (*Chlamydia protease/proteasome-like activity factor*).

Mechanizm antyapoptotycznego działania bakterii z rodzaju *Chlamydia* może być także związany z sekwestracją kinazy białkowej Cδ (*protein kinase Cδ*, PKCδ) na wodniczках lub ich bezpośredniej bliskości [70]. Enzym PKCδ jest czynnikiem proapoptotycznym. Aktywowana kinaza przemieszcza się do mitochondrium [35, 44], gdzie wpływa na uwolnienie cytochromu c [44]. Zdaniem badaczy czynnikiem odpowiedzialnym za odizolowanie kinazy białkowej Cδ od miejsca docelowego działania, jest obecny w wodniczках DAG (diacyloglicerol), wiążący się z domeną C1 enzymu [70].

Drobnoustroje mogą niszczyć receptory niezbędne do indukcji apoptozy. Jak wynika z badań Beck i wsp. [3] bakterie *Neisseria gonorrhoeae* wytwarzają proteazę IgA1, która powoduje proteolityczną degradację receptora TNF-RII (*tumor necrosis factor receptor II*) znajdującego się na powierzchni komórek monocytarnych U937 i zapobiega apoptozie wywoływanej przez TNFα (*tumor necrosis factor α*).

Prątki *Mycobacterium tuberculosis* są zdolne do hamowania apoptozy ludzkich makrofagów również przez mechanizm zależny od TNF-α [1]. W wyniku zakażenia makrofagów szczepami *M. tuberculosis* dochodzi do wzrostu syntezy IL-10, która ma zdolność

wywoływania akumulacji rozpuszczalnych receptorów dla TNFα (*soluble TNFα receptor 2*, sTNFR2). sTNFR2 wiąże TNFα, tworząc nieaktywny biologicznie kompleks ligand-receptor. Zablokowany TNFα nie posiada zdolności indukowania apoptozy, przez co makrofag zachowuje zdolność proliferacji.

Bezpośredni wpływ bakterii na zaprogramowaną śmierć komórek jest związany hamowaniem aktywności kaspazy, kluczowych enzymów apoptozy. Z badań Heczki i wsp. [20] wynika, że enteropatogenne szczepy *Escherichia coli* O103 (*enteropathogenic E. coli* O130, EPEC O130) mogą hamować apoptozę króliczych komórek jelita i kępek Peyera. Mechanizm tego działania nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, ale prawdopodobnie zależy od wydzielania przez pałeczki EPEC wirulentnego białka, które bezpośrednio hamuje aktywność kaspazy-3.

W inny sposób hamuje apoptozę makrofagów linii THP-1 (*human monocytic leukemia cell line*) wywołowaną czynnikami chemicznymi *Orientia tsutsugamushi* [31]. Mechanizm ten jest niezależny od NF-κB i obejmuje zahamowanie uwalniania wewnątrzkomórkowego wapnia. Czynnikiem odpowiedzialnym za zablokowanie apoptozy jest przypuszczalnie termostabilne białko syntetyzowane przez *O. tsutsugamushi*, ale nieznanym jest szlak przekazywania sygnału do komórki gospodarza.

Drobnoustroje mogą bezpośrednio oddziaływać z błoną mitochondrium zapobiegając uwolnieniu cytochromu c. Według Massari i wsp. [45, 46] zlokalizowana na błonie zewnętrznej *Neisseria meningitidis* poryna PorB, w zakażonej komórce wiąże się z mitochondrium. Białko PorB oddziałuje z białkowym składnikiem por mitochondrialnych, poryną VDAC (*voltage-dependent anion channel*, zależny od napięcia kanał anionowy) stabilizując elektrycznie błony mitochondrialne i zapobiegając uwolnieniu cytochromu c do cytozolu [45]. Jak wynika z badań Vander Heiden i wsp. [71] zamknięcie VDAC zapobiega wymianie ATP i ADP pomiędzy cytozolem i macierzą mitochondrium, co prowadzi do nagromadzenia fosfokreatyny

w przestrzeni międzybłonowej. Zaburzenia mitochondrialnej wymiany ATP/ADP są uważane za jeden z czynników mogących brać udział w inicjacji apoptozy [72]. Być może poryna PorB wpływa na kanał anionowy zależny od napięcia w sposób podobny do antyapoptotycznej proteiny Bcl-x<sub>L</sub>, która hamuje zamknięcie VDAC i utrzymuje przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrium dla ATP i ADP [73].

Blokowanie depolaryzacji błon mitochondrium makrofagów zaobserwowano u pałeczek *E. coli* [68]. Szczepy *E. coli* K1, które wytwarzają zewnętrzne białko błonowe A (*outer membrane protein A*, OmpA) aktywują transkrypcję *Bcl-x<sub>L</sub>* – antyapoptotycznych genów, których produkty zapobiegają przemieszczeniu cząsteczek cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy. Ponadto, w makrofagach zakażonych *E. coli* K1 dochodzi do spadku aktywności kaspazy-3, -6 i -9. Obecność białka OmpA jest niezbędna dla replikacji i przeżycia *E. coli* K1 wewnątrz makrofagów. Sam mechanizm antyapoptotyczny nie jest jasny, ale prawdopodobnie jest związany z receptorami dla OmpA obecnymi na makrofagach [68].

### 3.2.1. Udział czynnika jądrowego NF-κB

Jądrowy czynnik-κB (*nuclear factor-κB*, NF-κB) pełni ważną rolę jako regulator transkrypcji. Aktywuje ekspresję szeregu genów, m. in., związanych z działaniem antyapoptotycznym. Pośrednio wpływa na apoptozę przez białka cFLIP, które jest inhibitorem kaspazy 8 [18].

Rodzinę białek tworzących czynnik transkrypcji jądrowej NF-κB ssaków tworzy 5 cząsteczek Rel, do których należą: NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (p65), c-Rel, RelB. Białka NF-κB1 i NF-κB2 powstają w komórce w postaci nieaktywnych cząsteczek prekursorowych p105 i p100, które w trakcie modyfikacji potranslacyjnej zostają przekształcone w aktywne białka p50 i p52 [5].

Wszystkie białka Rel posiadają na N-końcu konserwatywną domenę homologiczną Rel (*rel homology domain*, RHD), której sekwencja wiąże białka hamujące (*inhibitor – κB*, IκB) i sekwencje docelowe w obrębie łańcucha DNA. Ważnym elementem RHD jest sekwencja lokalizacji jądrowej (*nuclear localisation signal*, TLS), która jest odpowiedzialna za przemieszczenie NF-κB do jądra komórkowego [62].

Cząsteczki Rel tworzą formy złożone, będące homolub heterodimerami. Najczęstszą postacią jest heterodimer zbudowany z podjednostek RelA (p65) i NFκB1 (p50) [18].

Fizjologicznie NF-κB znajduje się w cytoplazmie w nieaktywnej postaci. NF-κB jest związany ze swoim inhibitorem – IκB (IκBα, IκBβ, IκBγ/p105, IκBδ/p100, IκBζ, IκBε i Bcl-3). Aktywacja NF-κB w komórce

może nastąpić dwiema drogami. Pierwsza z nich określana jest mianem klasycznej i obejmuje przede wszystkim działanie kinaz IκB (*IκB – kinases*, IKK). Aktywacja IKK prowadzi do fosforylacji dwóch specyficznych reszt serynowych IκB, czego efektem jest przyłączenie do IκB cząsteczek ubikwityny i proteoliza z udziałem podjednostki 26S proteasomu. W wyniku degradacji IκB zostają odsłonięte sekwencje TLS, uwolnione cząsteczki dimeru NF-κB zostają przemieszczone do jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję określonych genów.

Bodźce stymulujące mogą poprowadzić do aktywacji innych kinaz, fosforylujących białka inhibitorowe IκB. Należą do nich: kinazy białkowe aktywowane mitogenami (*mitogen activated protein kinase*, MAPK), kinazy MEKK 1, 2, 3 (*MAPK/ERK kinase*), kinaza białkowa Akt (*Akt/Protein kinase*), kinaza białkowa C ζ (*protein kinase Cζ*, PKC ζ) [62].

Druga z dróg aktywacji NF-κB – alternatywna, dotyczy NF-κB, które jest dimerem RelB i p52. Czynniki aktywującymi ten szlak, są przede wszystkim cytokiny. Wymaga on działania IKKα oraz kinaz indukujących NF-κB (*NF-κB inducing kinases*, NIK). NIK katalizuje fosforylację IKKα, które w tej postaci powoduje przekształcenie nieaktywnego p100 do jego czynnej formy – p52. Kompleks RelB/p52 zostaje przemieszczony do jądra komórkowego [62].

Aktywacja NF-κB przez bakterie lub ich produkty zachodzi za pośrednictwem receptorów TLR (*Toll-like receptor*, TLR) klasyczną drogą [5, 61]. TLR są konserwatywnymi receptorami rozpoznającymi wzorzec (*pattern recognition receptor*, PRR), prezentowany przez różne drobnoustroje (*pathogen-associated microbial pattern*, PAMP) [19].

Receptory TLR2 wiążą się z peptydoglikanem i lipoproteinami bakterii Gram-dodatnich, TLR4 z lipopolisacharydem (LPS) bakterii Gram-ujemnych, TLR5 rozpoznają rzęski bakteryjne, a TLR9 – niezmetylowany bakteryjny DNA [19, 43]. Niezależnie od typu receptora TLR dochodzi do ekspresji genów zależnych od NF-κB.

Niezbędna dla aktywacji TLR jest obecność białka adaptorowego (*myleoid-differentiation marker*, MyD88). MyD88 posiada również dwie domeny: TIR i domenę śmierci (*death domain*, DD). Interakcje pomiędzy domenami MyD88 i TLR prowadzą do aktywacji kinaz serynowo-treoninowych związanych z receptorem dla IL-1 (*IL-1 RI associated protein kinases*, IRAK). W wyniku szeregu procesów dochodzi do aktywacji kinazy aktywującej NF-κB (*NF-κB inducing kinase*, NIK), która fosforyluje i aktywuje trzy podjednostki IKK (IKKα, IKKβ i IKKγ). IKK uwalniają NF-κB z jego nieaktywnego kompleksu z IκB [19].

K r a p p m a n n i wsp. [34] udowodnili, że LPS poprzez wiązanie się z TLR4 wywołuje aktywację

NF- $\kappa$ B, który z kolei reguluje aktywność transkrypcyjną AP-1 (*activating protein-1*, AP-1).

NF- $\kappa$ B jest czynnikiem, który reguluje ekspresję około 150 genów. Wykazano jego anty- i proapoptyczne działanie [37]. NF- $\kappa$ B ma zdolność hamowania apoptozy, w której uczestniczy TNF- $\alpha$  w pierwotnych fibroblastach ludzkich i szczurzych, komórkach T Jurkat i komórkach T24 linii ludzkiego raka pęcherza. Odgrywa również rolę w apoptozie zróżnicowanych makrofagów, w którą zaangażowane są PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ .

Zidentyfikowano szereg produktów genów antyapoptycznych regulowanych przez NF- $\kappa$ B. Należą do nich m.in. inhibitory apoptozy (*inhibitors of apoptosis*, IAPs), białkowe inhibitory kaspazy-8 (*FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-like protease*, cFLIP), A1 określanego też jako Bfl1, czynniki związane z TNFR (*TNFR-associated factor*, TRAF) [28].

W grupie IAP wyróżnia się kilka rodzajów białek, do których należą, m. in., komórkowe inhibitory apoptozy (*cellular inhibitor of apoptosis*, cIAP), inhibitory związane z chromosomem X (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*, XIAP) [28]. cIAP działają antyapoptycznie poprzez bezpośrednie wiązanie się z kaspazami efektorowymi: kaspazą-3 i -7, zapobiegając aktywacji proteolitycznej prokaspazy-6 i -9. Antyapoptyczne działanie XIAP polega również na blokowaniu kaspaz-3 i -7, co uniemożliwia aktywację prokaspazy-9.

W inny sposób antyapoptycznie działają białka cFLIP [28]. Zawierają dwie efektorowe domeny śmierci (*death effector domains*, DEDs) i katalitycznie nieaktywną domenę podobną do kaspaz. cFLIP hamuje apoptozę poprzez działanie na prokaspazę-8. Dodatkowo cFLIP oddziałuje z TRAF2 i białkami działającymi z receptorami (*receptor-interacting protein*, RIP), które są odpowiedzialne za aktywację JNK i IKK przez kompleks TNFR1. Aktywne białko cFLIP powoduje nasilone uwalnianie NF- $\kappa$ B [28].

NF- $\kappa$ B może wpływać na drogę apoptozy zależną od mitochondriów [28]. Poprzez oddziaływania z białkami rodziny Bcl-2: A1 i Bcl<sub>XL</sub> stabilizuje błony mitochondrialne i zapobiega uwalnianiu cząsteczek cytochromu c. Białko A1 hamuje także aktywację kaspazy-9.

Z badań Clifton i wsp. [9] wynika, że antyapoptyczny mechanizm zależny od aktywacji NF- $\kappa$ B wykorzystują bakterie z rodzaju *Rickettsia*. Szczepy *R. rickettsii* są obligatoryjnymi patogenami wewnątrzkomórkowym, które są odpowiedzialne za szereg zakażeń śródbłonna naczyniowego.

Badania przeprowadzono na komórkach ludzkiego śródbłonna (*endothelial cells*, ECs). Po zakażeniu ECs *R. rickettsii* dochodziło do wzrostu aktywności NF- $\kappa$ B w jądrze komórkowym [9]. Zmiana aktywności NF- $\kappa$ B miała charakterystyczny – dwufazowy przebieg. Pierwszy szczyt wzrostu aktywności obserwowano po trzech

godzinach od zakażenia ECs, a drugi – pomiędzy 18 a 24 godziną. Zaobserwowano, że wzrost NF- $\kappa$ B jest poprzedzony zwiększeniem aktywności IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ , które prowadzą do fosforylacji I $\kappa$ B $\alpha$ , a w konsekwencji do jego proteolizy i uwolnienia aktywnej formy NF- $\kappa$ B [9]. Wyniki pomiaru poziomu mRNA dla I $\kappa$ B $\alpha$  w grupie komórek zakażonych były siedmiokrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Nieznany jest czynnik, który aktywuje IKK.

Konsekwencją aktywacji NF- $\kappa$ B jest zablokowanie przekształcania prokaspazy-8 i -9, co hamuje kaskadę kaspaz. Badania Joshi i wsp. [27] dowodzą, że w czasie zakażenia *R. rickettsii* dochodzi do stabilizacji błon mitochondrialnych. Odpowiedzialne za to są białka z rodziny Bcl-2 [26].

Mechanizm związany z aktywacją NF- $\kappa$ B zaobserwowano także u *Ehrlichia chaffeensis* [84]. Jest to obligatoryjny patogen wewnątrzkomórkowy, który przebywa w endosomach monocytów. Zhang i wsp. [84] przeprowadzili badania na ludzkich monocytach linii TPH1. Zaobserwowali, że zakażenie TPH1 *E. chaffeensis* powoduje aktywację NF- $\kappa$ B oraz BCL2A1, BIRC3, IER3 i MCC1, które należą do grupy białkowych inhibitorów apoptozy. W pierwszych 7 godzinach od zakażenia hodowli dochodziło do represji antagonistów Bcl-2: BIK i BNIP3L. Prowadziło to do ustabilizowania błon mitochondrialnych i zatrzymania cząsteczek cytochromu c w obrębie mitochondrium. Powoduje to zatrzymanie wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy. Szczepy *E. chaffeensis* hamują także drogę kinaz Janusowych (*Janus kinase*, JAK) i białka przekazującego sygnały i aktywatora transkrypcji (*signal transducers and activators of transcription*, STAT) [84]. JAK1-STAT1 są hamowane we wczesnej fazie zakażenia *E. chaffeensis*.

JAK-STAT pełni kluczową rolę w sygnalizacji cytokinowej. JAK uczestniczy w przenoszeniu aktywacyjnych grup fosforowych na białka STAT. Aktywny STAT jest natychmiast transportowany z cytoplazmy do jądra komórkowego i angażowany w wiązanie DNA, co powoduje aktywność transkrypcyjną odpowiednich genów, w zależności od czynnika stymulującego JAK. Ligandy dla receptorów wiążących JAK to: IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , IL-2, IL-7, IL-10, IL13, IL-15, erytropoetyna, hormon wzrostu, prolaktyna, trombopoetyna i inne polipeptydy. Konsekwencją aktywacji JAK-STAT przekazywanie sygnałów z zewnątrz komórki do jej jądra. Zaburzenia w sygnalizacji komórkowej powodują, że staje się ona mniej wrażliwa na bodźce apoptotyczne [84].

*E. chaffeensis* powoduje obniżenie syntezy kinaz 2 fosforyzujących N-koniec białka Jun (*c-Jun amino-terminal kinase*, JNK2) podczas wczesnej fazy zakażenia [84]. Brak JNK2 stabilizuje błony mitochondrialne, co zapobiega przedostawaniu się cząsteczek

cytochromu c do cytoplazmy komórkowej. Innym działaniem JNK2 jest fosforylacja białka Jun, zwiększająca jego aktywność transkrypcyjną. c-Jun razem z c-Fos, jest składnikiem białek apoptotycznych AP-1. Zahamowanie syntezy JNK2 wywołuje więc, poprzez spadek fosforylacji Jun, spadek poziomu czynnika transkrypcyjnego AP-1 [84].

Podczas zakażenia *E. chaffeensis* dochodzi dodatkowo do zmiany aktywności niektórych cyklin i kinaz białkowych zależnych od cyklin (*cyclin-dependent protein kinases*, CDKs) [84]. We wczesnej fazie zakażenia następuje obniżenie syntezy CDC2, CDK5, CDK8 i cykliny G1, które zatrzymują cykl komórkowy w fazie G1. W późnym etapie zakażenia wzrasta poziom cykliny E i CDC25, które odpowiadają za wejście komórki w fazę replikacji DNA. Dochodzi do intensywnej proliferacji komórki.

Działanie antyapoptotyczne przez NF- $\kappa$ B zaobserwowali Maeda i wsp. [42]. Szczepy *Helicobacter pylori*, wydzielające białka cagA kodowane przez geny związane z wyspą patogenności cag (*cagA pathogenicity island*, cagPAI), są zdolne do aktywacji cykliny D1, Elk-1 i białka c-Fos, które są zaangażowane w proliferację komórkową i mogą odgrywać pewną rolę w karcinogenezie przez aktywację ERK/MAPK. Białka cagA są wydzielane przez IV system sekrecji białek (*type 4 secretion system*, T4SS) [17].

Badania Yana i wsp. [81] dowodzą, że szczepy *H. pylori* cagPAI aktywują NF- $\kappa$ B, które jest odpowiedzialne za indukcję cIAP2. Zaobserwowano, że w komórkach ludzkiego gruczołakoraka żołądka z linii MKN45 dochodzi do wzrostu transkrypcji mRNA dla cIAP2. cIAP2 powoduje nasiloną ubikwitynację kaspazy-3 i -7, co hamuje szlak apoptozy. Podanie inhibitorów NF- $\kappa$ B w tych komórkach wywoływało spadek ekspresji cIAP2, co jednoznacznie świadczy o udziale NF- $\kappa$ B w szlaku antyapoptotycznym indukowanym *H. pylori* cagPAI.

Hirata i wsp. [21] wykazali, że szczepy *H. pylori* cagPAI powodują aktywację w komórkach raka żołądka linii AGS obu podjednostek IKK:  $\alpha$  i  $\beta$ . IKK $\beta$  odpowiada za aktywację NF- $\kappa$ B, działając jak kinaza I $\kappa$ B $\alpha$ , natomiast IKK $\alpha$  – zostaje przemieszczone do jądra komórkowego i jest konieczne do wywołania właściwej odpowiedzi zapalnej. Znamienną rolę przypisuje się aktywacji kinazy serynowo-treoninowej TAK1 (*TGF-beta-activated kinase*), która odpowiada bezpośrednio za fosforylację IKK.

Z badań prowadzonych przez Ohmae i wsp. [56] wynika, że supresja apoptozy ludzkich limfocytów B i fibroblastów zachodzi z udziałem aktywacji alternatywnej drogi NF- $\kappa$ B. Odpowiada za to LPS *H. pylori*, natomiast nie jest zależne od obecności genu *cag*.

Udział klasycznej drogi aktywacji NF- $\kappa$ B zaobserwowano w przypadku zahamowania śmierci makrofa-

gów linii RAW 264.7 i wywodzących się ze szpiku kostnego zakażonego *E. coli* [16]. Komórki gospodarza po fagocytozie *E. coli* wykazywały wzrost ekspresji *Bcl-2*, co stabilizuje potencjał błonowy mitochondrium, wzmożoną syntezę cIAP-2 oraz blokowanie kaskady kaspaz efektorowych.

Li i wsp. [38] zaobserwowali, że pałeczki *E. coli*, które wytwarzają werotoksynę 2 (*Verotoxin-2*, VT-2), są w stanie hamować spontaniczną apoptozę neutrofilii. W badaniach *in vitro* podanie inhibitora PKC powodowało zniesienie antyapoptotycznego działania VT-2, co sugeruje mechanizm zależny od PKC. Aktywacja PKC może prowadzić do uwalniania NF- $\kappa$ B w komórce gospodarza, który może być bezpośrednio zaangażowany w proces regulacji apoptozy komórek zakażonych *E. coli* VT-2 [7].

Hamowanie spontanicznej apoptozy zostało udowodnione w przypadku *Staphylococcus epidermidis* [36]. Liles i wsp. [36] wyizolowali modulinę rozpuszczalną w fenolu (*phenol-soluble modulin*, PSM). Jest to związek syntetyzowany przez drobnoustroje o właściwościach stymulacji wytwarzania cytokin pozapalnych. *In vitro* PSM hamuje spontaniczną apoptozę neutrofilii i monocytów. W przypadku monocytów linii THP-1 mechanizm tego zjawiska obejmuje aktywację NF- $\kappa$ B [48].

Kwas lipoteicholowy *S. aureus* wykazuje aktywność antyapoptotyczną w stosunku do neutrofilii [65]. Z badań Lotz i wsp. [40] wynika, że w mechanizmie indukcji genów antyapoptotycznych zaangażowane są obecne na komórce neutrofilii receptory CD14 i TLR2, których aktywacja wywołuje uwalnianie NF- $\kappa$ B z połączenia z inhibitorem. Moreillon i wsp. [50] wykazali, że aktywacja genów antyapoptotycznych (BIRC3, SGK, PIM, BCL2A1) zachodzi głównie w przypadku zakażenia komórek nabłonka oddechowego bezkomórkowym supernatantem *S. aureus*, zaś w mniejszym stopniu – żywymi komórkami. Czynnikiem, odpowiedzialnym za wzmożenie transkrypcji genów hamujących apoptozę, jest prawdopodobnie białko związane ze ścianą komórkową, rozpuszczalne w wodzie.

Zdaniem Kempf i wsp. [30] antyapoptotyczne działanie *Bartonella henselae* wobec komórek monocytarnych linii Mono Mac 6 jest związane z aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz ze wzrostem poziomu komórkowych inhibitorów apoptozy cIAP-1 i -2 zależnych od NF- $\kappa$ B. Inhibitory apoptozy (*inhibitor of apoptosis proteins*, IAPs), do których należą cIAP-1 i -2 hamują kaspazę-3, -7, -9 [11].

Stwierdzono, że hamowanie apoptozy komórek śródbłonka naczyniowego przez bakterie *B. henselae* i *B. quintana* jest zależne od IV systemu sekrecji VirB/VirD<sub>4</sub> [63, 64]. Czynnikiem antyapoptotycznym jest białko efektorowe BepA dostarczane do wnętrza komórki przez T4SS. W komórkach śródbłonka naczy-

niowego białko BepA wiąże się z błoną plazmatyczną i powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP). Zdaniem Schmid i wsp. [63] zwiększenie zawartości cAMP wewnątrz komórki może wynikać z bezpośredniego wpływu białka BepA na cyklazę adenylową. Może być także efektem oddziaływania z białkami G związanymi z błoną plazmatyczną lub też z receptorami sprzężonymi z białkiem G regulującymi aktywność cyklazy. Nie wiadomo, w jaki sposób cAMP zapobiega apoptozie komórek śródbłonna naczyniowego. Być może powoduje indukcję komórkowego inhibitora apoptozy 2 cIAP-2 [53]. Według badaczy działanie białka BepA jest niezależne od czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B [63]. Być może odmienne wyniki w stosunku do badań Kempf i wsp. [30] wynikają z zastosowania różnych linii komórkowych.

Jak wynika z badań Binicker i wsp. [4] antyapoptyczny wpływ *N. gonorrhoeae* na komórki nabłonkowe cewki moczowej jest związany z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Stwierdzono, że składnik błony zewnętrznej, białko Por IB, powoduje aktywację czynnika NF- $\kappa$ B i wzrost ekspresji zależnych od niego genów *bfl-1*, *cox-2* i *c-IAP2*, których białkowe produkty mogą hamować zaprogramowaną śmierć komórki na drodze różnych mechanizmów. Białko Bfl-1 oddziałuje z czynnikami proapoptycznymi i zapobiega uwolnieniu cytochromu c z mitochondrium [77, 85]. Nadekspresja białka COX-2 powoduje zależny od aktywacji szlaku PI3K/Akt wzrost poziomu białka Mcl-1 [39] hamującego proapoptyczny czynnik Bok [24]. Wykazano również, że białko Mcl-1 może hamować apoptozę powodowaną nadekspresją c-Myc [60] oraz wiązać się z białkiem Bax, powodując jego sekwestrację [78]. Dokładny mechanizm działania poriny Por IB *N. gonorrhoeae* nie jest w pełni znany.

Hamujący wpływ bakterii z rodzajów *Chlamydia* i *Chlamydophila* na zaprogramowaną śmierć różnych typów komórek może być związany z czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B, chociaż istnieją sprzeczne doniesienia na ten temat [14, 75, 79].

Według Wahl i wsp. [75] *Ch. pneumoniae* indukuje zależną od NF- $\kappa$ B ekspresję inhibitora apoptozy c-IAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis 2*) w zakażonych komórkach monocytarnych Mono Mac 6. Odmienne wyniki uzyskali Fisher i wsp. [14]. Zdaniem badaczy antyapoptyczne działanie *Ch. pneumoniae* wobec komórek HeLa związane z zablokowaniem uwolnienia cytochromu c i zależnej od niego aktywacji kaspaz nie wymaga udziału NF- $\kappa$ B. Również Xiao i wsp. [79] zauważyli, że bakterie *C. trachomatis* zapobiegają apoptozie zakażonych komórek HeLa niezależnie od czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Zarówno chemiczne zablokowanie aktywacji NF- $\kappa$ B, jak usunięcie genu p65 kodującego ten czynnik, nie wpłynęło na ha-

mowanie zaprogramowanej śmierci komórek HeLa. Być może odmienne wyniki badań są spowodowane użyciem różnych linii komórkowych lub szczepów bakteryjnych.

### 3.2.2. Udział szlaku PI3K/Akt

Z antyapoptycznym działaniem bakterii jest związany także szlak przekąźnikowy obejmujący 3-kinazę fosfatidylinozytolu (*phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3K) oraz kinazę Akt. 3-kinaza fosfatidylinozytolu jest enzymem składającym się z podjednostki katalitycznej (P110) oraz podjednostki adaptorowej/regulatorowej (P85), aktywowanej przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej (*receptors tyrosine kinase*, RTK) i receptory sprzężone z białkiem G (*G protein-coupled receptor*, GPCR). Aktywny enzym PI3K przekształca 4,5-difosforan fosfatidylinozytolu w 3,4,5-trifosforan fosfatidylinozytolu [57].

Enzym Akt jest kinazą serynowo-treoninową nazywaną także kinazą białkową B (*protein kinase B*, PKB). Występuje u ssaków w postaci trzech izoform: Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) i Akt3 (PKB $\gamma$ ), z których każda posiada N-końcową domenę PH (*pleckstrin homology domain*), domenę środkową kinazy oraz C-końcową domenę regulatorową. Kinaza Akt ulega przemieszczeniu do błony plazmatycznej i poprzez domenę PH oddziałuje z 3,4,5-trifosforanem fosfatidylinozytolu, czego efektem jest zmiana konformacji enzymu, umożliwiająca aktywację kinazy. Aktywacja enzymu Akt wynika z fosforylacji dwu reszt aminokwasów. Dla kinazy Akt1 jest to Thr308 zlokalizowana w domenie środkowej kinazy, fosforylowana przez kinazę PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*, kinaza 1 zależna od fosfoinozyny) oraz Ser473 w C-końcowej domenie regulatorowej, która może ulegać autofosforylacji lub być fosforylowana przez inną kinazę serynową, np. kinazę związaną z integryną (*integrin-linked kinase*, ILK), bądź PDK2 [57].

Aktywny enzym Akt wpływa na wiele procesów zachodzących w komórce, m.in., na proliferację, metabolizm i apoptozę [57]. Kinaza Akt może zapobiegać zaprogramowanej śmierci komórek działając bezpośrednio na czynniki proapoptyczne. Wykazano, że hamuje zmianę konformacji białka Bax i jego przemieszczenie do mitochondrium, co uniemożliwia uwolnienie cytochromu c i aktywację kaskady kaspaz [80]. Kinaza Akt inaktywuje proapoptyczne białko Bad [57]. Ponadto, jak wynika z badań Cardone i wsp. [8] fosforyluje kaspazę-9, co skutkuje osłabieniem jej aktywności.

Antyapoptyczne działanie kinazy Akt związane jest także z regulacją czynników transkrypcyjnych kontrolujących pro- i antyapoptyczne geny. Fosforylacja

czynników transkrypcyjnych AFX, nazywany także FOXO4 (*forkhead box protein O4*), FKHR (*forkhead homolog 1 rhabdomyosarcoma*) i FKHL1 (*forkhead homolog rhabdomyosarcoma like 1*), należących do rodziny Forkhead zapobiega transkrypcji proapoptycznych genów kodujących białka FasL, IGFBP-1 oraz Bim. Z kolei fosforylacja i aktywacja czynnika transkrypcyjnego CREB (*cAMP-response element binding protein*) skutkuje wzrostem ekspresji antyapoptycznych genów *bcl-2* i *mcl-1*. Kinaza Akt może także fosforylować i aktywować kinazę IκB, indukującą degradację IκB, inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Prowadzi to do aktywacji NF-κB i transkrypcji zależnych od czynnika jądrowego genów kodujących białka Bcl-x<sub>L</sub>, inhibitory kaspaz oraz białko c-Myb [57]. Jak wynika z badań Basu i wsp. [2] enzym Akt fosforyluje białko Yap (*Yes-associated protein*) będące koaktywatorem czynnika transkrypcyjnego p73. Ufosforylowanie proteiny Yap powoduje supresję pośredniczonej przez p73 transkrypcji genów kodujących białka proapoptyczne, np. Bax w odpowiedzi na czynniki uszkodzające DNA. Kinaza Akt fosforyluje także białko Mdm2 (*murine double minute-2*) [47], będące ligazą ubikwityny E3 [23]. Proteina Mdm2 powoduje obniżenie komórkowego poziomu białka p53 oraz zmniejszenie jego aktywności transkrypcyjnej [47]. Proteina p53 jest odpowiedzialna za ekspresję białek proapoptycznych, m.in.: Bax [49], Nox a [55] i Puma [52].

Kinaza Akt może zapobiegać apoptozie poprzez regulację metabolizmu komórki. Fosforylacja kinazy 3 syntazy glikogenu (*glycogen synthase kinase 3*, GSK3), enzymu związanego z syntezą glikogenu w odpowiedzi na wysoki poziom insuliny [10] hamuje zaprogramowaną śmierć komórki [58].

Bakterie *C. trachomatis* zapobiegają zaprogramowanej śmierci komórek również za pośrednictwem kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K. Jak wynika z badań Verbeke i wsp. [74] w zakażonych komórkach następuje aktywacja kinazy PI3K, która z kolei wpływa na aktywację kinazy białkowej Akt. Aktywny enzym Akt fosforyluje proapoptyczne białko Bad wiążące się poprzez białko adaptorowe 14-3-3β z białkiem IncG znajdującym się w błonie ciała wtrętowego. Odizolowanie białka Bad od mitochondrium zapobiega stymulacji uwalniania cytochromu c. Nie wiadomo, w jaki sposób dochodzi do aktywacji kinazy PI3K w komórkach zakażonych przez *C. trachomatis*. Zdaniem badaczy proces ten może być spowodowany antyapoptycznym czynnikiem wytwarzanym przez bakterie i wydzielanym do cytozolu przez III system sekrecji (*type three secretion system*, TTSS) [74].

Czynnikiem odpowiedzialnym za zahamowanie apoptozy komórek nabłonkowych zakażonych przez *Salmonella Typhimurium* jest białko efektorowe SopB

[32], dostarczane do wnętrza komórki przez III system sekrecji (TTSS) [13]. Białko SopB posiadające aktywność fosfatazy fosfatydyloinozytolu [54] powoduje ciągłą fosforylację i aktywację serynowo-teroninowej kinazy Akt. Ponadto, jak wynika z badań Knodler i wsp. [32] białko SopB zapobiega aktywacji kaspazy-3.

Działanie antyapoptotyczne pałeczek *Porphyromonas gingivalis* jest związane z fosforylacją białka Akt przez 3-kinazę fosfatydyloinozytolu (*phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) [82]. Nie jest znany czynnik aktywujący kinazę PI3K w zakażonych komórkach. Być może jest nim LPS *P. gingivalis* wykazujący działanie antyapoptotyczne wobec neutrofilii [51]. LPS tych bakterii wiąże się z receptorem TLR2 [22]. Strassheim i wsp. [66] opisali aktywację PI3K za pośrednictwem receptora TLR2 u neutrofilii.

#### 4. Podsumowanie

Prowadzone w ostatnich latach doświadczenia przyczyniły się do lepszego poznania wpływu bakterii na zakażone komórki. Wykazano, że drobnoustroje mogą zarówno indukować, jak i hamować apoptozę. Bakterie mogą zapobiegać zaprogramowanej śmierci komórek działając bezpośrednio na struktury i enzymy uczestniczące w apoptozie takie, jak: receptory, kaspazy czy mitochondria. Antyapoptotyczny wpływ drobnoustrojów może mieć także charakter pośredni i być związany z aktywacją szlaków przekąźnikowych zlokalizowanych wewnątrz zakażonych komórek.

Apoptoza jest procesem mającym istotne znaczenie w patogenezie chorób wywołanych przez bakterie. Jak wynika z przeprowadzonych badań, hamowanie apoptozy umożliwia drobnoustrojom rozmnażanie się w zakażonych komórkach chroniąc je przed działaniem układu odpornościowego.

Mimo znacznego postępu w badaniach nad zaprogramowaną śmiercią komórek wiele mechanizmów antyapoptotycznego działania bakterii nie zostało do końca wyjaśnionych, a wiele z nich opiera się w dużym stopniu na hipotezach. Konieczne są dalsze prace badawcze, które umożliwią dokładne poznanie wpływu drobnoustrojów na zakażone komórki oraz pozwolą na opracowanie nowych metod zapobiegania i leczenia chorób wywołanych przez bakterie.

#### Piśmiennictwo

- Balcewicz-Sablinska M., Keane J., Kornfeld H., Remold H.G.: Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-α. *J. Immunol.* **161**, 2636–2541 (1998)
- Basu S., Totty N.F., Irwin M.S., Sudol M., Downward J.: Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell.* **11**, 11–23 (2003)

3. Beck S.C., Meyer T.F.: IgA1 protease from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits TNF $\alpha$ -mediated apoptosis of human monocytic cells. *FEBS Lett.* **472**, 287–292 (2000)
4. Binnicker M.J., Williams R.D., Apicella M.A.: Gonococcal Porin IB activates NF- $\kappa$ B in human urethral epithelium and increases the expression of host antiapoptotic factors. *Infect. Immun.* **72**, 6408–6417 (2004)
5. Bonizzi G., Karin M.: The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280–288 (2004)
6. Böhm I., Schild H.: Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imag. Biol.* **5**, 2–14 (2003)
7. Cameron P., Bingham D., Paul A., Pavelka M., Cameron S., Rotondo D., Plevin R.: Essential role for verotoxin in sustained stress-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling, stimulated by *Escherichia coli* O157:H7 in Vero Cells. *Infect. Immun.* **70**, 5370–5380 (2002)
8. Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J.C.: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**, 1318–1321 (1998)
9. Clifton D.R., Rydkina E., Freeman R.S., Sahni S.K.: NF- $\kappa$ B activation during *Rickettsia rickettsii* infection of endothelial cells involves the activation of catalytic I $\kappa$ B kinases IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  and phosphorylation-proteolysis of the inhibitor protein I $\kappa$ B $\alpha$ . *Infect. Immun.* **73**, 155–165 (2005)
10. Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A.: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785–789 (1995)
11. Deveraux Q.L., Reed J.C.: IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239–252 (1999)
12. Dong F., Pirbhai M., Xiao Y., Zhong Y., Wu Y., Zhong G.: Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma and Bim with Bcl-2 Domain 3 homology in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *Infect. Immun.* **73**, 1861–1864 (2005)
13. Ehrbar K., Mirolid S., Friebel A., Stender S., Hardt W.D.: Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 479–485 (2002)
14. Fischer S.F., Schwarz C., Vier J., Häcker G.: Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.* **69**, 7121–7129 (2001)
15. Fischer S.F., Vier J., Kirschnek S., Klos A., Hess S., Ying S., Häcker G.: *Chlamydia* inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J. Exp. Med.* **200**, 905–916 (2004)
16. Groesdonk H.V., Schlottmann S., Richter F., Georgieff M., Senftleben U.: *Escherichia coli* prevents phagocytosis-induced death of macrophages via classical NF- $\kappa$ B signaling, a link to T-cell activation. *Infect. Immun.* **74**, 5989–6000 (2006)
17. Guillemin K., Salama N.R., Tompkins L.S., Falkow S.: Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15136–15141 (2002)
18. Häcker G., Fischer S.F.: Bacterial anti-apoptotic activities. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**, 1–6 (2002)
19. Hayden M.S., Ghosh S.: Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Devel.* **18**, 2195–2224 (2004)
20. Heczko U., Carthy Ch.M., O'Brien B.A., Finlay B.B.: Decreased apoptosis in the ileum and ileal Payer's patches: a feature after infection with rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O130. *Infect. Immun.* **69**, 4580–4589 (2001)
21. Hirata Y., Maeda S., Ohmae T., Shibata W., Yanai A., Ogura K., Yoshida H., Kawale T., Omata M.: *Helicobacter pylori* induces I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  nuclear translocation and chemokine production in gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **74**, 1452–1461 (2006)
22. Hirschfeld M., Weis J.J., Toschchakov V., Salkowski C.A., Cody M.J., Ward D.C., Qureshi N., Michalek S.M., Vogel S.N.: Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* **69**, 1477–1482 (2001)
23. Honda R., Tanaka H., Yasuda H.: Oncoprotein Mdm2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25–27 (1997)
24. Hsu S.Y., Kaipia A., McGee E., Lomeli M., Hsueh A.J.: Bok is a proapoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12401–12406 (1997)
25. Jin Z., El-Deiry W.S.: Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 139–163 (2005)
26. Joshi S.G., Francis Ch.W., Silverman D.J., Sahni S.K.: NF- $\kappa$ B activation suppresses host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection via regulatory effects on intracellular localization or levels of apoptogenic and anti-apoptotic proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 333–341 (2004)
27. Joshi S.G., Francis Ch.W., Silverman D.J., Sahni S.K.: Nuclear Factor- $\kappa$ B protects against host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection by inhibiting activation of apical and effector caspases and maintaining mitochondrial integrity. *Infect. Immun.* **71**, 4127–4136 (2003)
28. Karin M., Lin A.: NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunol.* **3**, 221–227 (2002)
29. Karst A.M., Li G.: BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 318–330 (2007)
30. Kempf V.A., Schairer A., Neumann D., Grassi G.A., Lauber K., Lebidziejewski M., Schaller M., Kyme P., Wesselborg S., Autenrieth I.B.: *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 91–104 (2005)
31. Kim M.K., Seong S.Y., Seoh J.Y., Han T.H., Song H.J., Lee J.E., Shin J.H., Lim B.U., Kang J.S.: *Orientia tsutsugamushi* inhibits apoptosis of macrophages by retarding intracellular calcium release. *Infect. Immun.* **70**, 4692–4696 (2002)
32. Knodler L.A., Finlay B.B., Steele-Mortimer O.: The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J. Biol. Chem.* **280**, 9058–9064 (2005)
33. Koskela P., Anttila T., Björge T., Brunsvig A., Dillner J., Hakama M., Hakulinen T., Jellum E., Lehtinen M., Lenner P., Luostarinen T., Pukkala E., Saikku P., Thoresen S., Youngman L., Paavonen J.: *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer*, **85**, 35–39 (2000)
34. Krappmann D., Wegener E., Sunami Y., Esen M., Thiel A., Mordmuller B., Scheiderei C.: The I $\kappa$ B kinase complex and NF- $\kappa$ B act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6488–6500 (2004)
35. Li L., Lorenzo P.S., Bogi K., Blumberg P.M., Yuspa S.: Protein kinase C $\alpha$  targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by adenoviral vector. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8547–8558 (1999)
36. Liles W.C., Thomsen A.R., O'Mahony D.S., Klebanoff S.J.: Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulins. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 96–102 (2001)

37. Lin B., Williams-Skipp Ch., Tao Y., Schleicher M.S., Cano L.L., Duke R.C., Scheinman R.I.: NF- $\kappa$ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ.* **6**, 570–582 (1999)
38. Liu J., Akahoshi T., Sasahana T., Kitasato H., Namai R., Sasaki T., Inoue M., Kondo H.: Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **67**, 6203–6205 (1999)
39. Lin M.T., Lee R.C., Yang P.C., Ho F.M., Kuo M.L.: Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 48997–49002 (2001)
40. Lotz S., Aga E., Wilde I., Van Zandbergen G., Hartung T., Solbach W., Laskay T.: Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 467–477 (2004)
41. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M.: Mitochondrium a śmierć komórki. *Post. Hig. Med. Dośw.* **60**, 439–446 (2006)
42. Maeda S., Yoshida H., Mitsuno Y., Hirata Y., Ogura K., Shiratori Y., Omata M.: Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* **55**, 286–293 (2002)
43. Majewska M., Szczepanik M.: Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Post. Hig. Med. Dośw.* **60**, 52–63 (2006)
44. Majumder P.K., Pandey P., Sun X., Cheng K., Datta R., Saxena S., Kharbanda S., Kufe D.: Mitochondrial translocation of protein kinase C $\alpha$  in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 21793–21796 (2000)
45. Massari P., Ho Y., Wetzler L.M.: *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9070–9075 (2000)
46. Massari P., King C.A., Ho A.Y., Wetzler L.M.: *Neisserial* PorB is translocated to the mitochondria of HeLa cells infected with *Neisseria meningitidis* and protects cells from apoptosis. *Cell. Microbiol.* **5**, 99–109 (2003)
47. Mayo L.D., Donner D.B.: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11598–11603 (2001)
48. Mehlin C., Headley C.M., Klebanoff S.J.: An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J. Exp. Med.* **189**, 907–918 (1999)
49. Miyashita T., Reed J.C.: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the the human bax gene. *Cell*, **80**, 293–299 (1995)
50. Moreilhon Ch., Gras D., Hologne C., Bajolet O., Cottrez F., Magnone V., Merten M., Groux H., Puchelle E., Barbry P.: Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol. Genom.* **20**, 244–255 (2005)
51. Murray D.A., Wilton J.M.A.: Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of HL60-derived neutrophils *in vitro*. *Infect. Immun.* **71**, 7232–7235 (2003)
52. Nakano K., Vousden K.H.: Puma, a novel proapoptotic gene is induced by p53. *Mol. Cell.* **7**, 683–694 (2001)
53. Nishihara H., Kizaka-Kondon S., Insel P.A., Eckmann L.: Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8921–8926 (2003)
54. Norris F.A., Wilson M.P., Wallis T.S., Galyov E.E., Majerus P.W.: SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14057–14059 (1998)
55. Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N.: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053–1058 (2000)
56. Ohmae T., Hirata Y., Maeda S., Shibata W., Yanai A., Ogura K., Yoshida H., Kawabe T., Omata M.: *Helicobacter pylori* activates NF- $\kappa$ B via the alternative pathway in B lymphocytes. *J. Immunol.* **175**, 7162–7169 (2005)
57. Osaki M., Oshimura M., Ito H.: PI3K-Akt pathway: its functions and alternations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667–676 (2004)
58. Pap M., Cooper G.M.: Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19929–19932 (1998)
59. Pirbhai M., Dong F., Zhong Y., Pan K.Z., Zhong G.: The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading proapoptotic BH-3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 31495–31501 (2006)
60. Reynolds J.E., Yang T., Qian L., Jenkinson J.D., Zhou P., Eastman A., Craig R.W.: Mcl-1, a member of Bcl-2 family delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **54**, 6348–6352 (1994)
61. Ruland J., Mak T.W.: Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor  $\kappa$ B. *Immunol. Rev.* **193**, 93–100 (2003)
62. Rutkowski R., Panacewicz S.A., Skrzydlewska E., Hermanowska-Szpakowicz T.: Właściwości biologiczne czynnika transkrypcji jądrowej NF- $\kappa$ B. *Alert. Astma Immun.* **10**, 125–131 (2005)
63. Schmid M.C., Scheidegger F., Dehio M., Balmelle-Devau N., Schulein R., Guye P., Chennakesava C.S., Biedermann B., Dehio C.: A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathogens*, **2**, 1083–1097 (2006)
64. Schmid M.C., Schulein R., Dehio M., Denecker G., Carena I., Dehio C.: The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **52**, 81–92 (2004)
65. Sladek Z., Rysanek D., Ryznarova H., Faldyna M.: Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Res.* **36**, 629–643 (2005)
66. Strassheim D., Asehnoune K., Park J.S., Kim J.Y., Hw Q., Richter D., Kuhn K., Mitra S., Abraham E.: Phosphoinositide 3-Kinase and Akt occupy central roles in inflammatory response of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *J. Immunol.* **172**, 5727–5733 (2004)
67. Sugiyama T.: Development of gastric cancer associated with *Helicobacter pylori* infection. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54**, 1: S12–S20 (2004)
68. Sukumaran S.K., Selvaraj S.K., Prasadarao N.V.: Inhibition of apoptosis by *Escherichia coli* K1 is accompanied by increased expression of Bcl<sub>XL</sub> and blockade mitochondrial cytochrome c release in macrophages. *Infect. Immun.* **72**, 6012–6022 (2004)
69. Thompson C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456–1462 (1995)
70. Tse S.M., Mason D., Botelho R.J., Chiu B., Reyland M., Hanada K., Inman R.D., Grinstein S.: Accumulation of dia-



- cyloglycerol in the *Chlamydia* inclusion vacuole: possible role in the inhibition of host cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 25210–25215 (2005)
71. Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Li X.X., Schumacker P.T., Colombini M., Thompson C.B.: Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4666–4671 (2000)
72. Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Schumacker P.T., Thompson C.B.: Bcl-x<sub>L</sub> prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell.* **3**, 159–167 (1999)
73. Vander Heiden M.G., Li X.X., Gottleib E., Hill R.B., Thompson C.B., Colombini M.: Bcl-x<sub>L</sub> promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 19414–19419 (2001)
74. Verbeke P., Welter-Stahl L., Ying S., Hansen J., Häcker G., Darville T., Ojcius D.M.: Recruitment of Bad by the *Chlamydia trachomatis* vacuole correlates with host-cell survival. *PLoS Pathogens*, **2**, 408–417 (2006)
75. Wahl C., Maier S., Marre R., Essig A.: *Chlamydia pneumoniae* induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in human monocytic cell line by an NF-kappaB-dependent pathway. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 377–381 (2003)
76. Weinrauch Y., Zychlinsky A.: The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.* **53**, 155–87 (1999)
77. Werner A.B., de Vries E., Tait S.W., Bontjer I., Borst J.: Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated Bid to inhibit its collaboration with proapoptotic Bak and Bax. *J. Biol. Chem.* **277**, 22781–22788 (2002)
78. Willis S.N., Chen L., Dewson G., Wei A., Naik A., Flechter J.I., Adams J.M., Huang D.C.S.: Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-x<sub>L</sub> but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Devel.* **19**, 1294–1305 (2005)
79. Xiao Y., Zhong Y., Su H., Zhou Z., Chiao P., Zhong G.: NF-κB activation is not required for *Chlamydia trachomatis* inhibition of host epithelial cell apoptosis. *J. Immunol.* **174**, 1701–1708 (2005)
80. Yamaguchi H., Wang H.G.: The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*, **20**, 7779–86 (2001)
81. Yanai A., Hirata Y., Mitsuno Y., Maeda S., Shibata W., Akanuma M., Yoshida H., Kawabe T., Omata M.: *Helicobacter pylori* induces antiapoptosis through nuclear factor-κB activation. *J. Infect. Dis.* **188**, 1741–1751 (2003)
82. Yilmaz O., Jungas T., Verbeke Ph., Ojcius D.M.: Activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **72**, 3743–3751 (2004)
83. Ying S., Seiffert B.M., Häcker G., Fischer S.F.: Broad degradation of proapoptotic proteins with the conserved Bcl-2 homology domain 3 during infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* **73**, 1399–1403 (2005)
84. Zhang J.-Z., Sinha M., Luxon B.A., Yu X.: Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infect. Immun.* **72**, 498–507 (2004)
85. Zhang H., Cowan-Jacob S.W., Simonen M., Greenhalf W., Heim J., Meyhack B.: Structural basis of Bfl-1 for its interaction with Bax and its antiapoptotic action in mammalian and yeast cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 11092–11099 (2000)



Iwona Komaniecka, Adam Choma

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail: [ikoma@biotop.umcs.lublin.pl](mailto:ikoma@biotop.umcs.lublin.pl)

Wpłynęło w marcu 2006 r.

1. Wprowadzenie. 2. Struktura peryplazmatycznych glukanów. 2.1. Liniowe  $\beta$ -(1,2)-glukany. 2.2. Cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany (cyklosoforany). 2.3. Cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu  $\alpha$ -(1,6) w pierścieniu. 2.4. Cykliczne  $\beta$ -(1,3);(1,6)-glukany. 3. Synteza peryplazmatycznych glukanów. 3.1. Biosynteza szkieletu cukrowego. 3.2. Modyfikacja oligosacharydów. 3.3. Regulacja biosyntezy OPG. 4. Rola peryplazmatycznych glukanów. 5. Podsumowanie

### Periplasmic $\beta$ -glucans of Gram-negative bacteria

**Abstract:** Osmoregulated Periplasmic Glucans (OPGs) are intrinsic components of the bacterial envelope of many Proteobacteria. These oligosaccharides share several common structural characteristics: D-glucose is the sole component sugar,  $\beta$ -glycosidic bonds are the main type of linkages, glucans synthesis and accumulation are inversely proportional to the osmotic strength of the environment.

Four families of periplasmic  $\beta$ -glucans have been described so far: 1) linear oligosaccharides, which are branched and contain  $\beta$ -(1,2) and  $\beta$ -(1,6) linkages; 2) cyclic  $\beta$ -(1,2) glucans; 3) cyclic  $\beta$ -(1,2) glucans with one  $\alpha$ -(1,6) linkage; 4) cyclic  $\beta$ -(1,3);  $\beta$ -(1,6) glucans. OPGs may be substituted by one or several residues such as: *sn*-1-phosphoglycerol, phosphoethanolamine or phosphocholine, which originate from the membrane phospholipids. Also some intermediary metabolites can serve as glucan substituents (i.e.: acetic, methylmalonic and succinic acid O-ester). Periplasmic  $\beta$ -glucans may be neutral or anionic in character. Except for the role in osmoprotection, OPGs are important in virulence, symbiosis, biofilm formation and resistance to antibiotics.

1. Introduction. 2. The structure of periplasmic glucans. 2.1. Linear  $\beta$ -(1,2)-glucans. 2.2. Cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans (cyclosoforans). 2.3. Cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans with one  $\alpha$ -(1,6)-linkage in the ring. 2.4. Cyclic  $\beta$ -(1,3);(1,6)-glucans. 3. Synthesis of periplasmic glucans. 3.1. Biosynthesis of sugar backbone. 3.2. Modification of oligosaccharides. 3.3. Regulation of OPG biosynthesis. 4. The role of periplasmic glucans. 5. Summary

---

**Słowa kluczowe:** osmoregulacja, OPG, peryplazmatyczny  $\beta$ -glukan

**Key words:** osmoregulation, OPG, periplasmic  $\beta$ -glucan

---

## 1. Wprowadzenie

W roku 1942 McIntire i współpracownicy opisałi cykliczne oligomery glukozy wyizolowane z pożywki, w której hodowano bakterie z gatunku *Agrobacterium tumefaciens* (obecnie: *Rhizobium radiobacter*) [32]. Sądzone, że stanowią one nową podklasę egzopolisacharydów. Nieco później podczas badań nad metabolizmem fosfolipidów u *E. coli* wykazano obecność podobnych związków w peryplazmie tych bakterii. Wykazano wtedy, że przemiany fosfatydyloglicerolu są związane z transferem reszty *sn*-1-fosfoglicerolu na cząsteczkę peryplazmatycznego glukanu. W literaturze przyjął się skrót MDO (membrane derived oligosaccharides) dla określenia tych oligosacharydów. Okazało się, że zarówno glukany wyizolowane z komórek *A. tumefaciens*, jak i MDO z peryplazmy *E. coli* podlegają regulacji osmotycznej. Stąd wywodzi się ich wspólna nazwa: osmoregulowalne peryplazmatyczne glukany (osmoregulated periplasmic glucans – OPG) [27, 34].

Obecnie przyjmuje się, że OPG są powszechne u bakterii Gram-ujemnych i mieszczą się w przestrzeni

peryplazmatycznej. Przestrzeń ta jest wypełniona macierzą mającą postać żelu, w której oprócz glukanów i woreczka mureinowego obecne są liczne białka: między innymi enzymy, białka opiekuńcze, przenośniki substancji drobnocząsteczkowych, takich jak: aminokwasy, peptydy, cukry, witaminy, koenzymy, nukleotydy i jony związków nieorganicznych. W poszczególnych grupach bakterii glukany mają różną budowę, jednak można dopatrzeć się pewnych cech wspólnych. Są to polimery D-glukozy, która może być dodatkowo podstawiona składnikami niecukrowymi. Z reguły reszty glukozy są ze sobą połączone wiązaniami  $\beta$ -glikozydowymi, a wiązania  $\alpha$ -glikozydowe spotyka się sporadycznie. Glukany mogą stanowić od 5 do 20% całkowitej suchej masy komórki. Ich ilość zależy od gatunku bakterii, warunków hodowli, a także od fazy wzrostu komórek. Najwięcej tych oligocukrów powstaje w logarytmicznej fazie wzrostu hodowli. W przestrzeni peryplazmatycznej mogą osiągać stężenie od 10 do 100 mM. Część glukanów jest wydzielana do podłoża. Tutaj ich ilość różni się znacznie i zależy od gatunku bakterii, a także jest silnie uwarunkowana przez fazę wzrostu oraz czynniki otoczenia. Wydzielanie

peryplazmatycznych glukanów na zewnątrz komórki wymaga wysoka temperatura oraz osmotycznie czynne składniki pożywek. Duże ich stężenie w podłożu stwierdza się w stacjonarnej fazie hodowli.

## 2. Struktura peryplazmatycznych glukanów

Na podstawie budowy cząsteczek można oligocukry te zaklasyfikować do czterech grup:

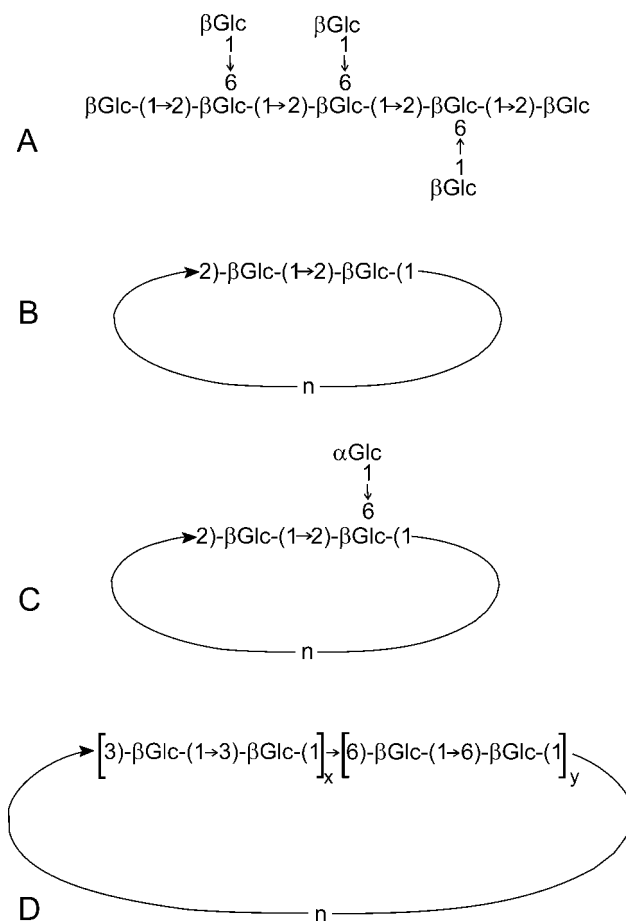
1. liniowe  $\beta$ -(1,2)-glukany;
2. cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany;
3. cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu  $\alpha$ -(1,6);
4. cykliczne  $\beta$ -(1,3);(1,6)-glukany.

### 2.1. Liniowe $\beta$ -(1,2)-glukany

Do tej grupy należą peryplazmatyczne oligocukry pochodzące z komórek *E. coli* oraz innych enterobakterii. Szkielet cząsteczki najczęściej jest utworzony z 8–9 reszt glukozy, choć spotyka się również cząsteczki zbudowane z 5 a nawet 12 reszt (rys. 1A). Cząsteczki glukozy w głównym łańcuchu są ze sobą połączone wiązaniami typu  $\beta$ -(1,2). Stwierdzono obecność licznych odgałęzień przyłączonych wiązaniami  $\beta$ -(1,6) glikozydowymi. Charakterystyczną cechą tej klasy peryplazmatycznych glukanów jest obecność podstawników niecukrowych. Najczęściej są to reszty fosfoglicerolu, fosfoetanolaminy, kwasu bursztynowego i octowego. W związku z tym większość cząsteczek glukanów znajdujących się w przestrzeni peryplazmatycznej komórek *E. coli* ma charakter anionowy [27]. Podobną budowę posiadają liniowe oligocukry izolowane z innych bakterii należących do  $\gamma$ -Proteobacteria, jak np. *Erwinia chrysanthemi* (u której występują glukany zbudowane z 5–12 reszt glukozy) [13] oraz *Pseudomonas syringae* (6–13 reszt glukozy w cząsteczce glukanu) [43].

### 2.2. Cykliczne $\beta$ -(1,2)-glukany (cyklosoforany)

Są to oligosacharydy syntetyzowane przez bakterie należące do *Rhizobiales*, z rodzajów: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* oraz *Brucella* [10, 12, 22, 23]. Cząsteczki tych oligosacharydów są cykliczne, a monomery glukozy łączą się wyłącznie wiązaniami  $\beta$ -(1,2). Stopień polimeryzacji reszt glukozy (DP) jest dość zróżnicowany [9]. U *Rhizobium leguminosarum* wynosi od 17 do 25, u *Mesorhizobium huakuii* DP = 17–28, natomiast u *Sinorhizobium meliloti* może sięgać nawet 40 reszt glukozy w pierścieniu. Nie udało się stwierdzić  $\beta$ -(1,2)-glukanów o liczbie podjednostek mniejszej niż 17. Prawdopodobnie mniejsze pierścienie przy tym typie wiązań



Rys. 1. Struktury wybranych peryplazmatycznych glukanów:

- A) *E. coli* [26];
- B) *Mesorhizobium huakuii* [12];
- C) *Ralstonia solanacearum* [29];
- D) *Azorhizobium caulinodans* [27].

$n$  – liczba reszt glukozy w pierścieniu  
 $x, y$  – liczba reszt glukozy połączonej odpowiednio  
 wiązaniami  $\beta$ -(1,3) i  $\beta$ -(1,6)

nie są energetycznie uprzywilejowane [46]. Strukturę cyklicznego  $\beta$ -(1,2)-glukanu przedstawiono na rys. 1B.

Początkowo sugerowano, że cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany to oligocukry niemodyfikowane, a więc o charakterze obojętnym [33]. Okazało się jednak, że mogą one ulegać przemianom polegającym na dołączeniu anionowych podstawników takich, jak *sn*-1-fosfoglicerol, bursztynian, czy metylomalonian [9, 23, 35]. Dominującym podstawnikiem cyklicznych glukanów u *Sinorhizobium* i *Agrobacterium tumefaciens* jest *sn*-1-fosfoglicerol, pochodzący z części polarnej fosfatydyloglicerolu, będącego budulcem błon lipidowych. Podstawnik ten jest związany z cząsteczką glukozy w pozycji C-6 poprzez wiązanie fosfodiesterowe. Stwierdzono, że podczas logarytmicznej fazy wzrostu bakterii, liczne cząsteczki cyklicznych oligomerów są podstawiane jedną do czterech reszt *sn*-1-fosfoglicerolu, natomiast w fazie stacjonarnej obserwuje się głównie syntezę glukanów obojętnych [35].

### 2.3. Cykliczne $\beta$ -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu $\alpha$ -(1,6) w pierścieniu

Do tej grupy zaliczane są cykliczne oligosacharydy wyizolowane z komórek *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* i *Rhodobacter sphaeroides* [42, 45]. Częsteczki glukanu *Ralstonia* zawierają 13 reszt glukozy w pierścieniu, *Xanthomonas* wytwarza glukany zbudowane z 16 reszt, zaś *Rhodobacter* z 18. W pierścieniu oligocukrowym jedno wiązanie jest typu  $\alpha$ -(1,6), a pozostałe reszty glukozy połączone są wiązaniami typu  $\beta$ -(1,2) (rys. 1C). Prawdopodobnie obecność wiązania  $\alpha$ -(1,6) powoduje większe usztywnienie cząsteczki polimeru w porównaniu z bardziej elastycznymi strukturami cyklicznych glukanów posiadających w szkielecie wyłącznie wiązania typu  $\beta$ -(1,2) [30].

### 2.4. Cykliczne $\beta$ -(1,3);(1,6)-glukany

Ta grupa obejmuje polimery, w których reszty glukozy są ze sobą połączone wiązaniami  $\beta$ -(1,3) i  $\beta$ -(1,6)-glikozydowymi. Obecność takich oligosacharydów stwierdzono u bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*, u gatunków: *Azospirillum brasilense* oraz *Azorhizobium caulinodans* [1, 28, 41].

*Bradyrhizobia* syntetyzują cykliczne  $\beta$ -glukany zawierające od 10 do 13 reszt glukozy w pierścieniu. W cząsteczce zbudowanej z 13 reszt, dwanaście tworzy szkielet główny, natomiast trzynasta reszta jest rozgałęzieniem łączącym się z pierścieniem poprzez grupę OH przy węglu C-6 glukozy tworzącej wiązanie  $\beta$ -(1,3)-glikozydowe. W takim oligomerze reszty glukozy połączone wiązaniami  $\beta$ -(1,3) mogą być zgrupowane w układy tripletowe, które są oddzielone resztami glukozy połączonej wiązaniami  $\beta$ -(1,6). Sekwencje zawierające wiązania typu  $\beta$ -(1,6), mogą występować w grupach: po dwie, cztery lub pięć reszt glukozy. Częsteczki glukozy tworzące wiązanie  $\beta$ -(1,3) są podstawione fosfocholimą, przyłączoną do C-6 reszty glukozy. Fosfocholina będąc podwójnym jonem (zwitter ion) powoduje, że ładunek elektryczny glukanu zależy od własności roztworu, w którym są one rozpuszczone [9, 41].

Opisane niedawno peryplazmatyczne glukany *Azorhizobium caulinodans* mają budowę podobną do oligocukrów bradyrhizobiowych (rys. 1D). Stopień polimeryzacji tych cyklicznych molekuł wynosi od 10 do 13. Zdecydowaną większość (97%) stanowią cząsteczki jedenastomerowe. Stwierdzono, że w tych oligocukrach wiązania typu  $\beta$ -(1,3) mogą występować w grupach zawierających od dwóch do siedmiu reszt glukozy, z widoczną przewagą fragmentów złożonych z trzech i czterech monomerów. W przeciwieństwie do glukanów *Bradyrhizobium*, u *Azorhizobium* brak jest odgałęzień, a cząsteczki mają charakter obojętny, nie stwierdzono bowiem u nich jakichkolwiek podstawników [27].

Peryplazmatyczne glukany wyizolowane z komórek *Azospirillum brasilense* są mieszaniną trzech typów oligomerów. Podstawowy typ zbudowany jest z 12 reszt glukozy, połączonych trzema wiązaniami typu  $\beta$ -(1,3), ośmioma  $\beta$ -(1,6) i jednym wiązaniem typu  $\beta$ -(1,4). Drugi typ glukanu powstaje przez przyłączenie wiązaniem  $\alpha$ -(1,3) jednej reszty glukozy do wspomnianej struktury podstawowej. Trzeci typ to modyfikacja glukanu typu drugiego. Polega ona na metylowaniu  $\alpha$ -(1,3)-związanej reszty glukozy w pozycji C-2 [1].

## 3. Synteza peryplazmatycznych glukanów

### 3.1. Biosynteza szkieletu cukrowego

Na podstawie analizy fenotypów mutantów niezdolnych do syntezy glukanów wyodrębniono i scharakteryzowano szereg genów niezbędnych w biosyntezie OPG.

U *E. coli* wykryto dwa geny tworzące operon *opgGH* (lub *mdoGH*). Znajduje się on w bezpośrednim sąsiedztwie genu *pyrC*, którego produkt bierze udział w syntezie uracylu [8, 27]. Produktem genu *opgH* jest białko błonowe o masie cząst. 97 kDa. Osiem segmentów transmembranowych połączonych trzema długimi regionami cytoplazmatycznymi tworzy kanał, służący do translokacji OPG do przestrzeni peryplazmatycznej. Proces translokacji odbywa się równolegle z biosyntezą łańcucha cukrowego [14]. Białko OpgH (MdoH) jest niezbędne do wyrażenia aktywności glukozylotransferazy, katalizującej *in vitro* powstawanie liniowego łańcucha  $\beta$ -(1,2)-oligosacharydowego z UDP-glukozy jako prekursora [27]. Główna domena OpgH wykazuje pewne podobieństwa strukturalne z rodziną 2-glikozylotransferaz [7].

OpgG (MdoG) jest białkiem peryplazmatycznym o masie cząst. 56 kDa, zawiera ono dwie domeny o strukturze  $\beta$ . Miejsce aktywne tego białka enzymatycznego zbudowane jest z aminokwasów kwaśnych i aromatycznych, wykazując podobieństwo strukturalne do takich enzymów jak mutarotaza galaktozowa i glukodekstranaza. OpgG współpracuje z OpgH, katalizując proces tworzenia odgałęzień od głównego szkieletu glukanu. Ponieważ prekursor do tej reakcji (UDP-glukoza) znajduje się wyłącznie w cytoplazmie, to najbardziej prawdopodobne jest, że rozgałęzienia mogą powstawać poprzez rearanżację podjednostek glukozyowych pierwotnie przyłączonych do liniowego szkieletu wiązaniem  $\beta$ -(1,2)-glikozydowym. Przypuszcza się, że po peryplazmatycznej stronie błony cytoplazmatycznej OpgG wycina i przenosi reszty glukozy na tę samą lub inną cząsteczkę glukanu, tworząc rozgałęzienia przyłączone wiązaniem  $\beta$ -(1,6)-glikozydowym. Podobny proces zachodzi podczas powstawania

rozgałęzień w cząsteczkach glikogenu [21]. Udowodniono, że operon *opgGH* (*mdoGH*) podlega kontroli osmotycznej [7, 27].

Geny homologiczne do *opgGH* wyizolowano z komórek *Pseudomonas syringae* i *Erwinia chrysanthemi* [7, 27]. Obecność konserwatywnych sekwencji wykazujących podobieństwo do sekwencji *opgGH* stwierdzono również u innych bakterii należących do  $\gamma$ -Proteobacteria. U  $\beta$ -Proteobacteria takie sekwencje stwierdzono w genomie *Nitrosomonas europaea* [27].

Bakterie *Sinorhizobium meliloti* posiadają dwa sprzężone geny: *ndvB* i *ndvA* (**n**odule **d**evelopment) [9]. Gen *ndvB* koduje duże białko błonowe o masie cząst. około 319 kDa. Aktywność enzymatyczną NdvB badano *in vitro*. Wykazano, że jedynie 60 % cząsteczki tego białka, licząc od końca aminowego, jest niezbędne do syntezy glikanu. Produktem genu *ndvA* jest białko cytoplazmatyczne o masie cząst. 67 kDa. Sekwencja aminokwasowa tego białka wykazuje podobieństwo do składników systemu sekrecyjnego typu I (ABC-transporter), a zwłaszcza do białka HlyB. Prawdopodobnie białko NdvA bierze udział w translokacji glikanu do przestrzeni peryplazmatycznej oraz do środowiska zewnętrznego [44].

U *Agrobacterium tumefaciens* (*R. radiobacter*) zidentyfikowano podobne geny. Nazwano je *chvB* i *chvA* (**ch**romosomal **v**irulence). U *Sinorhizobium fredii* stwierdzono obecność genu *ndvB* zaś u *Brucella abortus* genu *cgs* [26]. Wykazano, że geny te mogą komplementować wadliwe szlaki biosyntezy OPG u mutantów *ndvB*<sup>-</sup> *S. meliloti* [44]. Prawdopodobnie białka NdvB i ChvB uczestniczą we wszystkich etapach biosyntezy szkieletu rozpoczynając od UDP-glukozy jako substratu. Do ich aktywacji wymagana jest obecność jonów Mg<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup>.

Dwa sprzężone geny *ndvB* i *ndvC* zidentyfikowano u *Bradyrhizobium japonicum*. Produktem genu *ndvB* jest białko o masie cząst. 102 kDa, zaś genu *ndvC* – białko o masie cząst. 62 kDa. Prawdopodobnie oba są białkami błonowymi. Inaktywacja genu *ndvB* prowadzi do zahamowania syntezy OPG, natomiast gdy inaktywacji ulega gen *ndvC*, produkowana jest normalna ilość OPG lecz w szkielecie reszty glukozy połączone są wyłącznie wiązaniami typu  $\beta$ -(1,3). Należy wnosić, że białko NdvB jest niezbędne do zainicjowania polimeryzacji  $\beta$ -(1,3) związanych reszt glukozy. Z kolei NdvC jest odpowiedzialne za powstawanie wiązań typu  $\beta$ -(1,6). Ostateczna forma glikanu może powstawać na drodze przyłączenia kolejnej podjednostki glukozowej wiązaniem  $\beta$ -(1,6), albo też poprzez rearanżację wiązań  $\beta$ -(1,3) pierwotnej molekuly [6]. Białko NdvB *B. japonicum* nie wykazuje znaczących podobieństw z sekwencją aminokwasową analogicznego białka *S. meliloti*. Należy ono do tej samej klasy glikozylotransferaz co OpgH. Natomiast gen *ndvC*

ma podobną sekwencję do niektórych genów drożdżowych, biorących udział w metabolizmie glikanów u tych mikroorganizmów [6].

### 3.2. Modyfikacja oligosacharydów

Szkielet OPG jest modyfikowany poprzez przyłączenie różnych podstawników. Podstawniki te mogą pochodzić od fosfolipidów błonowych, jak np.: fosfatydyloglicerol, fosfatydyloetanamina czy fosfatydylocholina. Mogą to być również metabolity pośrednie, np.: acetyl, bursztynian, metylomalonian, których donorem jest odpowiedni acylo-CoA.

Stwierdzono, że zarówno u *E. coli* jak i u *S. meliloti*, przenoszenie reszt fosfoglicerolu następuje w przestrzeni peryplazmatycznej [27, 33, 44]. I tak, u *E. coli*, wykryto gen *opgB* (*mdoB*), który koduje białko błonowe. Wykazano, że przenosi ono resztę fosfoglicerolu z zewnętrznej powierzchni błony komórkowej na sztuczny akceptor, jakim była arbutyna, ale nie katalizuje tego procesu w obecności rozpuszczalnych cząsteczek peryplazmatycznych glikanów. W związku z tym wydaje się, że reszty fosfoglicerolu mogą być przyłączane jedynie do cząsteczek glikanów pozostających jeszcze w błonie cytoplazmatycznej. U *S. meliloti* zidentyfikowano gen *cgmB*, którego produkt wykazuje pewne podobieństwo do OpgB [44]. Przypisuje się mu funkcję przenośnika reszt fosfoglicerolu.

Stwierdzono, że w komórkach *S. meliloti* proces przyłączania reszt bursztynianowych do OPG zachodzi w przestrzeni peryplazmatycznej. W przypadku *E. coli* nie zlokalizowano jak dotąd miejsca, w którym zachodzi bursztynylacja OPG. Wykazano jedynie, że niezbędny do tego procesu gen *opgC* (*mdoC*) koduje białko zawierające 10 transbłonowych segmentów. Wydaje się, że białko to katalizuje transfer reszt bursztynianu z warstwy cytoplazmatycznej błony komórkowej do szkieletu glikanowego znajdującego się po stronie peryplazmatycznej błony [29].

### 3.3. Regulacja biosyntezy OPG

Biosynteza peryplazmatycznych  $\beta$ -glikanów jest regulowana przez bakterie dwiema drogami. Pierwsza z nich to regulacja osmotyczna. OPG są syntetyzowane obficie gdy osmolarność środowiska jest bardzo niska (mniejsza niż 100 mOsm). Gdy wzrasta powyżej 600 mOsm, to ilość OPG zmniejsza się nawet 10-krotnie [29]. Taki mechanizm regulacji zaobserwowano u większości przebadanych dotąd gatunków bakterii, np. u *R. sphaeroides*, *R. solanacearum*, *E. chrysanthemi*, *E. coli*. Zarówno w komórkach *E. coli* jak i *S. meliloti* obserwowano opóźnienie pomiędzy zmianą warunków osmotycznych środowiska, a odpowiedzią komórki na stres osmotyczny, która objawia się

zmianą stężenia OPG w przestrzeni peryplazmatycznej [15]. Przy gwałtownym obniżeniu osmolarności środowiska obserwuje się stopniowy wzrost syntezy OPG, przy czym musi upłynąć czas potrzebny do powstania kolejnej generacji, aby to stężenie osiągnęło wielkość charakterystyczną dla gatunku. Przy gwałtownym wzroście osmolarności podłoża synteza OPG nagle ustaje, lecz nie obserwuje się degradacji istniejących oligosacharydów. Rozcieńczenie następuje wyłącznie poprzez rozdzielanie wyjściowej puli glukanów do komórek potomnych [29]. Wydaje się, że regulacja biosyntezy OPG, w zależności od gatunku bakterii, może mieć miejsce na poziomie transkrypcyjnym i/lub posttranskrypcyjnym – czyli albo poprzez regulację ekspresji genów albo aktywności białek. Stwierdzono, że w odpowiedzi na zmianę osmolarności środowiska w komórkach bakteryjnych zmienia się stężenie niektórych substancji. I tak w komórkach *E. coli* następuje akumulacja jonów  $K^+$  i glutaminianu. Pozwala to na adaptację do środowiska o umiarkowanie wysokiej osmolarności. Natomiast przy wysokiej osmolarności, bakterie te zastępują jony potasu podwyższonym stężeniem innych związków. Mogą to być poliole, np. trehaloza, aminokwasy, np. prolina, lub też metyloaminy, np. betaina glicynowa [31]. Zjawisko nagromadzenia w cytoplazmie takich substancji jak jony potasu czy jony glutaminianowe obserwowano również u rizobiów oraz u *Agrobacterium* [36]. Rolą tych związków jest utrzymanie turgoru komórki. Dowiedziono, że u tych bakterii syntetaza  $\beta$ -(1,2)-glukanów jest wrażliwa na obecność jonów potasu i glutaminianu [24].

Stężenie OPG w przestrzeni peryplazmatycznej może być monitorowane przez jedno lub kilka białek sensorowych [17, 18]. Sugeruje się, że wchodzi one w skład systemu będącego wewnętrznym licznikiem liczby podziałów komórkowych i pośrednio kontrolerem gęstości populacji („quorum sensing”).

U bakterii należących do rodzaju *Brucella* i mutantu *S. meliloti* GR4 nie stwierdzono zależności ilości  $\beta$ -glukanów w peryplazmie od warunków środowiska zewnętrznego [10, 36, 47]. U tych mikroorganizmów syntetaza  $\beta$ -(1,2)-glukanów nie jest wrażliwa na obecność jonów  $K^+$  i glutaminianu [24]. W warunkach podwyższonej osmolarności środowiska obserwowano u *S. meliloti* zahamowanie procesu podstawiania cząsteczek glukanu resztami anionowymi. Należy więc sądzić, że synteza OPG i modyfikowanie gotowych cząsteczek to procesy niezależne [24]. Prawdopodobnie odpowiedź komórek na stres osmotyczny przebiega tutaj poprzez nagromadzenie innych związków osmotycznie czynnych takich jak betaina glicynowa [10].

Drugim mechanizmem regulacji syntezy OPG, jak dotąd słabo zbadanym, jest kontrola metaboliczna, oparta na zjawisku sprzężenia zwrotnego (tzw. „feed-

back control”). Ten mechanizm został odkryty podczas badań nad szczepami *E. coli* niezdolnymi do syntezy OPG przy braku glukozy w pożywce. Po dodaniu glukozy do podłoża następowała szybka akumulacja glukanów w komórkach [27, 28]. Prawdopodobnie ten mechanizm regulacji występuje również w komórkach *Azorhizobium caulinodans*. U tych bakterii produkcja glukanu nie podlega regulacji osmotycznej. Zaobserwowano jednocześnie znaczny przyrost ilości peryplazmatycznych glukanów w komórkach podczas wzrostu w warunkach stresu osmotycznego spowodowanego dodatkiem glukozy do podłoża [28].

#### 4. Rola peryplazmatycznych glukanów

Badania fenotypów mutantów bakteryjnych defektywnych w procesie syntezy glukanów dostarczyły informacji pozwalających na określenie ich znaczenia biologicznego. Mutanty *hrpM Pseudomonas syringae* oraz mutanty *chv Agrobacterium tumefaciens* (*R. radiobacter*) są niezdolne do wywołania reakcji nadwrażliwości (HR) u roślin [11], zaś mutanty *ndv S. meliloti* tworzą defektywne brodawki na korzeniach lucerny [19]. Mutacje w genie *ndvB* u *B. japonicum* powodują całkowity brak OPG, natomiast zmiany w genie *ndvC* objawiają się powstawaniem strukturalnie odmiennych glukanów zawierających jedynie wiązania typu  $\beta$ -(1,3), o czym wspomniano w rozdziale 3.1. Mutanty *ndvB* mają upośledzoną zdolność do ruchu i do wzrostu na podłożu hipoosmotycznym, a także tworzą nieefektywne, ale wyraźnie zróżnicowane brodawki na korzeniach soi, roślinnym gospodarzu *B. japonicum* [5]. Z kolei zaobserwowano, że mutanty w genie *ndvC* produkujące cykliczne glukany zawierające wyłącznie wiązania typu  $\beta$ -(1,3) (tzw. cyklodekakis-(1,3)- $\beta$ -glukany), wykazują zdolność do ruchu i wzrostu w warunkach obniżonego ciśnienia osmotycznego na poziomie szczepu rodzicielskiego, ale nie są zdolne do nawiązania efektywnej symbiozy [4]. Proces brodawkowania jest wydatnie opóźniony, a pozbawione bakterii pseudobrodawki, zawierają komórki o pogrubionej ścianie, zagęszczonej cytoplazmie i licznych wakuolach [6]. Na podstawie tych obserwacji wysunięto wniosek, że odpowiednia struktura cyklicznego  $\beta$ -glukanu jest ważna dla prawidłowego przebiegu interakcji symbiotycznych oraz, że glukany bakterii symbiotycznych, oprócz swej roli osmoregulacyjnej, prawdopodobnie pełnią również inne, jeszcze bliżej nieokreślone funkcje.

Wykazano, że OPG wytwarzane przez bakterie *B. japonicum* zawierające w swej strukturze wiązania typu  $\beta$ -(1,3);(1,6) są podobne strukturalnie do frakcji niecyklicznych  $\beta$ -(1,3);(1,6)-heptaglukozydowych oligocukrów, pochodzących ze ściany komórkowej grzybowych

patogenów soi. Oligocukry te są potężnymi aktywatorami fitoaleksyn (głównie gliceoliny sojowej) [2]. W przeciwieństwie do glukanów grzybowych, cykliczne  $\beta$ -glukany bradyrizobiów są słabymi aktywatorami produkcji gliceoliny. Jednocześnie stwierdzono, że  $\beta$ -(1,3);(1,6)-glukany *B. japonicum* USDA 110 wstrzymują odpowiedź obronną indukowaną obecnością oligocukrów grzybowych [37]. Należy więc mniemać, że cząsteczki te funkcjonują również jako supresory odpowiedzi obronnej gospodarza podczas inwazji komórek korzenia soi przez bradyrizobia [6].

Podczas, gdy cykliczne  $\beta$ -(1,3);(1,6)-glukany *B. japonicum* wydają się być niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu brodawkowania, takiej zależności nie obserwuje się w przypadku glukanów *S. fredii* [25]. Bakterie te produkują cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany, które posiadają ładunek ujemny uwarunkowany obecnością reszt fosfoglicerolu. Mutanty w genie *ndvB* mimo, że nie były zdolne do wytwarzania glukanu, to jednak indukowały aktywne, wiążące azot brodawki na korzeniach dwóch różnych odmian soi.

Z kolei badania przeprowadzone przez Dylana i wsp. [16] na mutantach *S. meliloti*, defektywnych w syntezie  $\beta$ -(1,2)-glukanu, pozwoliły stwierdzić, że mutanty te nie są zdolne do tworzenia efektywnych brodawek. Powstające pseudobrodawki są małe, białe i niezasiedlone. Mutanty *ndvA* i *ndvB* *S. meliloti* charakteryzują się utratą ruchliwości, podwyższoną odpornością na bakteriofagi i wzrostem wrażliwości na niektóre antybiotyki. Mutanty *ndv* są defektywne zarówno w zdolności do przylegania do powierzchni komórek roślinnych jak również mają ograniczoną zdolność do inicjacji nici infekcyjnych na korzeniach lucerny. Pseudorewertanty tych mutantów, mimo braku zdolności do syntezy peryplazmatycznego glukanu, zdolne były do wzrostu w warunkach obniżonej osmolarności środowiska. Zaobserwowano również istotną poprawę zdolności do przylegania lecz jednocześnie niewielki wzrost zdolności do tworzenia nici infekcyjnych. Wysłunięto tezę, że cykliczne  $\beta$ -(1,2)-glukany wytwarzane przez sinorizobia mogą funkcjonować jako cząstki sygnałowe i osmoprotektanty wspierające nodulację, lecz nie są one kluczowe dla samego procesu brodawkowania [16].

Mutacje w genach *opgGH* *E. chrysanthemi* powodują plejotropowe zmiany w fenotypie bakterii, obejmujące: nadprodukcję egzopolisacharydów (co sprawia, że kolonie są śluzowe), osłabioną ruchliwość, wzmoczoną wrażliwość na sole żółciowe, obniżoną produkcję enzymów celulolitycznych, proteolitycznych oraz pektynolitycznych, co w konsekwencji prowadzi do utraty wirulencji [13, 38]. Pośród różnych efektów obserwowanych u mutantów *opg<sup>-</sup>* *E. chrysanthemi* najważniejsza wydaje się być redukcja wytwarzania i sekrecji liazy pektynowej, pełniącej kluczową

rolę w wirulencji. Wydaje się, że OPG obecne w przestrzeni peryplazmatycznej tych bakterii są niezbędne dla wzrostu na gospodarzu roślinnym, nie tylko podczas samej kolonizacji rośliny, lecz również podczas namnażania się bakterii w zmacerowanej tkance [38].

Oporność *E. coli* na detergenty typu SDS jest związana z obecnością OPG. Brak lub zahamowanie syntezy OPG w obecności SDS prowadzi do lizy komórek. Stwierdzono, że nadwrażliwość na SDS występuje zarówno u mutantów w genie *opgG* jak i *opgH*. Odnotowano również wzrost wrażliwości na szok wywołany obecnością SDS w komórkach szczepów rodzicielskich *E. coli* rosnących w warunkach indukujących obniżenie ilości OPG w przestrzeni peryplazmatycznej [40].

Mutanty niezdolne do syntezy OPG wykazują plejotropowe zmiany w fenotypie, wynikające z upośledzenia funkcji osłon komórkowych. Mutanty *A. tumefaciens* i *S. meliloti* o fenotypie *Opg<sup>-</sup>* wyraźnie słabiej rosną na podłożu hipoosmotycznym [9], podczas gdy wzrost podobnych mutantów *E. coli* czy *E. chrysanthemi* jest tylko lekko upośledzony [27]. Obserwuje się również zmiany w chemotaksji i ruchliwości, co może być konsekwencją zmniejszonego poziomu syntezy flagelliny. Mutanty *opg<sup>-</sup>* *E. coli* mają inny skład poryn, tzn. błona tych bakterii zawiera podwyższoną ilość OmpC. Ponadto te bakterie są odporne na lizujące białko faga MS2 i wytwarzają zwiększoną ilość kapsularnego polisacharydu (CPS), zwanego kwasem kolanowym [17, 27]. Wydaje się, że aktywacja genów odpowiedzialnych za proces biosyntezy CPS może polegać na wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy OPG i białkiem RcsC (sensorem) oraz białkiem RcsB (pozytywnym regulatorem).

Peryplazmatyczne glukany są zaangażowane w mechanizmy osmoprotekcji, wirulencji oraz oporności na antybiotyki. Odgrywają one również rolę w regulacji syntezy EPS, który jest niezbędny w rozwoju architektury biofilmu [39]. Mikroorganizmy uorganizowane w postaci biofilmu są odporne na działania obronne gospodarza i terapię antybiotykową. Przykładem niech będą biofilmy uropatogennych szczepów *E. coli* tworzące się w drogach moczowych i na powierzchni cewników. W obrębie powstających ognisk infekcji obserwuje się wzrost oporności na rutynowo stosowane antybiotyki. Należy nadmienić, że zakażenia dróg moczowych stanowią najbardziej pospolite zakażenia bakteryjne występujące u ludzi [20].

Peryplazmatyczne glukany to ważny, integralny składnik osłon zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych. Odgrywają one istotną rolę w przeżywalności bakterii w ekstremalnych warunkach środowiska oraz podczas interakcji bakterii z organizmami eukariotycznymi. Peryplazmatyczne glukany niosące ładunek ujemny biorą udział w utrzymaniu potencjału Donnana w porządek błony zewnętrznej bakterii [27]. Ponadto, wcho-



dząc w interakcję z innymi składnikami, takimi jak np. fosfolipidy, czy peptydoglikan, pełnią również rolę strukturalną w organizacji osłon komórkowych [3,7]. OPG mogą funkcjonować jako cząstki informacyjne, wrażliwe na obecność specyficznych białek w przestrzeni peryplazmatycznej [15]. Duże cząsteczki cyklicznych  $\beta$ -(1,2)-glukanów mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne z substancjami hydrofobowymi. Ich konformacja przestrzenna umożliwia powstanie miejsc, w których mieszczą się cząsteczki hydrofobowe. Te cykliczne oligocukry nie są degradowane przez enzymy obecne w organizmach zwierzęcych [7, 9].

## 5. Podsumowanie

Osmoregulowane peryplazmatyczne glukany (OPG) są istotnym składnikiem osłon zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych. Mimo swej różnorodności posiadają one pewne cechy wspólne: jedynym składnikiem cukrowym jest D-glukoza, połączona głównie wiązaniami typu  $\beta$ -glikozydowego, a ich synteza i nagromadzenie w peryplazmie jest odwrotnie proporcjonalne do siły osmotycznej środowiska. Dotychczas opisano cztery rodziny peryplazmatycznych glukanów.

Oprócz roli w osmoprotekcji, peryplazmatyczne glukany są istotne w wirulencji, w symbiozie, w trakcie tworzenia biofilmu oraz w oporności szczepów na antybiotyki.

Właściwości cyklicznych  $\beta$ -glukanów wskazują drogi do ich potencjalnego zastosowania w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.

## Piśmiennictwo

1. Altabe S.G., Talaga P., Wieruszkeski J.-M., Lippens G., Ugalde R., Bohin J.-P.: Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense* (w:) Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century, red. C. Elmerich, A. Kondorosi, W. E. Newton, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1998, s. 390.
2. Ayers A.R., Ebel J., Finelli F., Berger N., Albersheim P.: Host-patogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* **57**, 751–759 (1976)
3. Banta L.M., Bohne J., Lovejoy S.D., Dostal K.: Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J. Bacteriol.* **180**, 6597–6606 (1998)
4. Bhagwat A.A., Gross K.C., Tully R.E., Keister D.L.:  $\beta$ -glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-likages. *J. Bacteriol.* **178**, 4635–4642 (1996)
5. Bhagwat A.A., Keister D.L.: Site-directed mutagenesis of the cyclic  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucan synthesis locus of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 366–370 (1995)
6. Bhagwat A.A., Mithöfer A., Pfeffer Ph.E., Kraus C., Spickers N., Hotchkiss A., Ebel J., Keister D.L.: Further studies of the role of cyclic  $\beta$ -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesises cyclodecakis-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucosyl. *Plant Physiol.* **119**, 1057–1064 (1999)
7. Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 11–19 (2000)
8. Bohin J.-P., Kennedy E.P.: Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**, 956–957 (1984)
9. Breedveld M.W., Miller K.J.: Cyclic  $\beta$ -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**, 145–161 (1994)
10. Briones G., Inón de Iannino N., Steinberg M., Ugalde R.A.: Periplasmic cyclic 1,2- $\beta$ -glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology*, **143**, 1115–1124 (1997)
11. Cangelosi G.A., Martinetti G., Nester E.W.: Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic  $\beta$ -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**, 2172–2174 (1990)
12. Choma A., Komanińska I.: Characterisation of *Mesorhizobium huakuii* cyclic  $\beta$ -glucan. *Acta Biochim. Polon.* **50**, 1273–1281 (2003)
13. Cogež V., Talaga P., Lemoine J., Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**, 3127–3133 (2001)
14. Debarbieux L., Bohin A., Bohin J.-P.: Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 6692–6698 (1997)
15. Dylan T., Helinski D.R., Ditta G.S.: Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**, 1400–1408 (1990)
16. Dylan T., Nagpal P., Helinski D.R., Ditta G.S.: Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti* *ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**, 1409–1417 (1990)
17. Ebel W., Vaughn G.J., Peters III H.K., Trempe J.E.: Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 6858–6861 (1997)
18. Fiedler W., Roterling H.: Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**, 14684–14689 (1988)
19. Geremia R.A., Cavaignac S., Zorreguieta A., Toro N., Olivares J., Ugalde R.A.: A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form  $\beta$  (1–2) glucan. *J. Bacteriol.* **169**, 880–884 (1987)
20. Hanna A., Berg M., Stout V., Razatos A.: Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4474–4481 (2003)
21. Hanouille X., Rollet E., Clantin B., Landrieu I., Ödberg-Ferragut C., Lippens G., Bohin J.-P., Villeret V.: Structural analysis of *Escherichia coli* OpgG, a protein required for the biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Mol. Biol.* **342**, 195–205 (2004)
22. Hisamatsu M.: Cyclic (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucans (cyclophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**, 137–146 (1992)
23. Hisamatsu M., Yamada T., Higashiura T., Ikeda M.: The production of acidic, O-acetylated cyclophorans (cyclic  $\beta$ -(1,2)-D-glucans) by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **163**, 115–122 (1987)
24. Inón de Iannino N., Briones G., Iannino F., Ugalde R.A.: Osmotic regulation of cyclic 1,2- $\beta$ -glucan synthesis. *Microbiology*, **146**, 1735–1742 (2000)

25. Iñón de Iannino N., Briones G., Kreiman G., Ugalde R.: Characterization of the biosynthesis of  $\beta(1\text{--}2)$  cyclic glucan in *R. fredii*.  $\beta(1\text{--}2)$  glucan has no apparent role in nodule invasion of Mc Call and Peking soybean cultivars. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 617–629 (1996)
26. Iñón de Iannino N., Briones G., Tolmasky M., Ugalde R.A.: Molecular cloning and characterisation of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic  $\beta(1,2)$  glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J. Bacteriol.* **180**, 4392–4400 (1998)
27. Kennedy E.P., Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic  $\beta$ -D-glucans) of *Escherichia coli* (w) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, red. F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Maganasik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger, Wyd. II. A.S.M., Washington DC. 1996, s. 1064–1074.
28. Komaniecka I., Choma A.: Isolation and characterization of periplasmic cyclic  $\beta$ -glucans of *Azorhizobium caulinodans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**, 263–269 (2003)
29. Lacroix J.-M., Lanfroy E., Cogez V., Lequette Y., Bohin A., Bohin J.-P.: The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **181**, 3626–3631 (1999)
30. Lippens G., Wieruszkeski J.M., Hotvath D., Talaga P., Bohin J.-P.: Slow dynamics of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* as revealed by heteronuclear relaxation studies. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 170–177 (1998)
31. Lucht J., Bremer E.: Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 3–30 (1994)
32. McIntire F.C., Peterson W.H., Riker A.J.: A polysaccharide produced by the crown-gall organism. *J. Biol. Chem.* **143**, 491–496 (1942).
33. Miller K.J., Gore R.S., Benesi A.J.: Phosphoglycerol substituents present on the cyclic  $\beta$ -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**, 4569–4575 (1988)
34. Miller K.J., Kennedy E.P., Reinhold V.N. Osmotic adaptation in Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science*, **231**, 48–51 (1986)
35. Miller K.J., Reinhold V.N., Weissborn A.C., Kennedy E.P.: Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with *sn*-1-phosphoglycerol residues. *Biochim. Biophys. Acta*, **901**, 112–118 (1987)
36. Miller K.J., Wood J.M.: Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 101–136 (1996)
37. Mithöfer A., Bhagwat A.A., Feger M., Ebel J.: Suppression of fungal  $\beta$ -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- $\beta$ -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Planta*, **199**, 270–275 (1996)
38. Page F., Altabe S., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Lacroix J.-M., Robert-Baudouy J., Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**, 3134–3141 (2001)
39. Parsek M.R., Singh P.K.: Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701 (2003)
40. Rajagopal S., Eis N., Bhattacharya M., Nickerson K.W.: Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential for sodium dodecyl sulfate resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 25–31 (2003)
41. Rolin D.B., Pfeffer P.E., Osman S.F., Szwergold R.B., Kappler F., Benesi A.J.: Structural studies of a phosphocholine substituted  $\beta(1,3);(1,6)$  macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta*, **1116**, 215–225 (1992)
42. Talaga P., Cogez V., Wieruszkeski J.M., Stahl B., Lemoine J., Lippens G., Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2464–2472 (2002)
43. Talaga P., Fournet B., Bohin J.P.: Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176**, 6538–6544 (1994)
44. Wang P., Ingram-Smith C., Hadley J.A., Miller K.J.: Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic  $\beta$ -glucan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **181**, 4576–4583 (1999)
45. York W.S.: A conformational model for cyclic  $\beta(1\text{--}2)$ -linked glucans based on NMR analysis of the  $\beta$ -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**, 205–225 (1995)
46. Zevenhuizen L.P.T.M., van Veldhuizen A. and Fokkens R.H.: Re-examination of cellular cyclic  $\beta$ -1,2-glucans of *Rhizobiaceae*: distribution of ring sizes and degrees of glycerol-phosphate substitution. *Antonie Leeuwenhoek*, **57**, 173–178 (1990)
47. Zorreguieta, A., Cavaignac S., Geremia R. A., Ugalde R.A.: Osmotic regulation of  $\beta(1\text{--}2)$ -glucan synthesis in members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **172**, 4701–4704 (1990)

**Agnieszka Mrozik, Katarzyna Hupert-Kocurek, Bożena Nowak, Sylwia Łabużek**

Katedra Biochemii Uniwersytetu Śląskiego ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, e-mail: amrozik@us.edu.pl

*Wpłynęło w lipcu 2007*

1. Introduction. 2. Characteristics of lipases. 3. Applications of lipases 3.1. Leather industry 3.2. Paper and pulp manufacture. 3.3. Detergent industry 3.4. Biodiesel production 3.5. *In vitro* synthesis of biodegradable polyesters 3.6. Wastewater treatment. 4. Summary

**Abstract:** Microbial lipases represent an extremely versatile group of enzymes that are capable of performing a variety of important reactions. They belong to the class of serine hydrolases and act at the interface generated by a hydrophobic lipid substrate in a hydrophilic medium. Their synthesis and secretion by microorganisms is influenced by many factors like temperature, pH, ions, carbon and nitrogen sources and dissolved oxygen concentration. Microbial lipases are used in leather, detergent, pulp and paper industry, sewage treatment, biodiesel and biodegradable polymers production and bioremediation. Due to various properties lipases are helpful tools in biotechnology and environment protection fields.

#### **Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego i ich znaczenie w ochronie środowiska**

**Streszczenie:** Lipazy bakterii i grzybów stanowią różnorodną grupę enzymów przeprowadzających reakcje: hydrolizy, *trans*-estryfikacji triacylogliceroli, enancjoselektywną syntezę i hydrolizę różnych estrów. Pod względem budowy należą do klasy hydrolaz serynowych i charakteryzują się zdolnością katalizy międzyfazowej, czyli przeprowadzania reakcji w układach typu lipid-woda. Różnorodne zdolności katalityczne lipaz umożliwiają zastosowanie ich w wielu procesach biotechnologicznych i ochronie środowiska. Enzymy te coraz częściej wykorzystuje się we wstępnej obróbce skór, przemyśle papierniczym, w produkcji detergentów i surfaktantów, w syntezie biodegradowalnych materiałów opakowaniowych, produkcji biopaliw jako alternatywnego źródła energii oraz oczyszczaniu ścieków.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka lipaz. 3. Zastosowanie lipaz. 3.1. Przemysł skórzany. 3.2. Produkcja papieru. 3.3. Produkcja detergentów. 3.4. Biopaliwa. 3.5. Synteza *in vitro* biodegradowalnych poliestrów. 3.6. Oczyszczanie ścieków. 4. Podsumowanie

---

**Key words:** application, lipases, microorganisms

**Słowa kluczowe:** mikroorganizmy, lipazy, zastosowanie

---

## **1. Introduction**

Lipases occur widely in nature but only microbial lipases constitute an important group of biotechnologically valuable enzymes, which have become very attractive for industrial and environmental applications. Because of a great variety of catalytic activities, ease of genetic manipulations, rapid growth of microorganisms on inexpensive media as well as more convenient and safer production, they are more useful than enzymes derived from plants or animals. Moreover, most of them can be produced in large quantities and are quite stable under non-natural conditions such as high temperature and nonaqueous organic solvents employed in many applications [54]. Microbial lipases can be produced by fermentation of biobased materials but most of the commercially used lipases are produced in synthetic media by recombinant strains of bacteria, yeast and fungi [21, 56]. Particularly, bacteria from the genera *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium* and *Streptomyces* have been exploited for the production of these enzymes [14, 35, 45, 49, 57]. The main producers of fungal lipases are species of filamentous fungi *Aspergillus*, *Rhizopus*,

*Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Humicola* and *Fusarium*. Lipases from *Candida*, *Yarrowia* and *Pichia* have also been reported [4, 23, 47, 50, 56].

Microbial lipases find promising applications in organic chemical processing, detergent formulations, synthesis of biosurfactants, the oleochemical, dairy and agrochemical industries, paper manufacture, nutrition, cosmetics, perfumery and biocatalytic resolution of pharmaceuticals [21, 53]. Furthermore, novel lipase applications have been successfully established as a solution to many environmental problems. For example, technologies of *in vitro* synthesis of biopolymers instead of biostable and nonbiodegradable polyolefins used as packaging materials and the synthesis of biofuels as an alternative source of energy have been implemented. Microbial lipases are also helpful in the breakdown of fats in domestic sewage and anaerobic digesters [24, 64].

## **2. Characteristics of lipases**

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis and transesterification of triglycerides, enantioselective synthesis, and the hydrolysis

of a variety of esters. They belong to the class of serine hydrolases and contain the consensus sequence  $G-X_1-S-X_2-G$  as the catalytic moiety, where G = glycine, S = serine,  $X_1$  = histidine and  $X_2$  = glutamic or aspartic acid. All known lipases span a molecular weight range of 19 to 60 kDa and exhibit a characteristic folding pattern  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold. The core of enzymes is composed of a central  $\beta$ -pleated sheet consisting of up to eight different  $\beta$  strands ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ) connected by up to six  $\alpha$  helices (A-F). Distinctive feature of the lipases is covering of their active site by a lid-like structure composed of one or two  $\alpha$  helices. The lid moves allowing the active site to become accessible for the substrate [3, 41, 59].

The majority of the microbial lipases is secreted extracellularly and does not require any cofactors. Lipases isolated from bacteria and fungi possess a wide range of properties depending on their sources with respect to positional and fatty acid specificity, thermostability and pH optimum. Most of lipases attack the fatty acids at 1 or 3 carbon position of glycerol or both the positions but not the fatty acid at the 2 position of the glycerol molecule. However, through random acyl migration, the 2-fatty acid monoglyceride undergoes rearrangement pushing the fatty acid to the 1 or 3 position of the glycerol molecule [53].

Interestingly, under natural conditions lipases catalyse the hydrolysis of ester bonds at the interface between an insoluble substrate phase and the aqueous phase in which the enzyme is dissolved. Kinetics of lipases cannot be described with the Michaelis-Menten model since this model is valid only in the case of one homogenous phase. The interfacial catalysis proceeds in two stages. Firstly, the physical adsorption of the enzyme at the lipid interface connected with the enzyme activation through opening of the lid blocking the active site takes place. Upon opening, the exposed substrate-binding site and the inside of the lid form a large hydrophobic patch, which is supposed to interact with the hydrophobic substrate interface. Secondly, the formation of the enzyme/substrate complex followed by substrate hydrolysis regenerates and releases the adsorbed enzyme. However, some of the lipases do not show interfacial activation because of shorter amino acid sequence of the lid oligopeptide as observed for *Burkholderia glumae* or lack of this structure in *Bacillus subtilis* lipase [5, 62, 63].

### 3. Applications of lipases

Enzymes are major contributors to clean industrial products and processes. Various industries have replaced old processes using chemicals that have detrimental effects on the environment and equipment with

new processes that use enzymes under less corrosive conditions. The applications in which enzymes, among them lipases, are used are many and diverse.

Since most of the industrial processes in which lipases are employed function at temperatures exceeding 45°C, thermal stability of lipases related to their structure is the most desirable characteristic. Among features stabilising enzyme structure are: low frequency of valine, isoleucine and threonine, many disulphide bonds, hydrophobic and aromatic interactions, ion-pair networks, increase core hydrophobicity, low level of surface amino acids prone to deamidation (Gln, Asn) and oxidation (Cys, Met) [61]. Thermostable lipases stable at 55–75°C have been isolated from many sources, including *Pseudomonas fluorescens*, *Geobacillus* sp., *Kurtzmanomyces* sp. I-11 [1, 26, 32, 56]. Although few lipases, for example of *Burkholderia cepacia* and *Pyrococcus horikoshii*, are able to operate at 90–100°C, their half-lives are reported to be short [48, 65]. Cold-adapted lipases are largely distributed in microorganisms existing at low temperatures in Antarctic, Polar and Alpine regions, deep sea and frozen food. Such enzymes probably are structurally modified by an increasing flexibility of the polypeptide chain enabling an easier accommodation of substrates at low temperature. A very low proportion of arginine residues as compared to lysine, a low content in proline residues, a small hydrophobic core, a very small number of salt bridges and of aromatic-aromatic interactions, as well as a large proportion of arginine on protein surface make lipases active at low temperature [25]. Cold-active enzymes exhibit higher catalytic activities at low temperatures than do their mesophilic and thermophilic counterparts, for example *Acinetobacter* sp. strain no. 6 lipase with optimum at 20°C [58].

#### 3.1. Leather industry

Leather industry contributes to one of the major industrial pollution problems. The pollution causing chemicals are: lime, sodium sulphide, salts, solvents (trichloroethylene, white spirit, marlophen 89) and surfactants (nonyl phenol ethoxylate, alkyl alcohol ethoxylate). The formation of pollution is significantly higher in the pre-tanning than the post-tanning operations. In order to overcome the hazards caused by the tannery effluents the use of enzymes as an alternative tool has been applied in pre-tanning operations such as soaking, dehairing, bating, degreasing and offal treatment [27].

Lipases are enzymes that specifically degrade fat and so cannot damage the leather itself. They hydrolyse not only the fat on the outside of the hides and skins but also the fat inside the skin structure. Alka-

line lipases are applied during soaking and/or liming preferably in combination with the relevant protease. The combination of alkaline lipases and proteases applied in enzyme-assisted liming process speeds up the reaction led with the standard chemicals. The role of protease is opening up the membranes surrounding the fat cell, making the fat accessible to the lipase. It makes fat more mobile and the breakdown products emulsify the intact fat, so that in many cases proper degreasing with surfactants is not necessary. The composition of enzymes breaks down fat and proteinaceous matter such as dermatan sulphate, thus facilitating the opening up of the structure and removal of hair [21].

Degreasing is the next step in the leather treatment. This process is generally carried out using aqueous emulsification with detergents or by solvent extraction. It is well known that organic solvents like kerosene, petrol, perchloroethylene, trichloroethylene and surfactants such as nonyl phenol ethoxylate are highly unsafe and hazardous to the workers and heavily pollute the environment. When using lipases the original surfactant dosage can be reduced by at least 50% in the case of both sheepskins and pigskins. For bovine hides lipases allow tensides to be replaced completely. Furthermore, the application of lipases, which are projected as alternatives for solvents and detergents, allow the recovery of valuable by-products [42].

The additional advantage of using lipases is more uniform colour and a cleaner appearance of the leather manufactures. Moreover, good opening of the fibre structure by lipases improves the subsequent uptake of the waterproofing chemicals during the production of hydrophobic and waterproof and low-fogging leathers. Lipases can also be applied in an acid process, for example for pickled skin or wool-on and fur, or semiacid for wetblue.

In the last decade, the leather industry has successfully applied commercial bioproducts containing microbial lipases. Among them are Forenzym SK and LM (bacterial lipases and proteases) for soaking and dehairing, Novolime (microbial lipase and protease blend) for liming, Forenzym BT (pancreatic trypsin and bacterial lipase and protease) for bating, Forenzym WG-L (bacterial acid lipase), Forenzym DG (bacterial lipase), Greasex (microbial alkaline lipase) and NovoCor A (microbial acid lipase) for degreasing [60].

### 3.2. Paper and pulp manufacture

Certain types of wood, especially from pines, contain lipophilic extractives in which resin acids, triglycerides, steryl esters, terpenes, terpenoids and waxes constitute the major part. These compounds cause production problems in pulp and paper manufacturing when released together with carbohydrates

and lignin into the process waters during mechanical pulping [51]. Dispersed as colloidal droplets, ranging in size from 0,15 to 0,4  $\mu\text{m}$ , and sterically stabilised by polysaccharides, these substances cause numerous problems in pulp and paper manufacture, including deposits in and on equipment, adverse effect on water absorption by the pulps, holes and tearing, discoloration and hydrophobic spots on the paper. As individual compounds the most troublesome components of resins are triglycerides, fatty acid esters of glycerol, because of the greatest negative effect on paper tensile strength [33]. The presence of extractives can also result in odour and taste problems in food packaging materials. Some of wood extractives together with organic solvents may also be detrimental to the environment when released into the wastewaters. Current methods for controlling pitch include traditional methods such as debarking and wood seasoning before pulping, which allow pitch to deteriorate by the action of indigenous microorganisms, and adding talc or other chemicals to the pulp to coat the resin and deactivate its surface [36]. Seasoning takes a long time and often leads to discoloration and the chemical pulping leaves a large proportion of free sterols, fatty acids and their derivatives [28]. Alternatively, biological pitch control by microbial pre-treatment i.e. spraying selected microorganisms onto wood chips or logs has been developed. The drawbacks of this method are rather long treatment time and the necessary adjustment of conditions, as well as decreased pulp yield and paper optical quality [6, 20].

Microbial enzymes are potential tools for pitch control due to their specificity enabling new technologies for processing pulps and fibers. Lipases can reduce pitch problems by lowering the triglycerides content of groundwood pulp. An enzyme obtained from *Candida cylindrica*, when added to the groundwood stock chest reduced pitch problems and talc consumption considerably. The dosage of chemicals was reduced, the time of seasoning of the wood was greatly shortened, resulting in lowered bleach consumption. Additionally lipase improved pulp properties and speeded water absorption, increased the strength and the specific volume of the resulting paper [28].

Because enzymes adsorb rapidly on pulp fiber it is not possible to recycle or reuse it. On the other hand, its adsorptive properties enable application at low pulp consistencies and the enzymes remain active and attached during various treatments and washing stages [15]. The lipase process has been scaled-up in a 12-ton per day pulp trial and has been shown to remove 90% of the triglycerides in 3 h with stirring at 37°C. At industrial scale, commercial recombinant lipase expressed in *Aspergillus oryzae*, known as Resinase (Novozymes), is used [9].

### 3.3. Detergent industry

Nowadays, there is a tendency to use lipases in the detergent industry for removal of fatty residues in laundry, dishwashers and for cleaning of clogged drains [48]. Enzymes break down soils into simpler forms that can easily be removed by the cleaner. The importance of lipases in washing agents results not only from their high efficiency, but also their role in environmental protection. Enzymes can reduce the environmental load of detergents, are biodegradable, leave no harmful residues, have no negative impact on sewage treatment processes and, what is more important, do not present a risk to aquatic life. An ideal detergent enzyme should be stable at high pH and temperature, effective at low enzyme level and have broad substrate specificity. Moreover, it should withstand oxidising and chelating agents and resist degradation caused by other enzymes present in detergent washing formula [22].

Good candidates for detergent applications are lipases produced both by bacteria and fungi. For example, bacterial lipase from *Ralstonia pickettii* improved the removal of oil from cotton fabric by 24–27% as an additive to detergent, at 40°C as washing temperature, 20 min as washing time and 0.6% as detergent concentration. The high efficiency in olive oil removal from cotton fabric exhibited also fungal lipases from *Candida cylindracea* and *Aspergillus niger* [22]. Recently R a t h i *et al.* [48] found a novel alkaline lipase synthesized by *Burkholderia cepacia* RGP-10 with pH optimum of 11 and activity in the range of 25–100°C. The isolated lipase was highly stable towards oxidising agents, alkaline proteases, both ionic and non-ionic surfactants as well as commercial detergents which makes this enzyme a potential additive for detergent formulation.

The first commercial lipase introduced in 1994 by Novo Nordisk into detergent industry was Lipolase originated from the fungus *Thermomyces lanuginosus* and expressed in *Aspergillus oryzae*. Lipolase TM, active and stable under alkaline conditions and over a broad temperature range, has a remarkable resistance to proteolytic activity of commonly used detergent proteases. It has been reported that significant benefit of using Lipolase™ was not revealed during a single wash system but only after repeated wash and dry cycles. It resulted from the low adsorption level of the enzyme caused by the presence of surfactant molecules required for dissolution of hydrolysis products in the water phase. Additionally, application of calcium chelators keeping low calcium concentration during the wash cycle decreases activity of this calcium-dependent enzyme. The free calcium concentration cannot be increased since it decreases general detergency. Moreover, in the presence of calcium, calcium soaps

are formed that are poorly water soluble and hard to remove from the fabric. Due to this inconvenience cutinases seem to be more practical in fatty soil removal. Contrary to lipases, cutinases are able to hydrolyze in the absence of calcium, although at a low adsorption rate of lipolytic enzymes are also hampered by the presence of surfactants [17].

### 3.4. Biodiesel production

Biodiesel has become more attractive recently because of its environmental benefits and the fact that it is made from renewable resources [38]. It can be produced from many vegetable oils (soybean, canola, coconut and sunflower oils), animal fats (tallow, grease), recycled greases and used vegetable oils or algae [24]. Chemically, it is a mix of monoalkyl esters of long chain fatty acids, non-flammable, non-explosive with a flash point of 150°C. Unlike petrodiesel, it is biodegradable and significantly reduces tailpipe emissions, visible smoke, noxious fumes and odors [11].

Biodiesel is obtained during a reaction between triacylglycerols in vegetable oils or fat and a monohydric alcohol such as methanol (transesterification) in the presence of basic catalyst (NaOH or KOH) to give the corresponding mono-alkyl esters. After the reaction, free glycerol and the residual catalyst are removed during the water washing process. Principally, methanol is used as the efficient and cheapest alcohol for transesterification. The same reaction using ethanol is more complicated, because water-free alcohol and oil with low water content are required in order to obtain glycerol separation. On the other hand, ethanol derived from agricultural products, is renewable and biologically less objectionable in the environment [11, 55]. So far, all commercial biodiesel producers used alkali-catalyzed process for the transesterification but acid and enzyme catalysis has been also proposed lately [8, 46].

Although, the enzyme-catalyzed transesterification processes are not yet commercially developed many laboratory results have been reported. For example, S a l i s *et al.* [52] tested three different immobilized lipases from *Candida antarctica* B, *Rhizomucor miehei* and *Burkholderia cepacia* towards the reaction between triolein and short chain alcohols to produce oleic acid alkyl esters (biodiesel) in solvent free conditions. They observed that secondary alcohols usually are less reactive than primary alcohols, conversely, linear and branched primary alcohols with short alkyl chains C2-C4 showed high reaction and conversion rate. Moreover, the mixture of linear and branched short chain alcohols was successfully used for oleic acid ester synthesis. In other studies, D e n g *et al.* [12] used immobilized lipase from *Candida* sp. 99–125 for the production of biodiesel through enzymatic reaction be-

tween long-chain fatty acids and methanol in a solvent system. Biofuel was also produced from two Nigerian lauric oils: palm kernel oil and coconut oils by transesterification with different alcohols using PS30 lipase as a catalyst. In the conversion of palm kernel oil to alkyl esters, ethanol gave the highest conversion of 72%, whereas methanol only 15%. With coconut oil, 1-butanol and *iso*-butanol achieved the highest conversion of 40% while only traces of methyl esters were observed using methanol [2].

Environmental benefits of using biodiesel in comparison to petroleum based fuels are significant. Biodiesel reduces emission of carbon monoxide by approximately 50% and carbon dioxide by 78.5% on a net basis. It contains less aromatic hydrocarbons than common fuels, eliminates sulfur emissions and reduces by as much as 65% the emission of particulates (small particles of solid combustion products). Biodiesel causes more NO<sub>x</sub> emissions than petrodiesel but these contaminants can be reduced through the use of catalytic converters. Moreover, it has a higher cetane rating than petrodiesel and therefore ignites more rapidly when injected into the engine. The limitations include the relatively high production cost, moderate reaction yields, difficulties found during purification of the unreacted substrates and inaccessibility of feedstocks [53].

### 3.5. *In vitro* synthesis of biodegradable polyesters

Various and relatively easily adjustable properties of plastics make them ideal material for a variety of products and applications. However, significant amount of nonbiodegradable polymers used for packaging, sanitary and agricultural uses causes serious problem of plastic waste accumulation. One way to solve the problem of waste management is by replacing bio-resistant synthetic polymers with biodegradable ones. Presently polyesters constitute the most attractive class of artificial polymers which, after use, can be degraded under environmental conditions [16].

It is known that the ability of various types of hydrolases to degrade polyesters accompany their ability to synthesize polyesters, because enzymes, like other catalysts, affect rates of reversible reactions in both directions. To displace the equilibrium in favor of synthesis rather than hydrolysis, these reactions are performed in non-aqueous or micro aqueous media. Moreover, the lack of sensitive cofactors, which have to be recycled, makes hydrolases such as lipases particularly attractive for organic synthesis. New strategy for enzymatic *in vitro* synthesis of polyesters *via* non-metabolic pathways also offers a great opportunity for using non-petrochemical renewable resources as starting substrates of functional polymeric materials and

thus contributes to global sustainability without depletion of scarce resources [31].

Taking into consideration catalytic specificity of lipases, polyester synthesis could proceed *via* various polymerization modes so called ring-opening polymerization (ROP) of lactones or lactides, polycondensation of dicarboxylic acids with glycols or polycondensation of oxyacids and their esters [30].

Ring-opening polymerization is an addition polymerization in which an end of growing polymer chain can react with additional cyclic monomers to propagate the chain. Because catalytic site of lipase is a serine residue the first step is the cleavage of the lactone ring to give an acyl-enzyme intermediate. Then nucleophilic attack of water, included partly in the enzyme, onto the acyl carbon of the intermediate produce  $\omega$ -hydroxycarboxylic acid. In the propagation stage, the intermediate is nucleophilically attacked by the terminal hydroxyl group of a propagating polymer. The polymerization of lactones is carried out mostly in bulk or in solution. The type of organic solvent seemed to be an important factor affecting polyester synthesis [30].

Among the most widely used lactones or lactides in ROP are 4 to 17-membered lactones such as  $\beta$ -propiolactones polymerized by *Pseudomonas* family lipases and *Candida cylindracea* lipase [39, 43],  $\delta$ -valerolactone and  $\epsilon$ -caprolactone polymerized by commercially available lipases originated from *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* and porcine pancreas lipase [29, 44] as well as 12–17 membered macrolides, for which polymerization reaction proceeded even in aqueous medium [30].

High molecular weight poly( $\epsilon$ -caprolactone) is a commercially available biodegradable plastic. Caprolactone was the first monomer which was reported to be subject to lipase catalyzed ring-opening polymerization. In the case of crude industrial lipases such as porcine pancreas lipase, *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* lipase, often more than 40 wt.% of the enzymes was required for the efficient production of the poly( $\epsilon$ -caprolactone), when less than 1 wt.% of *Candida antarctica* lipase was enough to induce the polymerization. Furthermore, the catalytic activity remained unchanged over five cycles indicating the possibility of reusing this enzyme for the polymerization. Additionally, the linear polymer was obtained when polymerization proceeded in bulk, whereas the main product obtained in organic solvents, among which toluene was the most appropriate, had cyclic structure [10].

Polycondensation is a reaction leading to the propagation of the polymer chain by a repeated condensation process proceeding with simultaneous releasing of simple molecules. The chemical catalytic processes normally require high temperature that makes the incorporation of thermally unstable moieties into the

products impossible. Also the preparation of linear polymers when using monomers having multiple functional groups could be problematic if the protection-deprotection protocols were applied. Owing to the enzymes, it is possible to overcome some or all of these difficulties due to some unique features of lipases like enantio-, chemo-, and regioselectivity [34].

The scale-up experiment on polymer synthesis with *Candida antarctica* lipase revealed that it is possible to obtain polyester from adipic acid and 1,6-hexanediol in more than 200 kg yield. Moreover, this solvent-free system displayed potential as an environmentally clean process owing to mild conditions and no use of organic solvents and toxic catalysts [30].

Limiting factors for a broader use of synthetic aliphatic polyesters derived from diols and diacids are their poor mechanical properties and low melting temperature. It has been proven that the incorporation of rigid aromatic structures into aliphatic copolyesters was helpful for the synthesis of polymers with improved mechanical and thermal properties. In this process there were many critical factors affecting molar mass of growing polyester such as relative position of the two functional groups on a benzene ring, the type of diol and reduced pressure. Additionally, Linko *et al.* [37] demonstrated the inability of commercially available crude lipase of *Rhizomucor miehei* to propagate polyester chain when terephthalic acid (1,4-benzene dicarboxylic acid) instead of isophthalic acid (1,3-benzene dicarboxylic acid) was used as substrate. In this case, only immobilized Novozyme-435 lipase (*Candida antarctica* lipase) was found to be an efficient biocatalyst. Also the influence of different factors on various multi-component copolyesters synthesis using Novozyme-435 lipase was investigated [19]. The results indicated that the flexibility in the methodology permits the enzymatic introduction of various functionalities in the polymeric system for any specific application for example in plant therapy for controlled delivery of pesticides or insecticides in agriculture.

As mentioned above, the important feature of enzyme catalysis is its reversible nature depending on reaction conditions. Studies conducted with aliphatic polyesters subjected to hydrolytic degradation by various lipases have shown that, under certain conditions, previously synthesized polymer could be decomposed to give oligomers with fixed molecular weight. Contrary to enzymatic degradation, acid-catalyzed degradation leads to random bond cleavage of polymer. Moreover, after removal of the solvent, mixture of the oligomers could be easily polymerized again in the presence of the same lipase. These data indicate that the lipase-dependent polymerization and degradation processes could be controlled by the presence or absence of the solvent, providing a new methodology of plastics recycling [30].

### 3.6. Wastewater treatment

Domestic and restaurant wastewaters as well as wastewater from dairies are rich in biodegradable organic molecules and usually contain high levels of lipids and proteins. Excessive amount of oil and grease can form oil films on water surfaces preventing the diffusion of oxygen from air into water causing problems in the aeration system and leading to the development of undesirable filamentous microorganisms as *Thiothrix*, *Beggiatoa* and *Nocardia*. Aggregates formed by oil and other particles present in wastewater can cause blockage of water drainage lines. Moreover, these substances reduce the cell-aqueous phase transport rate through the formation of a lipid coat around biological flocks. They also hinder flocculation and sedimentation, the reason of microbial biomass decrease. To overcome these difficulties it is necessary to reduce the concentration of fat and oils or to eliminate these materials from wastewaters. Commonly used mechanical and physicochemical methods of oil and grease removal are expensive and low efficient while the addition of microbial lipases to lipid-rich wastewater before its released into the environment may significantly accelerate the biodegradation processes in wastewaters [7, 13].

Reports on the production of lipases by microorganisms and their potential future application for wastewater treatment have been published. Among many described fungal strains producing the hydrolytic enzymes, *Penicillium restrictum* is the most promising. It was identified as a not only lipase but also glucoamylase and protease producer both in submerged and solid state fermentation. Lipase activity of this strain depended on C/N ratio and the highest (30.3 U/g initial dry weight) was observed after 24 h of culturing in the presence of 2% olive oil [18]. From bacterial lipolytic enzymes particularly useful is lipase of *Pseudomonas aeruginosa* LP602. This enzyme added to lipid-rich restaurant wastewater reduced the lipid concentration to less than 10 mg/ml and the lipid fraction was degraded by 70% during the first 24 h [13]. The studies on biodegradation of lipid-rich wastewater were also conducted using mixed bacterial consortium composed of lipase producing strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus* LP009LP602, and protease and amylase producer *Bacillus* sp. B304. The mixed culture was very effective in lipid degradation. Within 12 days under aerobic conditions, lipid content was reduced from 20,000 mg/l to less than 20 mg/l [40].

### 4. Summary

Microbial lipases are currently attracting attention because of their application in environmental protection. Factors posing limitations include relatively high



cost of lipases production and lack of individual enzymes with the catalytic specificities and properties required in a wide variety of processes. The decreasing cost of their mass production, persistent screening for new microorganisms and characterization of their lipolytic enzymes will open new ways to solve many urgent environmental problems.

## Literature

- Abdel-Fattah Y.: Optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1217–1222 (2002)
- Abigor R.D., Uadia P.O., Foglia T.A., Haas M.J., Jones K.C., Okpefa E., Obibuzor J.U., Bafor M.E.: Lipase-catalysed production of biodiesel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 979–981 (2000)
- Antczak T., Graczyk J.: Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne. *Biotechnologia*, **2**, 130–145 (2002)
- Benjamin S., Pandey A.: Isolation and characterization of three distinct forms of lipase from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **44**, 213–221 (2001)
- Bornscheuer U.T., Bessler C., Srinivas R., Krishna S.H.: Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* **20**, 433–436 (2002)
- Burnes T.A., Blanchette R.A., Farrell R.L.: Bacterial biodegradation of extractives and patterns of bordered pit membrane attack in pine wood. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5201–5205 (2000)
- Cammarota M.C., Freire D.M.G.: A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresour. Technol.* **97**, 2195–2210 (2006)
- Canakci M., van Gerpen J.H.: Biodiesel production and catalysis. *Trans. ASAE*, **42**, 1203–1210 (1999)
- Chen S., Lin Y., Zhang Y., Wang X.H., Yang J.L.: Enzymatic pitch control at Nanping paper mill. *Tappi J.* **84**, 44–47 (2001)
- Córdova A., Iversen T., Hult K., Martinelle M.: Lipase-catalysed formation of macrocycles by ring-opening polymerisation of  $\epsilon$ -caprolactone. *Polymer*, **39**, 6519–6524 (1998)
- Demirbas A.: Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Conv. Manag.* **44**, 2093–2109 (2003)
- Deng L., Nie K., Wang F., Tan T.: Studies on production of biodiesel by esterification on fatty acids by a lipase preparation from *Candida* sp. 99–125. *Chinese J. Chem. Eng.* **13**, 529–534 (2005)
- Dharmstithi S., Kuhasuntisuk B.: Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 75–80 (1998)
- El Khattabi M., Van Gelder P., Bitter W., Tommassen J.: Role of the lipase specific foldase of *Burkholderia glumae* as a stearic chaperone. *J. Biol. Chem.* **275**, 26885–26891 (2000)
- Fischer K., Messner K.: Reducing troublesome pitch in pulp mills by lipolytic enzymes. *Tappi J.* **75**, 130–134 (1992)
- Flieger M., Kantorová M., Prell A., Øezanka T., Votruba J.: Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiol.* **48**, 27–44 (2003)
- Flipsen J.A.C., Appel A.C.M., Van Der Hijden H.T.W.M., Verrips C.T.: Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 274–280 (1998)
- Gombert A.K., Pinto A.L., Castilho L.R., Freire D.M.G.: Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem.* **35**, 85–90 (1999)
- Gross R.A., Kalra B., Kumar A.: Polyester and polycarbonate synthesis by *in vitro* enzyme catalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 655–660 (2001)
- Gutierrez A., Martinez M.J., Del Rio J., Romero J., Canaval J., Lenon G., Martinez A.T.: Fungal pretreatment of *Eucalyptus* wood can strongly decrease the amount of lipophilic extractives during chlorine free kraft pulping. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 3705–3709 (2000)
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A.: Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 235–251 (2006)
- Hemachander C., Puvanakrishnan R.: Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process Biochem.* **35**, 809–814 (2000)
- Hiol A., Jonzo M.D., Druet D., Comeau L.: Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **25**, 80–87 (1999)
- Jaeger K-E., Eggert T.: Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 390–397 (2002)
- Joseph B., Ramteke P.W., Thomas G., Shrivastava N.: Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2**, 39–48 (2007)
- Kakugawa K., Shobayashi M., Suzuki O., Miyakawa T.: Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 978–985 (2002)
- Kamini N.R., Hemachander C., Mala J.G.S., Puvanakrishnan R.: Microbial enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. *Curr. Sci.* **76**, 101–107 (1999)
- Kirk T.K., Jeffries W.: Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. (w:) Enzymes for pulp and paper processing., red. Jeffries T.W., Wiikari L., Oxford University Press US, Washington DC, 1996
- Kobayashi S., Takeya K., Suda S., Uyama H.: Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of medium-size lactones to polyesters. *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 1729–1736 (1998)
- Kobayashi S., Uyama H.: *In vitro* polyester synthesis via enzymatic polymerization. *Curr. Org. Chem.* **6**, 209–222 (2002)
- Kobayashi S., Uyama H.: Enzymatic polymerization to polyesters. (w) Polyester I – Biological systems and biotechnological production, red. Doi Y., Steinbüchel A., Wiley-VCH, Weinheim, 2002, t. 3a Biopolymers
- Kojima Y., Yokoe M., Mase T.: Purification and characterization of alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1564–1568 (1994)
- Kokkonen P., Korpela A., Sundberg A., Holmbom B.: Effects of different types of lipophilic extractives on paper properties. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* **17**, 382–386 (2002)
- Kumar R., Tyagi R., Parmar V.S., Samuelson L.A., Kumar J., Watterson A.C.: Enzymatic synthesis of multi-component copolymers and their structural characterization. *Mol. Divers.* **6**, 287–295 (2003)
- Lee K-W., Bae H-A., Shin G-S., Lee Y-H.: Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from

- Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (*S*)-ketoprofen ethyl ester. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 443–448 (2006)
36. Leone R., Breuil C.: Biodegradation of aspen steryl esters and waxes by two filamentous fungi with or without other carbon sources. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 723–727 (1999)
37. Linko Y.-Y., Lämsä M., Wu X., Uosukainen E., Seppälä J., Linko P.: Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol.* **66**, 41–50 (1998)
38. Ma F., Hanna M.A.: Biodiesel production: a review. *Biores. Technol.* **70**, 1–15 (1999)
39. Matsumura S., Beppu H., Tsukada K., Toshima K.: Lipase-catalyzed ring opening polymerization of lactide. *Biotechnol. Lett.* **18**, 1041–1046 (1996)
40. Mongkolthanaruk W., Dharmstithi S.: Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *Int. Biodeter. Biodegr.* **50**, 101–105 (2002)
41. Mroziak A., Hupert-Kocurek K., Łabużek S.: Lipazy bakterii rodzajów *Pseudomonas* i *Burkholderia* oraz ich wykorzystanie w biotechnologii. *Post. Mikrob.* **45**, 19–26 (2006)
42. Muthukumaran N., Dhar S.C.: Comparative studies on the decreasing of skins using acid lipase and solvent with reference to the quality of finished leathers. *Leather Sci.* **29**, 417–424 (1982)
43. Namekawa S., Uyama H., Kobayashi S.: Lipase-catalyzed ring-opening polymerization and copolymerization of  $\beta$ -propiolactone. *J. Polym.* **28**, 730–731 (1996)
44. Namekawa S., Suda S., Uyama H., Kobayashi S.: Lipase-catalyzed ring opening polymerization of lactones to polyesters and its mechanistic aspects. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**, 145–151 (1999)
45. Nawani N., Kaur J.: Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol. Cell Biochem.* **206**, 91–96 (2000)
46. Nelson L.A., Foglia T.A., Marmer W.N.: Lipase catalysed production of biodiesel. *JAOCs* **73**, 11911195 (1996)
47. Nini L., Sarda L., Comeau L-C., Boitard E., Dubes J-P., Chahinian H.: Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochem. Biophys. Acta*, **1534**, 34–44 (2001)
48. Rathi P., Saxena R.K., Gupta R.: A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Proc. Biochem.* **37**, 187–192 (2001)
49. Rosenau F., Jaeger K-E.: Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, **82**, 1023–1032 (2000)
50. Ruiz B., Farres A., Langley E., Masso F., Sanchez S.: Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. *Lipids* **36**, 283–289 (2001)
51. Rundlöf M., Htun M., Höglund H., Wägberg L.: Mechanical pulpfiner of poor quality – characteristics and influence of white water. *J. Pulp Pap. Sci.* **26**, 308–316 (2000)
52. Salis A., Pinna M., Monduzzi M., Solinas V.: Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.* **119**, 291–299 (2005)
53. Saxena R.K., Ghosh P.K., Gupta R., Davidson W.S., Bradoo S., Gulati R.: Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Curr. Sci.* **77**, 101–115 (1999)
54. Schmidt-Dannert C.: Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2123–2130 (1999)
55. Schuchardt U., Sercheli R., Vargas R.M.: Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* **9**, 199–210 (1998)
56. Sharma R., Chisti Y., Benerjee U.C.: Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**, 627–662 (2001)
57. Sinchaikul S., Sookkheo B., Phutrakul S., Pan F-M., Chen S-T.: Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization. *Protein Expr. Purif.* **22**, 388–398 (2001)
58. Suzuki T., Nakayama T., Kurihara T., Nishino T., Esaki N.: Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 144–148 (2001)
59. Svendsen A.: Sequence comparisons within the lipase family. (w) Lipases: their structure, biochemistry and applications., red. Woolley P., Petersen S.B., Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994, s. 1–21
60. Thanikaivelan P., Rao J.R., Nair B.U., Ramasami T.: Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends Biotechnol.* **22**, 181–188 (2004)
61. Turner P., Mamo G., Nordberg Karlsson E.: Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in bio-refining. *Microb. Cell Fact.* **6**, 9–32 (2007)
62. van Pouderooyen G., Eggert T., Jaeger K-J., Dijkstra B.W.: The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**, 215–226 (2001)
63. Verger R.: Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**, 32–38 (1997)
64. Whiteley C.G., Enongene G., Pletschke B.I., Rose P., Whittingtonjones K.: Co-digestion of primary sewage sludge and industrial wastewater under anaerobic sulphate reducing conditions: enzymatic profiles in a recycling sludge bed reactor. *Water Sci. Technol.* **48**, 29–138 (2003)
65. Yan F., Yong-Goe J., Kazuhiko I., Hiroyasu I., Susumu A., Tohru Y., Hiroshi N., Shugui C., Ikuo M., Yoshitsugu K. Thermophilic phospholipase A2 in the cytosolic fraction from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *JAOCs* **77**, 1147–1152 (2000)

Agnieszka Bednarczyk, Elżbieta Grażyna Daczowska-Kozon\*

Katedra Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Akademia Rolnicza  
ul. P. Pawła V/3; 71-459 Szczecin; e-mail: kozon@tz.ar.szczecin.pl

Wpłynęło w listopadzie 2007 r.

1. Wstęp. 1.1. Charakterystyka grupy *Bacillus cereus*. 2. Chorobotwórczość *B. cereus*. 2.1. Inwazyjność *B. cereus*. 2.2. Toksyny *B. cereus* i mechanizm wywoływania objawów chorobowych. 2.2.1. Enterotoksyny. 2.2.2. Toksyna emetyczna. 2.2.3. Toksyny innych przedstawicieli grupy *B. cereus*. 2.2.4. Enzymy o charakterze toksyn. 2.3. Objawy chorobowe wywoływane przez *Bacillus cereus*. 2.4. Epidemiologia infekcji i zatruc pokarmowych na tle *B. cereus*. 3. Podsumowanie

#### Pathogenic features of bacteria from the *Bacillus cereus* group

**Abstract:** Increasing interest in *Bacillus cereus* group is connected with the growing number of confirmed foodborne disease cases noted worldwide caused by the group representatives. Sporeforming and ubiquitous in nature, they can easily contaminate food environment and food as such.

The *Bacillus cereus* group comprises 6 species, namely *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis* and *B. pseudomycooides*. However, high phenotypic and genetic resemblance makes differentiation between the species difficult.

Toxin production ability coded on plasmids makes it possible for the toxin genes to be lost within few generations. Still, close affinity between the species within the group makes gene transfer from one species to another possible.

1. Introduction. 1.1. The *Bacillus cereus* group characteristics. 2. Pathogenicity of the *B. cereus* group. 2.1. Invasiveness of *B. cereus*. 2.2. Toxins produced by the *B. cereus* group and the mechanism of provoking disease symptoms. 2.2.1. Enterotoxins. 2.2.2. Emetic toxin. 2.2.3. Toxins of other representatives of the *B. cereus* group. 2.2.4. Toxin-like enzymes. 2.3. Disease symptoms caused by *Bacillus cereus*. 2.4. Epidemiology of foodborne diseases caused by *B. cereus* group. 3. Summary

**Słowa kluczowe:** cereulid, enterotoksyny, grupa *Bacillus cereus*, infekcje pokarmowe

**Key words:** cereulide, enterotoxins, foodborne diseases, the *Bacillus cereus* group

## 1. Wstęp

Rodzaj *Bacillus* liczy aktualnie 215 gatunków [38] z czego sześć blisko ze sobą spokrewnionych, tj. *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis* [75] i *B. pseudomycooides* [90] tworzy wydzieloną grupę *Bacillus cereus* [59].

Z obecnością laseczek z grupy *B. cereus* w środowisku żywności, wiąże się określone zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Środkami spożywczymi najczęściej wskazywanymi jako nośnik *B. cereus*, w odnotowanych przypadkach zachorowań wywołanych tą bakterią, były produkty zbożowe, makarony, ryż, płatki [46, 76, 91, 104, 109]. Z przypadkami zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* łączono także mięso, mleko, sosy i desery [47, 73, 77, 92, 97]. Suszone produkty mleczne są często zanieczyszczone sporami *B. cereus*, a pokarmy zawierające zarówno składniki mleczne jak i zbożowe, takie jak pokarmy dla niemowląt, niosą większe ryzyko zatrucia tymi bakteriami [20].

### 1.1. Charakterystyka grupy *Bacillus cereus*

Bakteriami z grupy *B. cereus*, podobnie jak i przedstawicielami rodzaju *Bacillus*, są Gram-dodatnie, ruchliwe, tlenowe lub względnie beztlenowe laseczki,

zdolne do wytwarzania form przetrwanych, naturalnie bytujące w ziemi. Z tego źródła, jako zanieczyszczenie pierwotne lub wtórne, trafiać mogą np. na surowce roślinne i zwierzęce, do środowiska produkcji żywności, na gotowe produkty, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego.

Spory bakterii z grupy *B. cereus* są ciepłooporne a ich decymalny czas redukcji w 100°C określono na 2,2–5,4 min. Formy wegetatywne niektórych przedstawicieli grupy mają zdolność wzrostu w 4–5°C [30, 35]. W określonych warunkach delikatna obróbka cieplna może stanowić bodziec aktywujący spory do kiełkowania, zwiększając ryzyko zatruc pokarmowych na tym tle [68].

Sześć gatunków zaliczanych obecnie do grupy *B. cereus* cechuje znaczne podobieństwo fenotypowe [59] i genotypowe. Zdaniem Carlson i wsp. [29] podobieństwo sekwencji 16S rRNA gatunków *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* i *B. mycoides* przekracza 99%. Różnice w sekwencji rybosomalnego RNA (16S rRNA) szczepów *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* i *B. thuringiensis* dotyczą jedynie 9 nukleotydów [15, 83, 84].

Podobieństwo fenotypowe i genotypowe *B. cereus*, *B. anthracis* i *B. thuringiensis*, jest przyczyną rozbieżności w opiniach bakteriologów co do ich pozycji

systematycznej. Na pytanie, czy są to odrębne gatunki (opcja aktualnie obowiązująca) czy tylko odmiany *B. cereus sensu lato* nie uzyskano, jak dotąd, jednoznacznej odpowiedzi [100].

Jednymi z lepiej poznanych gatunków grupy *Bacillus* są *B. anthracis* i *B. thuringiensis*. Różnią się zjadliwością, rodzajem produkowanych toksyn i docelowym organizmem.

*B. anthracis* (laseczka wąglika) jest czynnikiem sprawczym śmiertelnej w skutkach choroby zwanej wąglikiem. Poza przeżuwaczami – pierwszymi zwierzętami u których rozpoznano tą chorobę – podobna wrażliwość na *B. anthracis* charakteryzuje wszystkie ssaki [100]. U ludzi *B. anthracis* wywołują może skórną odmianę wąglika (bolesna zmiana na skórze z czarnym środkiem) albo poważną infekcję płuc. Skutkiem wdychania spor *B. anthracis* są, początkowo, objawy przypominające grype, prowadzące do poważnej infekcji płuc która, nie leczona, kończy się zwykle śmiercią.

Cechy odpowiedzialne za zjadliwość szczepów *B. anthracis* są kodowane plazmidowo. Wirulentne szczepy *B. anthracis* są nośnikami 2 dużych plazmidów pXO1(181 kb) i pXO2 (96 kb), w których zakodowana jest informacja dotycząca zdolności do produkcji dwóch toksyn oraz otoczki zbudowanej z kwasu poli- $\gamma$ -D-glutaminowego [26, 100]. Egzotoksyny *B. anthracis* zbudowane są z 3 białek: antygeny ochronnego (PA = *protective antygen*), czynnika letalnego LF = *lethal factor*) oraz czynnika obrzęku (EF = *edema factor*). Toksyna letalna (PA + LF) prowadzi do wstrząsu anafilaktycznego, prowadzącego do śmierci chorych w wyniku ogólnoustrojowej odmiany wąglika [108].

Toksyna obrzęku (PA + EF), wprowadzona podskórnie, powoduje obrzęk.

*B. thuringiensis* różni od *B. cereus*, towarzyszące sporulacji, wytwarzanie kryształów protoksyny (kryształiczne białko Cry) – prekursora  $\delta$ -endotoksyn o działaniu owadobójczym. Spory *B. thuringiensis* to znany biopestycyd. Przez długi czas *B. thuringiensis* uważany był wyłącznie za patogena owadów. Działanie owadobójcze potwierdzone zostało w przypadku 82 serotypów *B. thuringiensis*. Skuteczność bójcza dotyczy głównie owadów z rzędu *Lepidoptera*, *Diptera* i *Koleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Orthoptera* i *Mallophaga* [70, 100]. Niektóre szczepy *B. thuringiensis* okazały się także skuteczne w zwalczaniu komarów przenoszących malarię i żółtą febrę, nicieni, roztoczy i pierwotniaków [100].

Praktycznie identyczne geny 16S i 23SrRNA u *B. thuringiensis* i *B. cereus* umożliwiają różnicowanie obu gatunków na podstawie identyfikacji genów kodujących  $\delta$ -endotoksyny [15, 16, 84, 85].

Rizoidalne kolonie na podłożach agarowych to cecha odróżniająca *Bacillus mycooides* od innych przedstawicieli grupy.

*Bacillus weihenstephanensis* jest bakterią psychrotolerancyjną zdolną do wzrostu w temp.  $<7^{\circ}\text{C}$ . Bakteria ta dominowała w pasteryzowanym mleku przechowywanym w  $7^{\circ}\text{C}$ . Nieliczne szczepy produkowały znaczne ilości toksyny NheA, wskazywanej jako jeden z głównych czynników toksyczności *B. cereus* [118]. Za podstawę do wydzielenia *B. weihenstephanensis* z grupy *B. cereus* uznano różnice w sekwencjach 16S rRNA, 23S rRNA, regionu pomiędzy 16S rRNA i 23S rRNA, oraz obecność genów kodujących białka szoku

Tabela I

Cechy różnicujące w grupie *B. cereus*

Cecha	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. anthracis</i>
Morfologia kolonii	Białe	Białe / szare	Rizoidalne	Białe
Hemoliza	+	+	(+)	-
Ruchliwość	+	+	-	-
Oporność na penicylinę	-	-	-	+
Inkluzje kryształowe	-	+	-	-
Barwienie Gramem	+(a)	+	+	+
Katalaza	+	+	+	+
Ruchliwość	+/- (b)	+/-	-(c)	-
Redukcja azotanów	+	+/-	+	+
Rozkład tyrozyny	+	+	+/-	-(d)
Odporność na lizozym	+	+	+	+
Reakcja egg-yolk	+	+	+	+
Beztlenowy rozkład glukozy	+	+	+	+
Reakcja VP	+	+	+	+

a – 90 – 100% szczepów daje reakcję dodatnią

b – 50% szczepów daje reakcję dodatnią

c – 90 – 100% szczepów daje reakcję ujemną

d – większość szczepów daje reakcję ujemną

zimna (homolog *cspA*). *B. weihenstephanensis* może wzrastać w temp. +4 do +7°C, lecz nie rośnie w +43°C – temp. typowej dla *B. cereus* [75]. Określenie czy szczep należy do *B. weihenstephanensis* nie zawsze jest możliwe wg Lechner i wsp. [75], raz z uwagi na obecność zimnolubnych szczepów *B. cereus* a dwa zdolność wytwarzania toksyn identycznych z typowymi dla *B. cereus* [117].

*B. pseudomycooides* jest bakterią wyróżniającą się odmienną budową kwasów tłuszczowych od pozostałych przedstawicieli grupy *B. cereus* [117].

W tabeli I zestawiono cechy pozwalające na wstępne różnicowanie gatunków w grupie *B. cereus*. Ze względu na brak kompletnych danych uwzględniono cztery z sześciu gatunków należących do tej grupy.

Spokrewnione ze sobą bakterie grupy *B. cereus* różnią się w dużej mierze nie tyle DNA chromosomowym, co DNA episomalnym. Kodowane plazmidowo czynniki wirulencji *B. anthracis* czy produkcja  $\delta$ -endotoksyn u *B. thuringiensis*, mogą być utracone lub też przekazywane innym szczepom *B. cereus* podczas np. koniugacji [65, 86, 120].

## 2. Chorobotwórczość *B. cereus*

Chorobotwórczość bakterii grupy *B. cereus* jest determinowana produkcją toksyn i enzymów o charakterze toksyn. Główne z nich to cztery typy hemolizyn, trzy typy fosfolipazy C, toksyna emetyczna i dwa kompleksy enterotoksyn [50, 71, 79, 113].

Aktywność hemolityczna, cytotoksyczna i martwicząca, wzrost przepuszczalności naczyń i sekrecji płynów do światła jelita cienkiego łączone są z działalnością enterotoksyn *B. cereus* [2, 22, 78]. Inwazyjność *B. cereus* wiązana jest z zewnętrznymi strukturami komórek tych bakterii, ich hydrofobowością lub hydrofilnością, oraz zdolnością do adhezji i namnażania się w organizmie człowieka.

### 2.1. Inwazyjność *B. cereus*

Poza błoną cytoplazmatyczną i ścianą komórkową u niektórych szczepów grupy *B. cereus* występuje ponadto krystaliczna białkowa, połączona ze strukturami ściany komórkowej, warstwa powierzchniowa, tzw. warstwa S [71]. Komórki wegetatywne wydzielają białka warstwy S w dużych ilościach i czasami odrywają się one od ściany komórkowej. Ruchliwe szczepy grupy *B. cereus* posiadają ułożone perytrichalnie rzęski, jednakże nie wszystkie szczepy wykazują zdolność poruszania się (*B. anthracis*).

W normalnych warunkach *B. cereus* szybko wytwarza subterminalne endospory o wydłużonym kształcie i szczątkowej aktywności metabolicznej, odporne na eks-

tremalne warunki środowiskowe (ogrzewanie, zamrażanie, suszenie, promieniowanie). Poza rolę w rozprzestrzenianiu się *B. cereus* w środowisku, u niektórych szczepów spory stanowią dodatkowy czynnik wirulencji [71]. Hydrofobowa powierzchnia spory ułatwia im przytwierdzenie się do komórek nabłonkowych jelita [6] czy powierzchni roboczych stanowiąc, m.in. poważny problem w środowisku przetwórstwa żywności, np. w przemyśle mleczarskim. Szczepy z grupy *B. cereus* wytwarzają spory o wyjątkowych właściwościach adhezyjnych i silnej, także w porównaniu ze sporami innych *Bacillus* spp., hydrofobowości [6]. Przypuszcza się, że ma to związek z większą zjadliwością szczepów.

Szczepy charakteryzujące się dużą adhezyjnością, mimo dawki infekcyjnej nie przekraczającej  $5 \times 10^4$  spor (200 spor  $g^{-1}$  spożytego pokarmu) były powodem dłużej trwających i cięższych przypadków zachorowań wymagających hospitalizacji [6]. Przytwierdzone spory, kiełkując w środowisku jelita cienkiego, tworzą formy wegetatywne produkujące enterotoksynę bezpośrednio w miejscu docelowym. Hydrofobowość uważana jest za istotny czynnik warunkujący adhezję, jednak w niektórych przypadkach nie można przewidzieć zdolności adhezyjnych bakterii na podstawie własności hydrofobowych, gdyż zależą one również od takich czynników jak skład pożywki czy faza wzrostu [102].

Uważa się także, że białkowa warstwa S jest ważnym determinantem hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych. W zależności od gatunku bakterie posiadające warstwę S są albo hydrofobowe albo hydrofilne. W przypadku niektórych szczepów *B. cereus* opisanych przez Kotiranta i wsp. [71], warstwa S zwiększała ich hydrofobowość, co powodowało lepszą adhezję komórek do kolagenu typu I, lamininy, fibronektyny i fibrynogenu w porównaniu z komórkami nie posiadającymi tej warstwy. Obecność warstwy S jest konieczna dla efektywnej adhezji komórek bakteryjnych do ludzkich białek strukturalnych. Prawdopodobnie warstwa S zwiększa także oporność komórek wegetatywnych na napromieniowanie [71].

### 2.2. Toksyny *B. cereus* i mechanizm wywoływania objawów chorobowych

*Bacillus cereus* jest zdolny do wytwarzania dwóch głównych typów toksyn odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe, tj. enterotoksyn i toksyny emetycznej (wymiotnej).

Poza wymienionymi wyżej bakterie z grupy *B. cereus* mogą produkować różne zewnątrzkomórkowe hemolizyny oraz uważane za potencjalny czynnik zjadliwości enzymy o charakterze toksyn, tj. fosfolipazy C, cereolizynę, sfingomielinazę, cereolizynę AB,

hemolizynę II, hemolizynę BL, hemolizynę III [17] czy hemolizynę podobną do cereolizyny [63].

Cereolizyna jest ciepłolabilną hemolizyną aktywowaną przez grupy tiolowe, wykazującą podobieństwo do streptolizyny O [52]. Jest inaktywowana przez cholesterol, domniemany receptor błonowy.

Także ciepłostabilna hemolizyna II (HlyII), niszczy komórki docelowe i wywołuje ich lizę poprzez działanie na ich błonę. Nie inaktywowana przez cholesterol jest rozpowszechniona wśród bakterii grupy *B. cereus*, w tym *B. thuringiensis* [27]. Należy do tzw. toksyn porotwórczych  $\beta$ -PFT (pore forming toxins), typowych dla bakterii Gram-dodatnich. Działa cytolityczne, jednak jej rola w wirulencji mikroorganizmu pozostaje sprawą otwartą [8]. Przykładem tej samej grupy toksyn jest hemolizyna III (Hly-III). Atakuje błonę erytrocytów w formie monomeru i dopiero wiele monomerów zgromadzonych na powierzchni erythrocyta warunkuje jego lizę. Jest to tzw. mechanizm wielouderzeniowy, typowy dla streptolizyny O i theta-toksyny *Clostridium perfringens* [17]. Inną toksyną należącą do tej samej grupy toksyn jest cytotoxyna K (CytK) [81].

Sfingomielinaza, białko o masie cząst. 34 kDa, przyczepia się do sfingomieliny erythrocytów. Sfingomielinaza, wg Granum i Nissen [50], jest częścią kompleksu wchodzącego w skład enterotoksyn *B. cereus*.

Fosfolipaza C uznawana jest za czynnik zjadliwości wielu bakterii. Sądzi się, że bierze udział w niszczeniu tkanki poprzez pobudzanie degranulacji ludzkich neutrofilii [123]. *B. cereus* produkuje trzy rodzaje fosfolipazy C, z których każda wykazuje inny mechanizm działania. Należą do nich hydrolaza fosfatydyloinozytolu, hydrolaza fosfatydylocholinu i hemolityczna sfingomielinaza [52]. Hydrolaza fosfatydyloinozytolu rozszczepia fosfatydyloinozytol i pochodne glikozydowe fosfatydyloinozytolu, które zakotwiczą wiele białek do powierzchni błony cytoplazmatycznej [60]. Hydrolaza fosfatydylocholinu hydrolizuje fosfatydylocholinę, fosfatydoloetanoloaminę i fosfatydyloserynę, podczas gdy sfingomielinaza wykazuje aktywność przeciwko sfingomielinie [52]. Wykazano, że fosfolipaza C *B. cereus* indukuje produkcję strukturalnej metaloproteinazy (MMP) w ludzkich komórkach nabłonkowych, szczególnie żelatynazy o masie cząsteczkowej 92 kDa [42] wspomagając proces leczenia poprzez degradację nabłonka zainfekowanych komórek.

### 2.2.1. Enterotoksyny *Bacillus cereus*

Biegunkowy typ zatrucia pokarmowego wywołany *B. cereus* może być spowodowany dwoma różnymi białkowymi enterotoksynami, tj. hemolizyną BL (HBL) [21] i niehemolityczną enterotoksyną (NHE) [78]. Obie enterotoksyny składają się z trzech komponentów

białkowych. Wegetatywne komórki *B. cereus* wytwarzają enterotoksyny w jelicie cienkim człowieka, w fazie wzrostu logarytmicznego bakterii. Optymalna temperatura dla produkcji enterotoksyn to 37°C [40]. Wyższa aktywność enterotoksyczna charakteryzuje szczepy zdolne do fermentacji laktozy – wykorzystujące ją jako źródło węgla [47].

Termostabilna trójskładnikowa enterotoksyna HBL składa się z trzech komponentów białkowych: B, L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub> [22–24]. o masie cząsteczkowej, odpowiednio, 37 kDa, 38 kDa i 46 kDa. Obecność wszystkich komponentów jest konieczna do wywołania objawów chorobowych [23]. Nie wszystkie szczepy są zdolne do produkcji trzech komponentów tej enterotoksyny [121]. Każda z części białkowych hemolizyny BL jest kodowana genomowo, a jednemu komponentowi odpowiada jedna sekwencja DNA. Wszystkie komponenty HBL ulegają transkrypcji z jednego operonu *hbl* [105] złożonego z *hblC* – kodującego białko L<sub>2</sub>, *hblD* – kodującego białko L<sub>1</sub>, *hblA* – kodującego białko B i *hblB* – kodującego białko B' (prawdopodobnie substytut białka B), podobnego w 73% do białka B [53]. Nie wszystkie szczepy posiadające operon *hbl* posiadają sekwencję *hblB*, szczególnie że operon *hbl* znajduje się w niestabilnej części chromosomu *B. cereus* [53].

Enterotoksyna HBL wykazuje działanie dermonekrotyczne, wpływa na przepuszczalność naczyń włosowatych i aktywuje jelitową cyklazę adenylanową, co powoduje sekrecję płynów w jelitach (biegunkę). Jeden z modeli opisujących działanie HBL sugeruje, że komponent B jest tym, który wiąże enterotoksynę do powierzchni komórki, zaś komponenty L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub> mają działanie lityczne [21]. Każdy komponent hemolizyny BL g. Beecher i Wong [24] łączy się z komórką niezależnie, a następnie tworzy kompleks atakujący błonę komórkową co prowadzi do lizy komórki.

Niehemolityczna toksyna NHE składa się z trzech komponentów białkowych różnych od tych typowych dla HBL. Tymi komponentami są NheA o masie cząst. 41 kDa, NheB o masie cząst. 39 kDa i prawdopodobnie NheC o masie cząst. 105 kDa [80]. Komponent NheA nie jest konieczny do wywoływania objawów chorobowych, a kombinacja dwóch z trzech komponentów toksyny ma działanie biologiczne. Najsilniejsze działanie wykazują jednak wszystkie trzy komponenty obecne jednocześnie [78]. Pierwotnie sądzono, że NheA regulowany jest przez *plcR* [53], jednakże późniejsze badania wykazały, że operon *nhe* u *B. cereus* zawiera trzy otwarte ramki odczytu *nheA*, *nheB* i *nheC*. Pierwsze dwie z nich kodują dwie części toksyny niehemolitycznej – NheA i NheB, funkcja *nheC* jest nieznana. *PlcR* jest natomiast regulatorem transkrypcji zarówno toksyny NHE jak i HBL u *B. cereus* jak i *B. thuringiensis* [54].

Badania nad interakcją między NHE i komórkami Vero pokazały, że komponent NheC może być białkiem łączącym się z komórką, a pozostałe dwa komponenty prawdopodobnie nie są w stanie same wiązać się z powierzchnią komórki [79]. Nadal nie jest jasne czy kompleksy HBL i NHE tylko niszczą błonę plazmatyczną komórki, czy też jakieś komponenty tych toksyn dostają się do cytozolu i wywołują lizę komórki [53]. Jednak wykazano już, że komponent o masie cząst. 105 kDa (NheC) wykazuje działalność kolagenazy i żelatynazy, co może stanowić czynnik zwiększający zjadliwość szczepu [80].

Cytotoksyna K (CytK) wyizolowana z przypadków zatrucia pokarmowego na tle *B. cereus*, była przyczyną zgonu trzech osób z rozpoznaniem martwiczego zapalenia żołądka [81]. CytK jest białkiem wykazującym toksyczność w stosunku do komórek Vero i posiadającym właściwości hemolityczne. Sekwencja DNA kodująca cytotoksynę K wykazuje duże podobieństwo do  $\beta$ -baryłkowych toksyn, w tym do  $\alpha$ -toksyny *Staphylococcus aureus* i  $\beta$ -toksyny typu C *Clostridium perfringens* [49, 81]. Wykryto dwa rodzaje cytotoksyny K, o budowie aminokwasowej podobnej w 89%. Pierwszą z nich, nazwaną CytK-1 charakteryzuje wyższa toksyczność w stosunku do komórek ssaków niż CytK-2 [39]. Dane źródłowe sugerują, że geny cytotoksyny K są bardzo rozpowszechnione wśród różnych szczepów należących do grupy *B. cereus* [56, 103 116].

Pierwotnie uważano, że jest jeszcze enterotoksyna T (BcET) [3], brak jednak potwierdzonego przypadku zatrucia pokarmowego wywołanego tą toksyną. Co więcej, enterotoksyna T (41 kDa), w odróżnieniu do innych toksyn *B. cereus*, nie posiada peptydu sygnałowego i z tego względu pozostaje w peryplazmie. Gen *bceT* jest szeroko rozpowszechniony wśród szczepów *B. cereus* [52], jednakże wg Ch o m a i G r a n u m [31] toksyna ta nie jest enterotoksyną, gdyż nie działa toksycznie na komórki nabłonka jelita i nie stymuluje cyklazy adenylowej do konwersji ATP do cAMP.

Podstawowymi testami diagnostycznymi używanymi przy wykrywaniu enterotoksyn są: BCET-RPLA (*Bacillus cereus* Enterotoxin Reverse Passive Agglutination Test), Tecra BDE-VIA (*Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immuno Assay), oraz techniki genetyczne (PCR, sondy molekularne).

### 2.2.2. Toksyna emetyczna

Toksyna emetyczna (wymiotna), zwana cereulidem, ma formę pierścienia zbudowanego z trzech powtórzeń czterech amino i/lub oksykwasów: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]<sub>3</sub>. Ta struktura pierścieniowa (dodekadepsipeptyd) posiada masę cząsteczkową równą 1,2 kDa i jest zbliżona do jonoforu potasowego walino-

mycyny [1]. Toksyna emetyczna produkowana jest podczas stacjonarnej fazy wzrostu *B. cereus* i wydzielana do środowiska wzrostowego.

Podobnie jak w przypadku innych antybiotyków peptydowych i biologicznie czynnych peptydów wydzielanych przez *B. cereus*, takich jak gramicydyna czy sulfactin, iturin, bitracyna, lichenizyna, polimyksyna i tyrocydina, cereulid jest produkowany przez system NRPS (non-ribosomal peptide synthetases) syntetaz peptydowych [64]. Ten ogromny kompleks enzymatyczny syntetaz peptydowych, występujący u wszystkich szczepów *B. cereus*, jest kodowany genomowo i wykazuje nieznaczne różnice w sekwencji nukleotydowej u szczepów emetycznych, w porównaniu do szczepów nie emetycznych. Toksyna emetyczna nie jest bezpośrednio kodowana genowo, ale system enzymów niezbędny do jej syntezy zakodowany jest w genomie szczepów emetycznych.

Toksyna emetyczna jest ciepło- i kwasoodporna i nie wykazuje działania antygenowego. Nie posiada punktu izoelektrycznego i jest stabilna w temperaturze 121°C przez 90 minut i w pH od 2 do 11, a także nie ulega proteolizie (oporna na działanie pepsyny i trypsyny) [4, 6, 107]. Stąd duże prawdopodobieństwo, że dostaje się do dolnych partii przewodu pokarmowego w formie toksycznej. Wykazuje działanie hamujące na ludzkie białe krwinki o działaniu cytotoksycznym (tzw. killer cells) i tym samym może wpływać na działanie układu immunologicznego. Wymioty są wynikiem połączenia toksyny emetycznej z receptorem 5-HT<sub>3</sub> i stymulacji dośrodkowego nerwu błędnego [2]. Cereulid jest także odpowiedzialny za hamowanie oksydacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach hepatytów wątrobowych, prowadzące do uszkodzenia wątroby [82, 107].

Toksyna emetyczna produkowana jest przez szczepy *B. cereus* należące głównie do serowaru H-1 (urzędowego), a także przez nieliczne szczepy należące do serowarów H-3, H-5 i H-12. Szczepy tzw. biegunkowe, nie produkujące cereulidu, to najczęściej przedstawiciele serotypów H-2, H-6, H-8, H-9 i H-10 [4, 87].

Szczepy emetyczne, wg Carlin i wsp. [28], nie wykazują wzrostu w temperaturach poniżej 10°C (co wyklucza szczepy *B. weihenstephanensis*), za to wszystkie są w stanie rosnąć w 48°C. Co więcej, spory szczepów emetycznych wykazywały wyższą oporność na działanie temperatury 90°C i kiełkowały wolniej w 7°C. Szczepy emetyczne, na ogół, odróżnia od szczepów wywołujących biegunkę, nieznaczna aktywność hemolityczna i brak zdolności do hydrolizy skrobi [97].

Jak wynika z badań Rajkovic [99] ilość produkowanej toksyny emetycznej zależy od szczepu *B. cereus*, składu środowiska wzrostowego, pH środowiska, temperatury i dostępu tlenu. W hodowlach wstrząsanych, w przeciwieństwie do hodowli statycznych,

toksyna emetyczna nie była wytwarzana. W hodowlach statycznych produkcja toksyny miała miejsce w 22°C i 30°C nie zaś w 12°C po 24 godz. Nie obserwowano produkcji cereulidu w pH 6.0 i dużo szybszą produkcję tej toksyny w pH 7.4 niż, w mniej korzystnym dla *B. cereus*, pH 6.4. Najwyższą zdolność produkcji toksyny emetycznej posiadały szczepy rosnące na podłożu TSA, przy czym wzrost kolonii i produkcja toksyny wykazywały wyraźną zależność od zawartości tlenu. Zawartość O<sub>2</sub> <1,6%, zdaniem Rajkovic i wsp. [99], hamuje produkcję toksyny emetycznej. Zdaniem innych autorów, cytowanych przez Rajkovic i wsp. [99], nie jest to tak oczywiste i wiąże się raczej z wyczuwaniem liczebności przez bakterie (QS).

Finlay i wsp. [41] za optymalną dla produkcja cereulidu przez *B. cereus* uznali temperaturę pomiędzy 15 a 30°C, dowodząc, że w temperaturze 37°C produkcja ta jest znikoma lub żadna. Na tej podstawie autorzy ci uznali możliwość produkcji cereulidu w organizmie człowieka za mało prawdopodobną, sugerując, że jedynym powodem wystąpienia objawów wymiotnych jest spożycie toksyny już obecnej w pokarmie.

Ilość toksyny emetycznej w żywności, która wywoływała wymioty, wahała się od 0.02 do 1,28 µg cereulidu g<sup>-1</sup> [4]. Ryż i produkty ryżowe są środowiskiem sprzyjającym wytwarzaniu cereulidu przez *B. cereus*. Jednocześnie typ emetyczny zatruć pokarmowych, głównie po spożyciu dań z udziałem ryżu, notowano najczęściej w Japonii [79, 91, 104].

Toksyna emetyczna działa jak jonofor transportujący jony K<sup>+</sup> do mitochondriów zgodnie z gradientem stężeń i gradientem elektrycznym. Mechanizm ten przypomina działanie walinomycyny. Działanie cereulidu unieczynnia mitochondria, które przestają przeprowadzać procesy oksydoredukcyjne, co objawia się np. zmianą ruchliwości plemników w obrazie mikroskopowym [99]. Stąd też do wykrywania obecności cereulidu stosuje się powszechnie testy na aktywność wakuolityczną, np. testy oparte na badaniu ruchliwości plemników (sperm based biosassay-boar spermatozan motility test), metody chromatograficzne (LC-ion-trap-MS, HPLC-MS), czy techniki genetyczne oparte głównie na PCR [36] w tym RT PCR [45].

Szczepy emetyczne *B. cereus* różnią od pozostałych niektóre cechy biochemiczne (brak amylazy, słaba aktywność hemolityczna), inne wymagania temperaturowe i niewielkie różnice w oporności cieplnej. Szczepy emetyczne wykazują nieznacznie wyższą oporność na ogrzewanie, lecz mniejszą aktywność w niskich temperaturach [28] stąd stanowią potencjalne zagrożenie w żywności podgrzewanej i przetrzymywanej w temperaturze pokojowej (restauracje, bary). żywność przechowywana chłodniczo nie powinna w przypadku tych szczepów stanowić zagrożenia zdrowotnego.

### 2.2.3. Toksyny innych przedstawicieli grupy *B. cereus*

W grupie *B. cereus* szczepy *B. cereus sensu stricto* są producentami biegunkowej enterotoksyny w około 50%. Analiza przeprowadzona przy użyciu odwrotnej biernej aglutynacji lateksowej (RPLA – reverse passive latex agglutination) wykazała także, że i *B. thuringiensis* i *B. mycoides* są zdolne do produkcji enterotoksyn [19]. Także w przypadku *B. weihenstephanensis* udowodniono obecność genów kodujących przynajmniej jeden z komponentów toksyn biegunkowych (HBL, NHE lub CytK) [116, 118]

Badania genomu przy użyciu PCR i testy na cytotoksyczność dowiodły, że geny kodujące kompleksy toksyn HBL i NHE są szeroko rozpowszechnione nie tylko u *B. cereus*, ale także u *B. thuringiensis* i *B. mycoides* [43, 58, 98, 101]. Fletcher i Logan [43] prowadząc badania nad cytotoksycznością enterotoksyny znaleźli jeden szczep *B. anthracis* wykazujący słabą działalność cytotoksyczną, zaś Mendelson i wsp. [86] wykryli u *B. anthracis* geny homologiczne do tych kodujących komponent NheA toksyny NHE *B. cereus*. Zdaniem autorów *B. anthracis* jest zdolny produkować białkowy komponent toksyny i że nie jest to równoznaczne ze zjadliwością szczepu producenta. Co ciekawsze, istnieje udokumentowany przypadek infekcji przypominającej węglika wziewnego z którego wyizolowano szczep *B. cereus* posiadający geny toksyny węglikowej [61].

Wykazano również, że szczepy *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. firmus* i *B. simplex* produkują ciepłooporne toksyny, które przypominają toksynę emetyczną *B. cereus* [119]. Częściowe oczyszczenie toksyn uzyskanych ze szczepów *B. megaterium*, *B. simplex* i *B. firmus* pokazało, że działanie tych toksyn jest podobne do cereulidu, tj. wykazuje aktywność wakuolityczną. Wszystkie nowe ciepłostale toksyny wykazywały dużą hydrofobowość, rozpuszczalność w metanolu, lecz żadna z nich nie była identyczna z cereulidem (brak reakcji ze specyficznymi primerami w PCR) [119]. Sugeruje to, że nie tylko *B. cereus* jest czynnikiem etiologicznym zatruć pokarmowych. Co więcej zwraca uwagę na potrzebę prawidłowej identyfikacji izolowanych szczepów.

*Bacillus thuringiensis* produkuje endotoksyny – białka Cry, które działają specyficznie na niektóre owady [112], a także niebiałkowe egzotoksyny owadobójcze, z których najbardziej znaną jest β-egzotoksyna I, stałocieplny i rozpuszczalny w wodzie związek o masie cząsteczkowej równej 701 Da, wydzielany przez około 50% szczepów *B. thuringiensis* [37]. Cry 1, wydzielana np. przez szczepy *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, jest toksyczna w stosunku do rodzaju *Lepidoptera* (ćmy i motyle), Cry 11, produkowana przez *B. thurin-*



*giensis* subsp. *israelensis*, jest toksyczna w stosunku do insektów z rodzaju *Diptera* (muchy i komary), a Cry 3, wydzielana przez *B. thuringiensis* sbsp. *tenebrionis*, wykazuje działanie przeciwko *Coleoptera* (żuki) [62]. Scharakteryzowano ponad 100  $\delta$ -endotoksyn, z których większość wykazuje aktywność insektobójczą. Inne toksyny wytwarzane przez *B. thuringiensis* stanowią białka cytolityczne (Cyt) i nie są one specyficzne przeciwko określonym owadom, lecz wykazują także działanie hemolityczne i cytolityczne w stosunku do komórek ssaczy [33]. Perchat i wsp. [95] stwierdzili, że *B. cereus* także zdolny jest do wytwarzania niebiałkowych toksyn, obok cereulidu, różnych od  $\beta$ -egzotoksyny I. Niektóre szczepy *B. cereus* produkują także białkowe toksyny owadobójcze nazwane Vip [122].

Niebezpieczeństwo stanowi intensywne spryskiwanie roślin uprawnych i warzyw działającymi owadobójczo preparatami *B. thuringiensis*. W skład tych preparatów wchodzi mieszanina endospor i kryształów białkowych toksyn, a produkty zawierające *B. thuringiensis* stanowią 90% preparatów owadobójczych dostępnych na rynku [57]. W związku z możliwą obecnością *B. thuringiensis* na surowcach roślinnych [32, 102, 104], ważne jest by taką żywność przechowywać w sposób zapobiegający kiełkowaniu spor i wzrostowi tych bakterii.

Najbardziej patogennym dla ludzi przedstawicielem grupy *B. cereus* jest laseczka węglikowa – *Bacillus anthracis*. Letalność tej bakterii związana jest z dwoma czynnikami zjadliwości – polisacharydową otoczką, która przeciwdziała fagocytozie, oraz wydzielaniem toksyny węglkowej, która jest cytotoksyczna głównie w stosunku do makrofagów. Na toksynę węglkową składają się trzy białka – antygen ochronny (PA – protective antigen), czynnik obrzęku (EF – endema factor) i czynnik letalny (LF – lethal factor). Białka te funkcjonują razem doprowadzając do apoptozy zainfekowanej komórki. Dwa zjadliwe enzymy – EF i LF, zależą od antygeny ochronnego (PA), który przenosi je do wnętrza komórki. Każde z tych białek samo w sobie nie jest toksyczne dla komórek, a kombinacja wszystkich trzech prowadzi do śmiertelnych objawów węglikowa. Synergistyczne działanie trzech białek prowadzi do zniszczenia komunikacji komórkowej i pozwala bakterii na uniknięcie działania systemu obronnego gospodarza.

Czynnik obrzęku (EF) inaktywuje neutrofile, co zapobiega fagocytozie bakterii, nadaje komórce właściwości cyklazy adenylanowej, prowadzi do zwiększenia w niej cAMP co skutkuje rozregulowaniem procesów wewnątrzkomórkowych (zaburzenie transportu jonów w szczególności), wydzielaniem na zewnątrz komórki elektrolitów i utrata wody.

Czynnik LF także posiada aktywność enzymatyczną i blokuje w komórce szlak transdukcji sygnałów konieczny do prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Obok aktywacji makrofagów pobudza je do pro-

dukcji TNF- $\alpha$  i interleukiny 1- $\beta$ , co powoduje reakcję zapalną i szok septyczny. Atakuje również komórki śródbłonna, powodując wyciek naczyniowy i wstrząs hipowolemiczny spowodowany utratą krwi. Zjadliwość szczepu *B. anthracis* jest zależna od występowania otoczki zbudowanej z kwasu poli-D-glutaminowego, która jest wytwarzana w organizmie gospodarza, oraz od obecności toksyn. Do zakażenia może dojść drogą pokarmową, oddechową lub poprzez skórę, a źródłem zakażenia są głównie zwierzęta i ich odchody. Obecność toksyn węglkowych jest kodowana plazmidowo [55]. Zdolność bakterii do wytwarzania otoczki jest zdeterminowana genetycznie i jest kodowana na plazmidzie pX02. Do jej wytwarzania konieczna jest ekspresja trzech genów: *capB*, *capC* i *capA* kodujących enzymy związane z błoną komórkową bakterii. Ekspresja tych genów regulowana jest przez oddziaływanie białka kodowanego na plazmidzie pX02 z produktem genu *atxA* znajdującego się na drugim plazmidzie pX01. Plazmid ten determinuje syntezę toksyny. Jak widać synteza otoczki jest częściowo sprzężona z wytwarzaniem toksyn.

Udokumentowany przypadek izolacji szczepu *B. cereus* posiadającego toksynę węglkową, z przypadku infekcji przypominającej węglikowa wziewnego [61] może sugerować możliwość przenoszenia plazmidów między szczepami należącymi do grupy *B. cereus*.

#### 2.2.4. Enzymy

$\beta$ -laktamazy stanowią przyczynę oporności bakterii na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. U różnych szczepów *B. cereus* zauważono trzy różne formy  $\beta$ -laktamaz.  $\beta$ -laktamaza I należy do klasy A  $\beta$ -laktamaz i jest zewnątrzkomórkową penicylinazą posiadającą serynę w miejscu aktywnym.  $\beta$ -laktamaza II, należąca do klasy B  $\beta$ -laktamaz, jest aktywowana przez przyłączenie jonów Zn (II) i Co(II) [94].  $\beta$ -laktamaza III należy do klasy A lipoprotein błonowych. Szczepy *B. cereus* izolowane z różnych infekcji były zazwyczaj odporne na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, w tym cefalosporyny trzeciej generacji, ale były wrażliwe na chloramfenikol, klindamycynę, wankomycynę, ciprofloksacynę, erytromycynę, gentamycynę i streptomycynę [5, 33, 104, 115].

Niektóre szczepy *B. cereus* są producentami kolagenozy. Jej produkcja zależy od szczepu i podłoża i jest większa w warunkach beztlenowych niż tlenowych [72]. Kolagenaza degraduje rozpuszczalne i nierozpuszczalne formy kolagenu, żelatynę i bradykininę do małych peptydów.

Proteazy *B. cereus* pełnią prawdopodobnie rolę w infekcjach pozajelitowych. Neutralna proteaza uzyskana ze zjadliwego szczepu *B. cereus* posiadała zdolności hydrolizy hemoglobiny, albuminy i kazeiny [114]. Izolowano także inne proteazy, w tym rozkładające kazeinę i insulinę zawarte w błonie komórkowej [44].

### 2.3. Objawy chorobowe wywołane przez *Bacillus cereus*

*B. cereus* jest najlepiej poznanych patogenem grupy *B. cereus*. Pierwsze ognisko zatrucia pokarmowego na tym tle opisane zostało w 1906 r. przez Lubena [69]. Hospitalizowano ogółem 300 osób. Nośnikiem dużej liczby bakterii zidentyfikowanej wówczas jako *B. peptonificans* (później zaklasyfikowanej jako *B. cereus*) były pulpety mięsne. *B. cereus* odpowiada za dwa rodzaje zatruc pokarmowych objawiających się biegunką lub wymiotami. Możliwe jest też łączne wystąpienie obu typów objawów.

Tzw. typ biegunkowy zatrucia, spowodowany jest wprowadzeniem do organizmu, wraz z pokarmem, określonej liczby żywych komórek *B. cereus* (najczęściej spor). Dawka infekcyjna to  $10^3$ – $10^7$  cfu (colony forming units – jednostek tworzących kolonie). Charakteryzuje się zazwyczaj wodnistą biegunką oraz bólami brzucha (objawy przypominające zatrucie na tle *Clostridium perfringens*) pojawiającymi się po 8–16 godz. od spożycia zanieczyszczonej tymi bakteriami żywności. Objawy utrzymują się przeważnie od 12 do 24 godz. Do rzadkości należą przypadki biegunek na tym tle trwających kilka dni. Objawy są skutkiem działania enterotoksyny uwalnianej, przez zakotwiczone w jelicie cienkim gospodarza komórki *B. cereus*. Uwalniana przyżyciowo ciepłolabilna enterotoksyna, aktywuje jelitową cyklazę adenylanową powodując zwiększoną sekrecję płynów w jelicie gospodarza.

Produktami łączonymi najczęściej z przypadkami zakażeń pokarmowych na tym tle są głównie produkty mięsne, zupy, warzywne, puddingi (budynie) i sosy, mleko i produkty mleczne.

Typ wymiotny zatruc pokarmowych to efekt wprowadzenia do organizmu, wraz z pokarmem, wyprodukowanej w nim przez szczepy *B. cereus* toksyny emetycznej – cyklicznego peptydu zwanego cereulidem. Ten typ zatrucia pokarmowego charakteryzuje się nudnościami i wymiotami pojawiającymi się po 0,5–6 godz. od spożycia zanieczyszczonej cereulidem żywności [93] i utrzymującymi się przez 6–24 godz. Symptomy towarzyszące zatruciu na tym tle przypominają zatrucie enterotoksyną gronkowcową. Liczba komórek *B. cereus* zdolna wyprodukować ilość toksyny konieczną do wywołania objawów określana jest na  $10^5$  do  $10^8$  cfu  $\times$  g<sup>-1</sup>. Z uwagi na duże różnice w ilości enterotoksyny produkowanej przez różne szczepy *B. cereus*, nawet żywność zawierająca  $10^3$  cfu *B. cereus* g<sup>-1</sup> może okazać się niebezpieczna dla zdrowia konsumenta [53].

Produktami spożywczymi odpowiedzialnymi za ten typ zatrucia pokarmowego są najczęściej smażony i gotowany ryż, makaron, ciastka i kluski [1, 53].

Blisko spokrewniony z *B. cereus* *B. thuringiensis*, wg Jacson i wsp. [66], także jest w stanie wytwa-

rzać enterotoksyny i powodować zatrucia typu biegunkowego. Rosenquist i wsp. [103] wskazali na znaczącą liczebnie obecność *B. thuringiensis* głównie w gotowanych pokarmach skrobiowych oraz surowych warzywach. Zdaniem tych autorów szczepy *B. thuringiensis* mają co najmniej jeden komponent enterotoksyny (HBL lub NHE lub też obu), lecz nie są zdolne do wytwarzania toksyny emetycznej.

*B. cereus*, oprócz zatruc pokarmowych, może wywoływać i inne schorzenia, szczególnie u osób z obniżoną odpornością, starszych, niemowląt, alkoholików i narkomanów itp. Bakteriami na tym tle należą do rzadkości i są, w większości przypadków, krótkotrwałe i niegroźne.

*B. cereus* jest natomiast jednym z najważniejszych czynników wywołujących zakażenia oczu takie jak zapalenie rogówki, wewnętrzne zapalenie oka i zapalenie całej gałki ocznej. Drobniewski [33] wylicza 35 przypadków poważnych infekcji oka, a Pina i wsp. [96] opisują przypadek zapalenia rogówki spowodowany kontaktem oka z zanieczyszczonymi *B. cereus* szklami kontaktowymi.

Zakażenia przyranne i infekcje ran powypadkowych i pooperacyjnych są powiązane z produkcją przez *B. cereus* czynnika HBL, czynnika przenikalności naczyniowej martwiczego zapalenia skóry [67]. *B. cereus* jest też dość częstą przyczyną infekcji ran otwartych [34]. W literaturze opisane zostały pojedyncze przypadki perforacji jelit z infekcjami spowodowanymi *B. cereus* u wcześniaka [48], bakteriami z bakteryjnym zapaleniem wsierdzia spowodowana infekcją rany przez *B. cereus* [125], martwicza infekcja opon mózgowych wywołana *B. cereus* u pacjenta z leukemią [88], pooperacyjne zapalenie opon mózgowych u dwóch pacjentów wywołane zanieczyszczeniem szpitalnej pościeli [18], zapalenie opon mózgowych u pacjenta z przetoką komorową [25], trzy przypadki szoku septycznego i śpiączki u pacjentów z leukemią [89], nagłe uszkodzenie wątroby spowodowane emetycznym szczepem *B. cereus* [92], zapalenie płuc u pacjenta z upośledzoną odpornością [33], infekcje przewodu moczowego [110], czy wreszcie martwicze zapalenie żołądka u pacjenta z obniżoną odpornością [74].

### 2.4. Epidemiologia infekcji i zatruc pokarmowych na tle *B. cereus*

Według danych CDC (Centre for Disease Control and Prevention) *B. cereus* odpowiada za mniej niż 1% ogniskowych zatruc pokarmowych w USA [9] a liczba odnotowywanych przypadków, rocznie, waha się od 6 do 50. Jednak, zdaniem znawców problemu, faktyczna liczba przypadków zatruc pokarmowych na tym tle może być znacznie większa.

Porównanie skali tego zjawiska w różnych krajach jest utrudnione z uwagi na dobrowolny charakter takiej ewidencji. Dostępne dane dotyczące Europy (Tab. II) wskazują na przewagę 1–2 ognisk zachorowań spowodowanych infekcją *B. cereus* rocznie w większości porównywanych krajów w latach 1999–2000 [124]. Zdecydowanie więcej przypadków zachorowań na tym tle odnotowano w Holandii, Norwegii czy na Węgrzech. Na Węgrzech np. liczba przypadków w ognisku zachorowań na tle *B. cereus* w 2000 r. przekraczała 40. Dane źródłowe potwierdzały, że do zachorowań na tym tle dochodziło przeważnie w miejscach zbiorowego żywienia, takich jak. restauracje, stołówki, hotele, itp.

W Polsce, w latach 1998–2001, 37 do 313 przypadków bakteryjnych zatruc pokarmowych (średnio 88 rocznie) zaklasyfikowano jako spowodowane przez „inne bakterie, w tym *B. cereus* i *V. parahaemolyticus*”. W kolejnych latach (2002 i 2003) liczba zachorowań wywołanych przez „inne bakterie” dotyczyła, odpowiednio, 317 i 110 przypadków [106].

Nieliczne dostępne dane dotyczące *B. cereus* jako czynnika sprawczego zatruc pokarmowych (z wyłączeniem infekcji wirusowych) dowodzą, że bakterie te odpowiadały np. za 8.5% przypadków zachorowań w Holandii w 1991r. i 5% w Danii w latach 1990–1992 [106]. Dużo niższą zapadalność na tym tle notowano, np. w Anglii i Walii (0,7%), Japonii (0,8%), USA (1,3%) czy Kanadzie (2,2%) [53]. W Holandii, Anglii i Walii w latach 1993–2000 *B. cereus* był przyczyną ok. 2% łącznej liczby ognisk zatruc pokarmowych o znanej etiologii [124]. We Francji częstość zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* określa się na 4–5%, a w Stanach Zjednoczonych 1–2% ogółu odnotowanych [103].

Dane dotyczące liczby ognisk/przypadków zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* zgłoszonych w USA, Australii i Nowej Zelandii w latach 2001–2005, potwierdzają niewielką skalę tego zjawiska (Tab. III). Przy jednocyfrowej liczbie ognisk zachorowań na tym tle, liczba przypadków w ognisku, w badanym okresie, rzadko przekraczała 20. Jednocześnie z odnotowanych

Tabela II  
Liczba zgłoszonych zatruc pokarmowych na tle *Bacillus cereus* w latach 1998–2000 [124]

Kraj	1998		1999		2000	
	Ogniska	Przypadki	Ogniska	Przypadki	Ogniska	Przypadki
Anglia i Walia	0	0	1	–	0	0
Finlandia	3	29	1	5	2	12
Francja	7	–	2	–	13	–
Holandia	–	–	10	31*	14	165**
Islandia	1	2	2	10	0	0
Niemcy	–	–	2	16	2	26
Norwegia	5	–	7	145	7	104
Polska	–	–	0	0	1	36
Portugalia	–	3	1	7	1	6
Rosja	–	–	1	53	0	0
Słowenia	–	–	1	68	0	0
Szkocja	1	–	1	–	0	0
Szwecja	2	5	1	2	1	2
Węgry	5	177	4	139	2	88
Włochy	1	–	2	10	1	8

\* 1 przypadek choroby poza zgłoszonymi ogniskami

\*\* 3 przypadki choroby poza zgłoszonymi ogniskami choroby

– brak danych

Tabela III  
Liczba zgłoszonych zatruc pokarmowych na tle *Bacillus cereus* w latach 2001–2005 w Australii, Nowej Zelandii i USA [9, 11–13]

Kraj	2001		2002		2003		2004		2005		Źródło informacji
	O	P	O	P	O	P	O	P	O	P	
USA	5	61	7	42	2	50	6	103	3	37	[9]
Australia	–	–	1	37	–	–	1	6	–	–	[11–13]
Nowa Zelandia	6	21	4	16	6	25	0	1	5*	10*	

\* *Bacillus* spp.; – brak danych

przypadków zachorowań oprócz *B. cereus* izolowano innych przedstawicieli rodzaju *Bacillus* (Tab. III).

Typ zatruc pokarmowych na tle *B. cereus* różni się zależnie od kraju. W Japonii np. dominuje typ emetyczny, natomiast w Europie i USA są to najczęściej infekcje pokarmowe typu biegunkowego.

### 3. Podsumowanie

Wzrastające zainteresowanie grupą *Bacillus cereus* związane jest z coraz częstszym izolowaniem tych bakterii ze zdiagnozowanych przypadków zachorowań na tym tle.

Grupa *B. cereus* stanowią drobnoustroje wszędo- bylskie, sporotwórcze, a co za tym idzie, obecne w środowisku związanym z produkcją, przetwórstwem żywności i żywnością jako taką.

Grupę *B. cereus* reprezentuje aktualnie sześć gatunków: *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides*. Niewielkie różnice w fenotypie przedstawicieli grupy sprawiają, że rozróżnienie ich za pomocą klasycznych metod diagnostycznych nie jest możliwe. Co więcej, duże podobieństwo dotyczy także rodzaju toksyn produkowanych zarówno przez przedstawicieli grupy *B. cereus* jak i rodzaju *Bacillus* takich jak np. *B.licheniformis*, *B. megaterium*, *B. simplex* czy *B. firmus*.

To, że rodzaj i ilość wytwarzanych przez *B. cereus* toksyn zależy od warunków środowiskowych (temperatury, pH, dostępności tlenu, składników dostępnych w środowisku) oraz szczepu producenta sprawia, że produktem spożywczym zagrażającym zdrowiu konsumenta może być już produkt zawierający  $10^3$  komórek lub spor w 1 g.

Zdolność do produkcji niektórych toksyn kodowana plazmidowo, sprawia, że odpowiedzialne za taką zdolność geny mogą być utracone w ciągu kilku pokoleń (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*) lub przeniesione na inne blisko spokrewnione gatunki grupy *B. cereus*. Bliskie pokrewieństwo *B. cereus* do *B. anthracis* stwarza możliwość występowania szczepów *B. cereus* posiadających toksyny węgla. Bliskie pokrewieństwo *B. thuringiensis* i *B. cereus* niesie ze sobą realne ryzyko zatruc pokarmowych przez *B. thuringiensis*. Powszechnie stosowany jako preparat owadobójczy w hodowli roślin, *B. thuringiensis*, podobnie jak inni przedstawiciele grupy *B. cereus* był już izolowany z przypadków zatruc pokarmowych.

### Piśmiennictwo

1. Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 31–34 (1994)
2. Agata N., Ohta M., Arakawa Y., Mori M.: The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology*, **141**, 983–988 (1995)
3. Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M.: A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 17–20 (1995)
4. Agata N., Ohta M., Mori M.: Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* **33**, 67–69 (1996)
5. Alfaro D.V., Davis J., Kim S., Bia F., Bogard J.F., Briggs J.W., Liggett P.E.: Experimental *Bacillus cereus* posttraumatic endophthalmitis and treatment with ciprofloxacin. *Br. J. Ophthalmol.* **80**, 755–758 (1996)
6. Andersson A., Granum P.E., Rønner U.: The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 93–99 (1998)
7. Andersson M.A., Mikkola R., Helin J., Andersson M.C., Salkinoja-Salonen M.: A novel sensitive bioassay for the detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1338–1342 (1998)
8. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Yurkov I.S., Budarina Z.I., Sineva E.V., Solonin A.S.: Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expression Purification*, **47**, 186–193 (2006)
9. Anonim 1: [http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak\\_data.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm) (30 maja 2007)
10. Anonim 2: <http://www.hps.scot.nhs.uk/ewr/subjectsummary.aspx?subjectid=71> (30 maja 2007)
11. Anonim 3: [http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual\\_outbreak.php?we\\_objectID=127](http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_outbreak.php?we_objectID=127) (30 maja 2007)
12. Anonim 4: [http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual\\_surveillance.php](http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_surveillance.php) (30 maja 2007)
13. Anonim 5: [http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual\\_outbreak.php](http://www.surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_outbreak.php) (30 maja 2007)
14. Asano S.-I., Nukumizu Y., Bando H., Iizuka T., Yamamoto T.: Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1054–1057 (1997)
15. Ash C., Collins M.D.: Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**, 75–80 (1992)
16. Ash C., Farrow J.A.E., Dorsch M., Stackenbrandt E., Collins M.D.: Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 343–346 (1991)
17. Baida G.E., Kuzmin N.P.: Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. Rapid report. *Biochem. Biophys. Acta*, **1284**, 122–124 (1996)
18. Barrie D., Wilson J.A., Hoffman P.N., Kramer J.M.: *Bacillus cereus* meningitis in two neurosurgical patients: an investigation into the source of the organism. *J. Infect.* **25**, 291–297 (1992)
19. Beattie S.H., Williams H.G.: Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 221–225 (1999)
20. Becker H., Schaller G., Von Wiese W., Terpian G.: *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 1–15 (1994)
21. Beecher D.J., MacMillan J.D.: Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immunol.* **59**, 1778–1784 (1991)

22. Beecher D.J., Schoeni J.L.: Wong A.C.L., Enterotoxin activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immunol.* **63**, 4423–4428 (1995)
23. Beecher D.J., Wong A.C.L.: Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immunol.* **62**, 980–986 (1994)
24. Beecher D.J., Wong A.C.L.: Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* **272**, 233–239 (1997)
25. Berner R., Heinen F., Pelz K., Van Velthoven V., Sauer M., Korinthenberg R.: Ventricular shunt infection and meningitis due to *Bacillus cereus*. *Neuropediatrics*, **28**, 333–334 (1997)
26. Brossier F., Mock M.: Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*, **39**, 1747–1755 (2001)
27. Budarina Z. I., Sinev M.A., Mayorov S.G., Tomashevski A.Y., Shmelev I.V., Kuzmin N.P.: Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. *Arch. Microbiol.* **161**, 252–257 (1994)
28. Carlin F., Fricker M., Pielaat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salkinoja Salonen M., Svensson B., Nguyen-The C., Ehling-Schulz M.: Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* **109**, 132–138 (2006)
29. Carlson C.R., Johansen T., Kolsto A.B.: The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 163–167 (1996)
30. Choma C., Clavel T., Dominguez H., Razafindramboana N., Soumille H., Nguyen-The C., Schmitt P.: Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 73–77 (2000)
31. Choma C., Granum P.E.: The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 115–119 (2002)
32. Damgaard P.H., Hansen B.M., Pederson J.C., Ellenberg J.: Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 253–258 (1997)
33. Drobniewski F.A.: *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 324–338 (1993)
34. Dubouix A., Bonnet E., Alvarez M., Bensafi H., Archambaud M., Chaminade B., Chabanon G., Marty N.: *Bacillus cereus* infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *J. Infect.* **50**, 22–30 (2005)
35. Dufrenne J., Bijwaard M., te Giffel M., Beumer R., Notermans S.: Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **27**, 175–183 (1995)
36. Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S.: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 189–195 (2004)
37. Espinasse S., Gohar M., Chaufaux J., Buisson C., Perchat S., Sanchis V.: Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cryIB in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4182–4186 (2002)
38. Euzéby J. P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>. (2005)
39. Fagerlund A., Ween O., Lund T., Hardy S.P., Granum P.E.: Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, **150**, 2689–2697 (2004)
40. Fermanian C., Lapeyre C., Fremy J.M., Claisse M.: Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. *J. Food Microbiol.* **30**, 345–358 (1996)
41. Finlay W.J., Logan N.A., Sutherland A.D.: *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 385–389 (2000)
42. Firth J.D., Putnins E.E., Larjava H., Uitto V.J.: Bacterial phospholipase C upregulates matrix metalloproteinase expression by cultured epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**, 4931–4936 (1997)
43. Fletcher P., Logan N.A.: Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 394–400 (1999)
44. Fricke B., Buchmann T., Friebe S.: Unusual chromatographic behaviour and one-step purification of a novel membrane proteinase from *Bacillus cereus*. *J. Chromatogr. A.* **715**, 247–258 (1995)
45. Fricker M., Messelhäusser U., Busch U., Scherer S., Ehling-Schulz M.: Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1892–1898 (2007)
46. Giffel M.C., Beumer R.R., Granum P.E., Rombouts F.M.: Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 307–318 (1997)
47. Giffel M.C., Beumer R.R., Leijendekkers S., Rombouts F.M.: Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiol.* **13**, 53–58 (1997)
48. Girish M., Ries M., Cenker M., Carbon R., Rauch R., Hofbeck M.: Intestinal perforations in a premature infant caused by *Bacillus cereus*. Case report. *Infection*, **31**, 192–193 (2003)
49. Gouaux E.:  $\alpha$ -hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of  $\beta$ -barrel, channel-forming toxins. *J. Struct. Biol.* **121**, 110–122 (1998)
50. Granum P.E., Anderson A., Gayther C., te Giffel M., Larsen H., Lund T., O'Sullivan K.: Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 145–149 (1996)
51. Granum P.E., Lund T.: Mini review: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 223–228 (1997)
52. Granum P.E., Nissen H.: Sphingomyelinase is part of the 'enterotoxin complex' produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**, 97–100 (1993)
53. Granum P.E., O'Sullivan K., Lund T.: The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 225–229 (1999)
54. Granum P.E.: *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **76**, 61S–66S (1994)
55. Green, B.D., Battisti, L., Koehler, T.M., Thorne, C.B., Ivins, B.E.: Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* **49**, 291–297 (1985)
56. Guinebretiere M.H., Broussolle V., Nguyen-The C.: Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3053–3056 (2002)
57. Hansen B.M., Damgaard P.H., Eilenberg J., Pedersen J.C.: *Bacillus thuringiensis*. Ecology and environmental effects of its use for microbial pest control. Report no. 316, (2006) Danish Environmental Protection Agency. [cyt. za: Rosenquist H., Smidt L., Andersen S.R., Jensen G., Wilcks A.: Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 129–136 (2005)]
58. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 185–189 (2001)
59. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 209–213 (2001)

60. Heinz D.W., Ryan M., Smith M.P., Weaver L.H., Keana J.F., Griffith O.H.: Crystal structure of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* in complex with glycosaminyl (alpha 1—>6)-D-myo-inositol, an essential fragment of GPI anchors. *Biochemistry*, **35**, 9496–9504 (1996)
61. Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C. K., De B.K., Sacchi C.T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M.C., Priest F.G., Barker M., Jiang L., Cer R.Z., Rilstone J., Peterson S.N., Weyant R.S., Galloway D.R., Read T.D., Popovic T., Fraser C.M.: Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8449–8454 (2004)
62. Hofte H., Whiteley H.R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242–255 (1989)
63. Honda T., Shiba A., Seo S., Yamamoto J., Matsuyama J., Miwatani T.: Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 205–210 (1991)
64. Horwood P.F., Burgess G.W., Oakey H.J.: Evidence for a non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**, 319–324 (2004)
65. Hu X., Hansen B.M., Eilenberg J., Hendriksen N.B., Smidt L., Yuan Z., Jensen G.B.: Conjugative transfer, stability and expression of plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 45–52 (2004)
66. Jackson S.G., Goodbrand R.B., Ahmed R., Kasatiya S.: *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 103–105 (1995)
67. Kemmerly S.A., Pankey G.A.: Oral ciprofloxacin therapy for *Bacillus cereus* wound infection and bacteriemia. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 189 (1993)
68. Kim J., Foegeding P.M.: Effects of heat-treatment, CaCl<sub>2</sub>-treatment and ethanol-treatment on activation of *Bacillus sporus*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 414–420 (1996)
69. Kniehl E., Becker A., Forster D.H.: Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. *J. Hosp. Inf.* **55**, 33–38 (2003)
70. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K.: Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *J. Invertebrate Pathol.* **94**, 56–63 (2007)
71. Kotiranta A., Haapasalo M., Kari K., Kerosuo E., Olsen I., Sorsa T., Meurman J.H., Lounatmaa K.: Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infect. Immunol.* **66**, 4895–4902 (1998)
72. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M.: Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microb. Inf.* **2**, 189–198 (2000)
73. Larsen H.D., Jørgensen K.: The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 179–186 (1997)
74. Le Scanff J., Mohammedi I., Thiebaut A., Martin O., Argaud L., Robert D.: Necrotizing Gastritis due to *Bacillus cereus* in an Immunocompromised Patient. *Infection*, **34**, 98–99 (2006)
75. Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Pruss B.M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G.S., Scherer S.: *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Microbiol.* **48**, 1373–1382 (1998)
76. Lee P.K., Buswell J.A., Shinagawa K.: Technical report: distribution of toxigenic *Bacillus cereus* in rice samples marketed in Hong Kong. *World J. Microbiol. Biot.* **11**, 696–698 (1995)
77. Lin S., Schraft H., Odumeru J.A., Griffiths M.W.: Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 159–171 (1998)
78. Lund T., Granum P.E.: Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 151–156 (1996)
79. Lund T., and Granum P.E.: Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, **143**, 3329–3339 (1997)
80. Lund T., De Buyser M.-L., Granum P.E.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molec. Microbiol.* **38**, 254–261 (2000)
81. Lund T., Granum P.E.: The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**, 355–361 (1999)
82. Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bär W., Krähenbühl S.: Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New Eng. J. Medicine*, **336**, 1142–1148 (1997)
83. Mantinen V., Lindström K.: A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environment. Microbiol.* **64**, 1634–1639 (1998)
84. Manzano M., Coccolin L., Cantoni C., Comi G.: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 249–254 (2003)
85. McKilip J.L.: Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Anatome Leeuwenhoek*, **77**, 393–399 (2000)
86. Mendelson I., Tobery S., Scorpio A., Bozue J., Shaffer A., Friedlander A.M.: The NheA component of the non-hemolytic enterotoxin of *Bacillus cereus* is produced by *Bacillus anthracis* but is not required for virulence. *Microbiol. Pathol.* **37**, 149–154 (2004)
87. Mikami T., Horikawa T., Murakami T., Matsumoto T., Yamatawa A., Murayama S., Katagiri S., Shinagawa K., Suzuki M.: An improved method for detecting cytostatic toxic (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 53–58 (1994)
88. Motoi N., Ishida T., Nakano I., Akiyama N., Mitani K., Hirai H., Mazaki Y., Machinami R.: Necrotizing *Bacillus cereus* infection of the meninges without inflammatory reaction in a patient with acute myelogenous leukemia: a case report. *Acta Neuropathol.* **93**, 301–305 (1997)
89. Musa M.O., Douri M.A., Khan S., Shafi T., Al Humaidh A., Al Rasheed A.: Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: three case reports. *Case Rep.* 154–156 (1999)
90. Nakamura L.K.: *Bacillus pseudomycooides* sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1031–1035 (1998)
91. Nichols G.L., Little C.L., Mithani V., de Louvois J.: The microbiological quality of cooked rice from restaurants and take-away premises in the United Kingdom. *J. Food Prot.* **62**, 877–882 (1999)
92. Notermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R., te Giffel M., Peeters-Weem P.: A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.* **14**, 143–151 (1997)

93. Ombui J.N., Schmieger H., Kaliko M.M., Arimi S.M.: *Bacillus cereus* May produce two or more diarrheal enterotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**, 245–248 (1997)
94. Orellano E.G., Girardini J.E., Cricco J.A., Ceccarelli E.A., Vila A.J.: Spectroscopic characterization of bionuclear metal site in *Bacillus cereus*  $\beta$ -lactamase II. *Biochemistry* **37**, 10173–10180 (1998)
95. Perchat S., Buisson C., Chaufaux J., Sanchis V., Lereclus D., Gohar M.: *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. *J. Invert. Path.* **90**, 131–133 (2005)
96. Pinna A., Sechi L.A., Zanetti S., Usai D., Delogu G., Cappuccinelli P., Carta F.: *Bacillus cereus* keratitis associated with contact lens wear. *Ophthalm.* **108**, 1830–1834 (2001)
97. Pirhonen T.I., Andersson M.A., Jääskeläinen E.L., Salkinoja-Salonen M.S., Honkanen-Buzalski T., Johansson T.M.-L.: Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in pasta and meat dish associated with a food poisoning case. *Food Microbiol.* **22**, 87–91 (2005)
98. Prüss B.M., Dietrich R., Nibler B., Märtilbauer E., Scherer S.: The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of *Bacillus cereus* group. *Appl. Environment. Microbiol.* **65**, 5436–5442 (1999)
99. Rajkovic A., Uyttendaele M., Deley W., Van Soom A., Rijsselaere T., Debevere J.: Dynamics of boar semen motility inhibition on a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide). *J. Microbiol. Meth.* **65**, 525–534 (2006)
100. Rasko D.A., Altherr M. R., Han C. S., Ravel J.: Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 303–329 (2005)
101. Rivera A.M.G., Granum P.E., Priest F.G.: Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**, 151–155 (2000)
102. Rosenberg E., Brown D.R., Demain A.L.: The influence of gramicidin S on hydrophobicity of germinating *Bacillus brevis* spores. *Arch. Microbiol.* **142**, 51–54 (1985)
103. Rosenquist H., Smidt L., Andersen S.R., Jensen G.B., Wilcks A.: Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 129–136 (2005)
104. Rusul G., Yaacob N.H.: Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 131–139 (1995)
105. Ryan P.A., Macmillan J.M., Zilinskas B.A.: Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **179**, 2551–2556 (1997)
106. Sadkowska-Todys M., Stefanoff P., Łabuńska E.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w Polsce w 2003 r. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 269–279 (2005)
107. Sakurai N., Koike K.A., Rie Y., Hayashi H.: The rice culture filtrate of *Bacillus cereus* isolated from emetic-type food poisoning causes mitochondrial swelling in HEp-2 Cell. *Microbiol. Immunol.* **38**, 277–343 (1994).
108. Salyers A.A., Whitt D. D.: Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. PWN, Warszawa 2003, 442–445
109. Sarriás J.A., Valero M., Salmerón M.C.: Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* **19**, 589–595 (2002)
110. Sato K., Ichiyama S., Ohmura M., Takashi M., Agata N., Ohta M., Nakashima N.: A case of urinary tract infection caused by *Bacillus cereus*. *J. Infect.* **36**, 247–248 (1998)
111. Schmidt K.: WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Sixth Report 1990–1992. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Berlin 1995
112. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
113. Shinagawa K., Konuma H., Sekita H., Sugii S.: Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 87–90 (1995)
114. Sierecka J.K.: Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 579–595 (1998)
115. Steen M.K., Bruno-Murtha L.A., Chau G., Lazzar H., Bernard S., Sulis C.: *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 945–946 (1992)
116. Stenfors L. P., Mayr R., Scherer S., Granum P.E.: Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 47–51 (2002)
117. Stenfors L.P., Granum P.E.: Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 223–228 (2001)
118. Svensson B., Monthán A., Guinebretière M-H., Nguyen-The Ch., Christiansson A.: Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. *Int. Dairy J.* **17**, 1201–1208 (2007)
119. Taylor J.M.W., Sutherland A.D., Aidoo K.E., Logan N.A.: Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 313–317 (2005)
120. Van der Auwera G. A., Timmerly S., Hoton F., Mahillon J.: Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 164–172 (2007)
121. Veld in't P.H., Ritmeester W.S., Delfgou-van Asch E.H.M., Duffrenne J.B., Wernars K., Smit E., van Leusden F.M.: Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 63–70 (2001)
122. Warren G.W., Koziel M.G., Mullins M.A., Nye G.J., Carr B., Desai N.M., Kostichka K., Duck N.B., Estruch J.J.: Novel pesticidal proteins and strains. USA Patent No. WO96/10083 (1996)
123. Wazny T.K., Mumman N., Styr B.: Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. *European J. Clin. Infect. Dis.* **9**, 830–832 (1990)
124. WHO, Surveillance Programme for Control of Foodborne Infection and Intoxications in Europe, 8<sup>th</sup> report 1993–1998 and 1999–2000 (2000)
125. Zabransky R.J.: *Bacillus cereus* septicemia with probable endocarditis. *Clin. Microbiol. Newslett.* **20**, 176–178 (1998)





Katarzyna Beata Obrębska<sup>1</sup>, Agnieszka Szczygła<sup>1</sup>, Marzena Matejczyk<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Nauk Biologicznych, Wyższa Szkoła Kosmetologii i Ochrony Zdrowia  
ul. Krakowska 9, 15-875 Białystok, [obrebska@uwb.edu.pl](mailto:obrebska@uwb.edu.pl)

<sup>2</sup> Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska  
Politechnika Białostocka, ul. Wiejska 45 A, 15-351 Białystok

Wpłynęło w październiku 2007 r.

1. Wstęp. 2. Skażenia mikrobiologiczne związane z produkcją kosmetyków. 3. Skażenia mikrobiologiczne związane z używaniem kosmetyków. 4. Konsekwencje skażenia mikrobiologicznego produktów kosmetycznych. 5. Priorytety w produkcji kosmetyków oraz normy mikrobiologiczne

## Microbiological contamination of raw materials and cosmetic products

**Abstract:** Cosmetics and hygienical products are used world-wide to improve human hygiene, skin condition and body appearance. Their quality is influenced by their chemical composition, active components and the presence of bacteria, protozoa and fungi. To avoid microbiological contamination, strict norms and procedures have been elaborated including Good Manual Practise (GMP) and Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP). In spite of them, contamination takes place both, during production and the use of cosmetic products. Bacteria and fungi in cosmetics come from raw materials like water, milk, essential oils and plant tissues or originate from biofilms formed in production lines as re-contamination. The most frequently found microbes are enterobacteria, staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa*, and sporeforms of *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp. These contaminants in high number, noted in mascara, eye-shadows, shampoos or body lotions, could be the reason of corneal ulcer, toxic syndromes and skin infections. Moreover, proliferation of microbes leads to spoilage problems and to the shortening of the 'best before' period. The best way to avoid most of the problems connected with microbiological contamination is proper selection of good-quality raw materials, efficient disinfection and biofilm elimination as well as and applying the GMP procedures and HACCP rules in the factories. Education of consumers and proper storage and use of cosmetic and hygienical products are also very important.

1. Introduction. 2. Microbiological contamination during the production of cosmetics. 3. Microbiological contamination connected with the use of cosmetics products. 4. Microbiological consequences of microbial contamination in cosmetic products. 5. Priorities of cosmetics production in relation to microbiological norms

---

**Słowa kluczowe:** mikrobiologia kosmetyków, skażenia mikrobiologiczne

**Key words:** cosmetics microbiology, microbiological contamination

---

## 1. Wstęp

Kosmetyki i środki higieniczne pozwalają na utrzymanie czystości, przyjemnego zapachu oraz odpowiedniego wyglądu ludzkiego ciała. Powszechność stosowania tych środków sprawia, że ich jakość ma bardzo duże znaczenie dla zdrowia konsumentów. O jakości kosmetyków decyduje w równym stopniu bezpośredni efekt ich stosowania, jak i potencjalna obecność czynników niepożądanych, głównie zanieczyszczeń mikrobiologicznych i chemicznych. Szczególnie niebezpieczne są skażenia mikrobiologiczne, które mogą być powodem wielu problemów związanych głównie z ich negatywnym wpływem na zdrowie ludzi.

Generalnie, produkty kosmetyczne można podzielić na kilka grup. Pierwszą stanowią codzienne środki higieniczne, jak: mydła, szampony, żele do kąpieli,

pasty do zębów czy płyny do płukania jamy ustnej. Mimo, że zazwyczaj nie są one produkowane w sterylnych warunkach, z uwagi na wysoką zawartość środków aktywnych występujące w nich mikroorganizmy mają niewielką szansę na namnażanie się oraz syntezę toksycznych metabolitów. W skład drugiej grupy wchodzi produkty działające łagodząco, nawilżająco, nadające elastyczność oraz regenerujące powierzchnię skóry i błon śluzowych, jak balsamy i kremy do ciała oraz oliwki dla dzieci i niemowląt. Środki te zawierają substancje odżywcze, co w połączeniu z beztlenowymi warunkami sprzyjać może proliferacji potencjalnie niebezpiecznych beztlenowców. Trzecia grupa to szeroko rozumiane kosmetyki kolorowe stosowane w celu poprawy estetyki oraz ukryciu niewielkich defektów skórnych. Zaliczyć tu możemy produkty o ogromnej różnorodności, takie jak: tusze do

rzęs, pomadki do ust, podkłady, cienie do powiek, korektory, pudry itp. Ich charakter chemiczny, konsystencja i często niska zawartość wody sprawia, że są nieodpowiednim medium do rozwoju bakterii i grzybów. Niemniej można oczekiwać występowania w nich przetrwalników tlenowych laseczek z rodzaju *Bacillus* oraz zarodników grzybów. Z uwagi na ogromną różnorodność warunków produkcji i stosowania kosmetyków oraz środków higienicznych, ich producenci napotykać na liczne problemy dotyczące zapewnienia odpowiedniej jakości tych wyrobów. W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się wzrost środków finansowych przeznaczonych na badania naukowe w tym zakresie, bowiem presja ze strony konsumentów oraz coraz ostrzejszych wymogów prawnych zmusza wytwórców do nieustannego doskonalenia procesu produkcji i podnoszenia jakości wyrobów.

Skażenie mikrobiologiczne, wynikające z obecności mikroorganizmów w surowcach oraz urządzeniach produkcyjnych, a także z kontaktu gotowego już produktu z drobnoustrojami może prowadzić do poważnych i niebezpiecznych dla zdrowia człowieka konsekwencji. Nadmierna proliferacja komórek bakteryjnych może skutkować obniżeniem jakości produktu, co przejawia się np. zmianami konsystencji, barwy czy nieprzyjemnym zapachem [25]. Dodatkowo, metabolity bakteryjne oraz przetworzone substancje aktywne w kosmetykach oddziałując na wrażliwą skórę prowadzą często do reakcji alergicznych bądź lokalnych stanów zapalnych. Wreszcie kontakt potencjalnie chorobotwórczych bakterii ze skórą czy błonami śluzowymi może skutkować rozwojem typowych stanów chorobowych [3, 4]. Znane są przypadki poważnych powikłań zdrowotnych związanych z zastosowaniem kosmetyków skażonych bakteriologicznie. Najbardziej drastycznymi przykładami są: uszkodzenie wzroku będące konsekwencją zastosowania tuszu do rzęs zawierającego *Pseudomonas* sp., owrzodzenie rogówki po dotknięciu powierzchni oka szczoteczką do rozprowadzania tuszu, miejscowe zapalenie skóry wywołane przez *Klebsiella pneumoniae* obecne w kremie do rąk. Konieczność zabezpieczenia się przed podobnymi zagrożeniami doprowadziła do ustalenia norm postępowania w czasie produkcji kosmetyków. Zalecono używanie bezpiecznych dla konsumenta środków konserwujących oraz odpowiednich opakowań utrudniających dostęp mikroorganizmów do kosmetyków [26]. Jednocześnie określono szereg czynników sprzyjających przedostawaniu się mikroorganizmów do kosmetyków w czasie ich produkcji. Obecnie w przemyśle kosmetycznym obowiązują zasady dobrej praktyki wytwórczej, w skrócie – GMP (ang. – Good Manufacturing Practice). Aktualne wytyczne GMP zawarte w dyrektywie UE 2003/15/CE mają sprawić, że produkty kosmetyczne odpowiedniej jakości są wytwa-

rzane i testowane zgodnie z normami wspólnymi dla wszystkich krajów Unii Europejskiej [6]. Polska również posiada krajowe normy standaryzujące jakość wytwarzanych kosmetyków i środków higienicznych. Są one określone dla poszczególnych grup produktów, np.: mydła, szampony i odplątnie dostępne w Internecie [[http://pin.atr.bydgoszcz.pl/index.aspx?plik=i\\_katalog\\_seg](http://pin.atr.bydgoszcz.pl/index.aspx?plik=i_katalog_seg)]. Dzięki odpowiedniemu pozyskiwaniu i doborowi surowców, ich przetwarzaniu oraz przechowywaniu, gotowe kosmetyki powinny być wolne m.in. od drobnoustrojów takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* sp., *Clostridium perfringens*, *C. tetani*, *Pseudomonas aeruginosa*, przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* oraz grzybów z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* czy *Trichophyton* [16].

Aktualne zalecenia nakazują, aby wszelkie normy związane z produkcją, pakowaniem, dystrybucją i handlem kosmetykami w całej UE były identyczne. Konsumentom zaś należy uświadamiać, że poprzez swoje niektóre działania mogą mieć niekorzystny wpływ na jakość zakupionego produktu.

## 2. Skażenia mikrobiologiczne związane z produkcją kosmetyków

Każdy etap wytwarzania produktów, począwszy od pozyskiwania surowców, przez ich przetwarzanie, pakowanie i dystrybucję obarczony jest potencjalnym ryzykiem kontaminacji mikrobiologicznej. Różnorodne substancje, w zależności od ich składu chemicznego oraz zasobności w wodę stwarzają odmienne warunki do wzrostu drobnoustrojów. Zazwyczaj bezwodne, syntetyczne substancje chemiczne (sztuczne oleje, woski i tłuszcze oraz związki powierzchniowo czynne) są wolne od zanieczyszczeń, bądź zawierają tylko niewielkie mikroorganizmy, które z uwagi na warunki nie są w stanie rozmnażać się. Takie surowce mogą być bezpiecznie przechowywane przez stosunkowo długi okres w fabrykach bez obaw związanych z pogorszeniem ich jakości. Jednak ich przetwarzanie, wzbogacanie w składniki pochodzenia naturalnego i wodę powoduje, że sytuacja zmienia się gwałtownie. Składniki pochodzenia naturalnego często zawierają różnorodne mikroorganizmy, zazwyczaj charakterystyczne dla źródeł pozyskiwanych materiałów. Efektem tego jest zróżnicowana jakość mikrobiologiczna kosmetyków w zależności od mikroflory surowców naturalnych.

Do najczęściej stosowanych w produktach kosmetycznych i higienicznych składników należy woda. Może ona m.in. zawierać potencjalnie niebezpieczne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Istnieją wytyczne określające jakość wody. Przykładowo, według dyrektywy Unii Europejskiej nr 98/83/EC [14] w wodzie konsumpcyjnej nie mogą występować takie patogeny,

jak *Enterococcus* sp., *E. coli* czy *C. perfringens* zarówno w formie wegetatywnej jak i przetrwalnikowej [35]. Woda technologiczna, stosowana do procesów produkcyjnych czy też czyszczenia instalacji niejednokrotnie zawiera liczne bakterie i zarodniki grzybów. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia wskazujące na występowanie w wodzie spożywczej niebezpiecznych organizmów jak pierwotniaki: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* sp., oraz bakterie: *Aeromonas* sp., *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Mycobacterium* sp. [20, 31, 33, 38]. Zgodnie z nowoczesnymi trendami w kosmetologii, coraz większego znaczenia nabiera woda pochodząca ze specyficznych miejsc, na przykład bagien, lodowców czy gorących źródeł. Może ona zawierać liczne składniki odżywcze oraz regulatory wzrostu [15]. Jej zastosowanie niesie ze sobą ryzyko wprowadzenia bakterii o unikalnych właściwościach, jak skrajna ciepłooporność czy zdolność do proliferacji na bardzo ubogich mediach [22].

W produkcji kosmetyków często wykorzystywane są surowce roślinne i zwierzęce. Do produkcji peelingów stosuje się rozdrobnione łupiny kokosów czy orzecha włoskiego, kryształy cukru i soli. Jako substancje łagodzące, zapachowe, nawilżające i regenerujące w płynach do kąpieli, żelach pod prysznic czy szamponach do włosów zastosowanie znajdują soki lub wyciągi roślinne (na przykład rumianek, szalwia, pokrzywa, nagietek) oraz mleko. Żadna z tych substancji nie jest wolna od bakterii. Szczególnie łatwo możemy spotkać przedstawicieli tlenowych sporulujących laseczek z rodzaju *Bacillus*. Udowodniono, że w mleku powszechnie występuje *Bacillus cereus sensu lato*, grupa sześciu szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie gatunków, które mogą m.in. wywoływać u ludzi zatrucia pokarmowe oraz okazjonalnie owrzodzenia skóry, zakażenia ran, zapalenia przyzębia [2, 11, 30]. Zagrożenie staje się tym bardziej realne, że wszystkie laseczki są, dzięki wytwarzaniu endospor, bardzo odporne na wysoką temperaturę. *Bacillus sporothermodurans* wytrzymuje ogrzewanie w temperaturze 100°C przez 30 minut [28]. Wiele szczepów *Bacillus* sp. zachowuje także zdolność do namnażania w temperaturach niższych niż 10°C wytwarzając w tych warunkach liczne enzymy powodujące rozkład substancji organicznych, na przykład lecytynazy i inne. Również występowanie Gram-ujemnych bakterii psychrotroficznych, takich jak: pałeczki jelitowe, przedstawiciele rodzaju *Pseudomonas* czy *Aeromonas* stanowi potencjalne niebezpieczeństwo. Mogą one prowadzić do problemów w przechowywaniu i wykorzystywaniu poszczególnych składników [12].

Ogromny wpływ na jakość substancji wykorzystywanych w produkcji środków kosmetycznych i higienicznych mają warunki i sposób ich pozyskiwania. Nie-

właściwe zbieranie surowców, ich suszenie, tłoczenie soku komórkowego czy przygotowywanie ekstraktów mogą prowadzić do nadmiernego nagromadzenia mikroorganizmów. Fragmenty roślinne mogą ulegać pleśnieniu podczas przechowywania. Stają się później źródłem zarodników grzybów pleśniowych, zawierają różne toksyny. Jest to przedmiotem kolejnego istotnego problemu związanego z ochroną mikrobiologiczną kosmetyków, a mianowicie wykrywaniem i eliminacją źródeł kontaminacji w samym zakładzie przemysłowym.

Zgodnie z raportem Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (2002) sama instalacja do oczyszczania wody, gdzie swobodnie namnażają się zasiedlające ją bakterie, może być źródłem skażenia wody. Również inne urządzenia, szczególnie rury, zbiorniki, filtry i odstojniki tworzą dobre warunki do formowania biofilmów przez niektóre bakterie. Dzięki specyficznej budowie ścian i otoczek komórkowych, liczne gatunki *Bacillus* sp. łatwo przylegają do stałych i szklanych powierzchni pokrywając je cienką, trudną do usunięcia błoną [8, 23, 24]. Także wszelkie punkty bezodpływowe, gdzie dochodzi do gromadzenia się różnych substancji stanowią doskonałe miejsce do namnażania się drobnoustrojów i formowania przez nie błon biologicznych. Przykładem tego może być produkcja żywności, gdzie wykazano, że pasteryzator służący do obróbki cieplnej płynów oraz urządzenia do napełniania były źródłem skażenia mikrobiologicznego [7, 30]. Dlatego też odpowiednie procedury dezynfekcji, właściwa konstrukcja urządzeń produkcyjnych oraz stosowanie zasad dobrej praktyki wytwórczej jest niezwykle ważne dla dobrej jakości produktu końcowego. Brak elementów, w których dochodziłoby do akumulacji materii, instalowanie odpływów pozwalających usunąć pozostałe resztki cieczy, elementy łatwe w demontażu i czyszczeniu pozwalają minimalizować opisane ryzyko. Producenci winni zwrócić szczególną uwagę na przestrzeganie zasad higieny nie tylko w zakładach produkujących ostateczny produkt, a również przy obróbce poszczególnych komponentów oraz przy pakowaniu produktów kosmetycznych. Należy dołożyć wszelkich starań, aby zminimalizować możliwość zanieczyszczenia końcowego produktu mikroorganizmami. Może to zagrozić zdrowiu konsumenta, a także znacznie obniżyć jakość i trwałość kosmetyku.

### 3. Skażenia mikrobiologiczne związane z użytkowaniem kosmetyków

W momencie otwarcia opakowania produkty kosmetyczne narażone są na nowe źródła potencjalnie patogennych mikroorganizmów, które dla uproszczenia i lepszego zrozumienia nazywamy środowiskiem konsumenckim. Pojęcie to określa bardzo różnorodne

warunki, w jakich kosmetyki i środki higieniczne są powszechnie użytkowane. Aby w pełni uświadomić zagrożenie, należy przeanalizować warunkami domowego przechowywania i stosowania kosmetyków.

Liczne środki do pielęgnacji ciała przetrzymywane są w łazience. Panujące tam warunki, z uwagi na wilgoć i wysoką temperaturę stwarzają dogodne warunki do rozwoju bakterii i grzybów pleśniowych. Mogą one z kolei łatwo penetrować do produktów kosmetycznych, szczególnie tych, których opakowanie nie ogranicza całkowicie kontaktu produktu ze środowiskiem zewnętrznym. Taka sytuacja stawia przed producentami liczne wyzwania i zmusza do stosowania szeregu konserwantów, środków grzybo- i bakteriobójczych ograniczających wzrost niepożądanych drobnoustrojów [21].

Środki do pielęgnacji ciała stosujemy również w innych miejscach. W czasie wakacji nieodłącznym atrybutem plażowicza jest olejek, krem bądź emulsja do opalania, zazwyczaj z filtrem promieni UV. To kolejny przykład sytuacji, w której często dochodzi do kontaminacji różnych kosmetyków. Bardzo łatwo do naszego produktu dostają się wtedy mikroskopijne ilości piasku i kurzu unoszącego się w powietrzu. Wykazano, że w czasie dwutygodniowych wakacji emulsja do opalania, pomimo stosowania zgodnie z zaleceniami producenta, ulega znacznemu skażeniu mikrobiologicznemu. Kolejne badania, wykonane po rocznym przechowywaniu i ponownym stosowaniu w okresie urlopu wykazały, że ilość drobnoustrojów w takim produkcie zbliżała się do poziomu 1000 cfu/g produktu, co może skutkować niebezpiecznymi dla zdrowia konsekwencjami [26].

Czynnikiem, który dodatkowo sprzyja skażeniu kosmetyków jest flora fizjologiczna skóry konsumentów, szczególnie dłoni. Dąży się więc do maksymalnego ograniczenia kontaktu rąk z kosmetykiem w opakowaniu. Wygodnym i skutecznym sposobem jest stosowanie opakowań posiadających odpowiednią pompkę lub dozownik, jaki znamy na przykład z mydeł w płynie oraz niektórych markowych kremów i balsamów. Skóra ma wówczas kontakt wyłącznie z pobieraną porcją kosmetyku, nie ma natomiast możliwości skażenia pozostałej części produktu [5]. Inną ważną sprawą, na którą należy zwrócić uwagę, jest wielkość opakowania. Im większa porcja specyfiku, tym dłuższy czas jego stosowania, a tym samym okres, w którym mikroorganizmy mogą się w nim namnażać [26]. Także stosowanie tego samego opakowania produktu kosmetycznego przez kilka osób jednocześnie może negatywnie wpływać na jego jakość. Wiąże się to z ogromną różnorodnością flory fizjologicznej ludzi oraz naturalnych populacji drobnoustrojów, nawet blisko ze sobą spokrewnionych.

Biorąc pod uwagę wyżej analizowane uwarunkowania uważa się, że najbardziej narażone na skażenie

związane ze stosowaniem są kosmetyki zawierające wodne emulsje olejów, bogate w tłuszcze, witaminy i sole mineralne, w dużych opakowaniach i stosowane równocześnie przez kilka osób. Niestety, wśród konsumentów panuje niska świadomość tego zagadnienia. Producenci kosmetyków powinni skupić większą uwagę na propagowanie wśród klientów zasad właściwego stosowania i przechowywania kosmetyków. Wszyscy powinniśmy mieć świadomość, że niewłaściwie przechowywane i używane kosmetyki, podobnie jak artykuły spożywcze, ulegają zepsuciu i mogą być przyczyną różnych chorób. Z uwagi na powyższe zjawiska Unia Europejska w marcu 2005 roku wydała odpowiednie przepisy dotyczące między innymi okresu, jaki może minąć od chwili otwarcia danego produktu do upływu terminu jego przydatności do użycia [6, 25].

#### 4. Konsekwencje skażenia mikrobiologicznego produktów kosmetycznych

Występowanie drobnoustrojów w produktach kosmetycznych jest rzeczą powszechną. Chociaż przyjmuje się, że kosmetyki nie muszą być sterylne, to jednak obecność bakterii i grzybów jest w nich niewskazana, szczególnie mikroflory potencjalnie chorobotwórczej. Pierwszym efektem namnażania się bakterii i wzrostu ich aktywności metabolicznej jest zmiana właściwości skażonego produktu. Może ona przejawiać się w zmianach konsystencji, zapachu, struktury, koloru i składu chemicznego [25]. Egzokomórkowe wydzielanie lipaz, proteaz czy lecytynaz, spotykane między innymi w przypadku *B. cereus* powoduje rozkład składników odżywczych dodawanych do kremów, balsamów oraz odżywek. Jak wykazali B e h r a v a n i wsp. [47] do gatunków licznie zasiedlających kosmetyki należą, oprócz *Bacillus* sp. także inne Gram-dodatnie bakterie. Największe zagrożenie stwarza *S. aureus*. Gatunek ten, należący do naturalnej flory bakteryjnej skóry i błon śluzowych człowieka, spotykany jest często w balsamach i kremach do ciała [29]. Z uwagi na różnicowaną patogenezę związaną z wydzielaniem toksyn o charakterze superantygenów oraz szeregu enzymów może stanowić poważne zagrożenie zdrowotne. Potencjalne niebezpieczeństwo wiąże się przede wszystkim z wnikaniem bakterii do uszkodzonej mikrourazami skóry lub na powierzchnię oka, na przykład przy aplikacji tuszu do rzęs. Zakażenie *S. aureus* może doprowadzić do przypadków zespołu wstrząsu toksycznego (ang. TSS – toxic shock syndrome) lub zespołu oparzonej skóry noworodków (ang. staphylococcal skalded skin syndrome – *dermatitis exfoliativa neonatorum Ritter*) związanych ze stosowaniem skażonego gronkowcem złocistym kremu do ciała. Choroba objawia się rozległymi pęcherzami, intensywnym

złuszczeniem się naskórka i odsłanianiem skóry właściwej na dużych przestrzeniach (tzw. zespół Rittera) lub powstawaniem mniej rozległych zmian pod postacią liszajca pęcherzykowego czy wysypki rumieniowej [1]. Obecność innych gronkowców: *Staphylococcus warneri*, *S. epidermidis* opisano w mydłach, szamponach i płynach do kąpieli [6]. Występowanie *S. epidermidis* w kosmetykach i środkach higienicznych może być związane z wtórnym zanieczyszczeniem produktu w zakładzie wytwórczym. Bakterie te posiadają dużą zdolność tworzenia biofilmu, trudnego do usunięcia w trakcie produkcji [10].

Dzieci oraz osoby z obniżoną odpornością są szczególnie podatne na skutki uboczne związane ze skażeniem kosmetyków i produktów kosmetycznych. Wyjątkowo drastyczny przypadek śmierci czworga dzieci wskutek infekcji będącej efektem stosowania talku dla niemowląt zawierającego endospory beztlenowych bakterii *Clostridium tetani* opisał w 1946 roku T r e m e w a n [32]. Również dzieci były ofiarami poważnej infekcji *P. aeruginosa* na oddziale noworodkowym. Dochodzenie epidemiologiczne wykazało, że źródłem zakażenia był zanieczyszczony bakteriami krem do rąk stosowany przez personel oddziału [3]. *P. aeruginosa*, niekiedy łącznie z *K. pneumoniae* izolowany jest często z kosmetyków kolorowych, takich jak tusze do rzęs czy cienie do powiek [9, 17, 27]. Często *P. aeruginosa* są odpowiedzialne za groźne infekcje oka, jak owrzodzenie rogówki i głębokie zakażenie rogówki [27, 37]. Występowanie innego gatunku z tego rodzaju, *Pseudomonas putida* wykryto w środkach stosowanych do kąpieli [6]. Dokładne badania testerów cieni do powiek różnych marek wykazały obecność *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Actinobacter* oraz *Moraxella* sp., *Neisseria* sp. oraz gronkowców [9]. Szampon do włosów może być natomiast źródłem chorobotwórczych bakterii *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp. czy *Klebsiella* sp. [5]. Powyższe przykłady obecności w kosmetykach bakterii Gram-ujemnych, uważanych za rzadziej wywołujące infekcje skórne powinny budzić uzasadniony niepokój [29, 36]. Obserwacje B e h r a v a n a i wsp. z 2000 r., wskazują, że wprawdzie znaczna część fabrycznie nowych, nieotwieranych kosmetyków zawiera *E. coli* oraz *P. aeruginosa*, to wraz z używaniem tych produktów odsetek skażonych opakowań, podobnie jak i ilość bakterii na jednostkę masy produktu drastycznie wzrasta. Niezwykle ważny jest więc rodzaj opakowania. Dowiedziono, że produkty w opakowaniach z dozownikami, które wykluczają kontakt substancji ze środowiskiem zewnętrznym są znacznie bezpieczniejsze i mniej podatne na skażenia w trakcie stosowania [5].

Grzyby dość powszechnie występują w całej gamie opisywanych produktów kosmetycznych. Występowanie

nie *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus funigatus* oraz *Penicillium* sp. stwierdzono w kremie do rąk [18, 21] natomiast w cieniach do powiek obecność drożdży [9]. Grzyby, szczególnie pleśniowe, generalnie odpowiadają za obniżanie jakości produktów, w wyjątkowych przypadkach mogą stawać się przyczyną schorzeń. U pacjenta poddanego immunosupresji opisano przypadek grzybicy skórnej wywołanej przez *Paecilomyces lilacinus* pochodzący z balsamu do ciała [19].

Powyższe przykłady niebezpieczeństw związanych z obecnością drobnoustrojów w środkach pielęgnacyjnych i upiększających podkreślają celowość odpowiedniego kształtowania świadomości konsumentów oraz stałe dbanie o jakość wytwarzanych produktów. Właściwe przechowywanie i stosowanie powinno wtedy uchronić nas zarówno przed zepsuciem się kosmetyków jak i przykrymi konsekwencjami użycia produktów skażonych.

## 5. Priorytety w produkcji kosmetyków oraz normy mikrobiologiczne

W produkcji kosmetyków do zadań priorytetowych, oprócz zapewnienia odpowiedniego działania produktu, należy dbać o czystość chemiczną i mikrobiologiczną. Aby ułatwić wytwórcom osiągnięcie właściwej jakości, opracowano system kontroli krytycznych punktów produkcji oznaczany skrótem HACCP (ang. Hazard Analysis Critical Control Points). Procedura ta, obowiązująca między innymi w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym składa się z siedmiu podstawowych zasad, których przestrzeganie minimalizuje ryzyko wyprodukowania i wprowadzenia do obiegu wadliwego lub zanieczyszczonego środka. Kluczowym warunkiem wdrożenia tego systemu jest przeprowadzenie analizy wszystkich potencjalnych zagrożeń dla całego szlaku produkcji i dystrybucji oraz określenie krytycznych punktów kontroli, czyli miejsc, w których należy podjąć szczególne środki ostrożności z uwagi na najwyższe ryzyko skażenia surowców lub gotowego produktu. Następnie opracowuje się odpowiednie normy i złożony system kontroli jakości uwzględniający CCP, a także określa postępowanie w przypadku stwierdzenia przekroczenia dopuszczalnych zakresów skażenia w poszczególnych punktach kontroli. Aby system działał poprawnie, konieczna jest również odpowiednia metodyka weryfikująca jego funkcjonowanie.

W USA stosowne normy, dotyczące w szczególności gatunków wskaźnikowych, przede wszystkim *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. i *S. aureus*, są zawarte w odpowiedniku naszej Farmakopei – United States Pharmacopeia [34]. W Wielkiej Brytanii The Cosmetics, Toiletry & Perfumery Association określiło

maksymalne dopuszczalne ilości bakterii w produktach kosmetycznych przeznaczonych do stosowania na skórze wrażliwej (skóra dzieci, okolice oczu) na poziomie 100 cfu/g produktu, podczas gdy w pozostałych kosmetykach poziom skażenia mikrobiologicznego nie może przekraczać 1000 cfu/g produktu [26]. Europejska Farmakopea zawiera szczegółowe wytyczne, dotyczące głównie rodziny *Enterobacteriaceae* [13]. Odpowiednie przepisy, zawarte w dyrektywie UE 2003/15/CE wydała też Unia Europejska. Ich skutkiem jest, między innymi określenie wskaźnika PAO (ang. Period After Opening) czyli czasu od otwarcia kosmetyku do momentu, kiedy jego skażenie mikrobiologiczne osiągnie poziom stwarzający zagrożenie dla konsumentów. Okres ten wyrażany jest w miesiącach („M”) i umieszczany na opakowaniu. Jeśli więc okres PAO dla danego produktu wynosi 1 rok to na opakowaniu będzie widnieć napis 12 M. [25].

Wszystkie powyższe zalecenia, podobnie jak wytyczne Dobrej Praktyki Produkcyjnej (ang. Good Manufacture Practice – GMP) oraz Dobrej Praktyki Higienicznej (ang. Good Hygiene Practice – GHP) mają na celu niedopuszczenie do obrotu towarów, których jakość stwarzałaby realne zagrożenie dla konsumentów. Jednak pomimo wprowadzenia licznych środków zapobiegawczych czy stosowania konserwantów oraz środków bakterio- i grzybobójczych nie mamy, jako konsumenci pełnej gwarancji, że kosmetyki, które nabywamy są pod względem mikrobiologicznym zupełnie bezpieczne. Świadomość klientów w tym zakresie odgrywa niebagatelną rolę, gdyż nawet najlepsze normy i zasady produkcji nie chronią przed skutkami rekontaminacji produktów w trakcie ich stosowania. Tak więc, z uwagi na potencjalne zagrożenia związane z wykorzystywaniem skażonych produktów zarówno wytwórcy jak i użytkownicy muszą zachować czujność i rozsądek. Takie postępowanie sprawi, że kosmetyki będą zawsze kojarzyć się tylko z pozytywnymi odczuciami.

## Piśmiennictwo

- Aly R.: Staphylococcal infections (w:) Atlas of Infections of the Skin, red. R. Aly, H.I. Maybach, Churchill Livingstone, New York, 1999, s. 115–122
- Bartoszewicz M., Święcicka I., Buczek J.: Cereulidyna i enterotoksyny *Bacillus cereus sensu lato*. *Med. Wet.* **62**, 28–31 (2006)
- Becks V., Lorenzoni N.: *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit: a possible link to contaminate hand lotion. *Am. J. Inf. Contr.* **23**, 396–398 (1995)
- Behravan, J., Bazzaz F., Malaekheh P.: Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. *Int. J. Dermatol.* **44**, 482–485 (2005)
- Brannan D., Dille J.: Type of closure prevents microbial contamination of cosmetics during consumer use. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1476–1479 (1990)
- Campana R., Scesa C., Patrone V., Vittoria E., Baffone W.: Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 301–306 (2006)
- Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B.: *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.* **82**, 305–314 (1999)
- Davey M.E., O’Toole G.A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847–867 (2000)
- Dawson N.L., Reinhardt D.J.: Microbial flora of in-use, display eye shadow testers and bacterial challenges of unused eye shadows. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 297–302 (1981)
- Deighton M.A., Borland R., Capstick J.A.: Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. *Epidemiol. Infect.* **117**, 267–280 (1996)
- Drobniński F.A.: *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 324–38 (1993)
- Eneroth A., Christiansson A., Brendehaug J., Molin G.: Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *Int. Dairy J.* **8**, 829–834 (1998)
- European Pharmacopeia Secretariat; European Pharmacopeia. Strasbourg, France.: 1998
- European Union. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Commun. L.* **330**, 32–54 (1998)
- Falkinham III J.O., Norton C.D., LeChevallier M.W.: Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1225–1231 (2001)
- Heinzel M. Antimicrobial and preservative efficiency (w:) Cosmetic controlled efficacy studies and regulations, red. P. Elsner, H.F. Merk, H.I. Maibach, Springer Verlag, Stuttgart, 1999, s. 275–290
- Hitchins A.D., Tran T.T., McCarron J.E.: Microbiological methods for cosmetics (w) Bacteriological Analytical Manual red. G.J. Jackson, R.I. Merker, R. Bandler, 8th edn. Revision A, 1998 Chapter 23
- Hugbo P.G., Onyekweli A.O., Igwe I.: Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *Trop. J. Pharm. Res.* **2**, 229–234 (2003)
- Itin P., Frei R., Lautenschlager S., Buechner S., Surber C., Gratwohl A., Widmer A.: Cutaneous manifestation of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. *J. Am. Acad. Dermatol.* **39**, 401–409 (1998)
- Leclerc H., Schwartzbrod L., Die-Cas E.: Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 371–409 (2003)
- Linter K., Genet V.: A physical method for the preservation of cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.* **20**, 103–115 (1998)
- Livanainen E.K., Martikainen P.J., Räisänen M.L., Katila M.L.: Mycobacteria in boreal coniferous forest soils. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 355–364 (1997)
- Mah T.F.C., O’Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39 (2001)
- Martiny A.C., Jørgensen T.M., Albrechtsen H.J., Arvin E., Molin S.: Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Appl. Environment. Microbiol.* **69**, 6899–6907 (2003)
- Orus P., Leranoz S.: Current trends in cosmetic microbiology. *Int. Microbiol.* **8**, 77–79 (2005)
- Perry B.: Cosmetic microbiology. *Microbiol. Today* **28**, 185–187 (2001)

27. Reaid, F.R., Wood, T.O.: *Pseudomonas* corneal ulcer: the causative role of contaminated eye cosmetics. *Arch. Ophthalmol.* **97**, 1640–1641 (1979)
28. Scheldeman P., Pil A., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M.: Incidence and diversity of potentially highly heat resistant spores isolated at dairy farms. *Appl. Environment. Microbiol.* **71**, 1480–1494 (2005).
29. Sugeng M.W., Ang P., Tan H.H., Goh C.L.: Characteristics of bacterial skin infections in children compared to adults at a tertiary dermatologic center. *Int. J. Dermatol.* **38**, 582–586 (1999)
30. Svensson B., Ekelund K., Ogura H., Christiansson A.: Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int. Dairy J.* **14**, 17–27 (2004)
31. Szewzyk U., Szewzyk R., Manz W., Schleifer K.H.: Microbiological safety of drinking water. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 81–127 (2000)
32. Tremewan H.C.: Tetanus neonatorum in New Zealand. *N.Z. Med. J.* **45**, 312–313 (1946)
33. Theron J., Cloete T.E.: Emerging waterborne infections: contributing factors, agents and detection tools. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 1–26 (2002)
34. United States Pharmacopeia Convencion, Rockville, MD: US Pharmacopeia (2006)
35. Vaerewijck M.J., Huys G., Palomino J.C., Swings J., Portaels F.: Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 911–934 (2005)
36. Webster G.F.: Gram-negative infections: folliculitis, toe web, others (w) Atlas of Infections of the Skin 3rd edn, red. R. Aly, H.I. Maibach. Churchill Livingstone, New York, 1999, s.133–138
37. Wilson, L.A., Ahearn D.G.: *Pseudomonas*-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras. *Am. J. Ophthalmol.* **97**, 112–119 (1977)
38. World Health Organization (WHO); Microbial fact sheets (w) Guidelines for drinking-water quality – 3<sup>rd</sup> edn. vol. 1 (Recommendations), pp. 221–295. WHO, Geneva. (2004)





## *Od Redakcji*

Uprzejmie informuję, iż znaczna część 2-go zeszytu Postępów Mikrobiologii w roku 2008 została oddana do dyspozycji Komitetu Naukowego XXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. W zeszycie tym drukowane będą streszczenia zjazdowe planowanych referatów plenarnych.

Redakcja PM przeprasza za możliwość opóźnienia druku zakwalifikowanych już do publikacji prac przysłanych wcześniej do Redakcji.

*Jerzy Hrebenda*  
*Redaktor Naczelny*

---

## **INFORMACJA DLA AUTORÓW PRAC DRUKOWANYCH w „Postęпах Mikrobiologii”**

Uprzejmie informujemy PT Autorów *PM*, iż zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku zmianie ulegną zasady 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**

Dotychczasowa instrukcja opisana w **INFORMACJI DLA AUTORÓW** (*Post. Mikrobiol.*, 2007, **46**, 73–75 i 79–80) pozostaje bez zmian.

Opłatę można wносить **indywidualnie**, wtedy dowód wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. W przypadku opłaty **przelewem** (instytucja, fundacja itp.) Autorzy korzystający z tej formy płatności są zobowiązani do złożenia u **Sekretarza Redakcji** wraz z manuskrytem pisemnego zobowiązania się do bezzwłocznej opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT.

**Na adres siedziby Zarządu PTM:** 00-725 Warszawa ul. Chełmska 30/34 należy **przesyłać zgłoszenia** przygotowanych do publikacji artykułów **wraz z danymi do wystawienia faktury VAT** (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej) faksem (022) 841-29 49 lub drogą pocztową. Do zgłoszenia należy **dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego oraz ewentualnie kopię dowodu wpłaty.**

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z kopią potwierdzenia wpłaty lub zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.

**W przypadku nie przyjęcia** przez Redakcję do druku **pracy** zwrot opłaty wraz z korektą faktury dokonany będzie przez księgowość PTM.

---

## 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 suplementie 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, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

**Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:**

**1/2 strony 250,- zł**

**cała strona 500,- zł**

**Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.**

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

---

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

### 1. Sposób przygotowania manuskryptu.

#### 1.1. Tekst

Prace należy przysłać do Sekretariatu Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL na dyskietkach komputerowych (3,5" 1,44 MB), na płytach CD lub DVD. Do dyskietki powinny być dołączone 2 egz. tekstu artykułu całkowicie zgodnego z zapisem elektronicznym. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być jednostronny (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5), z numeracją stron. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy i spis treści należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Na oddzielnej stronie należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (red. Witold Doroszewski, Halina Kurkowska, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1998) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac, napisanych po angielsku.

#### 1.2. Ilustracje

Tabele i rysunki (po dwa egz., o rozmiarze nie przekraczającym 26,5 cm × 18 cm) winny być wykonane starannie (dokładne krycie) czarnym tuszem na kalce technicznej lub w formie wydruku z drukarki laserowej lub atramentowej. Fotografie (po dwa egz.) należy sporządzać na błyszczącym papierze, najlepiej w formacie 13 cm × 18 cm. Materiały te należy załączyć oddzielnie. Nie należy pozostawiać w maszynopisach wolnych miejsc na rysunki i zdjęcia, a tylko na kopii zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np. tab. 1, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załączyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą „objaśnienia w tekście”. Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

#### 1.3. Piśmiennictwo

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

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

Portnoy D. A., Sun A. N., Bielecki J. E., Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) *Microbial Adhesion and Invasion*, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer Verlag, New York, 1991, s. 86.

W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10, należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp. np.

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

(wyżej cytowana praca jest dziełem 42 autorów)

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

#### 1.3.1. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Cytowanie danych z sieci internetowej może jedynie dotyczyć informacji pochodzących z prac oryginalnych zamieszczanych w sieci przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Redakcja będzie również uznawać cytacje informacji ze źródeł autoryzowanych przez uznane w środowisku autorytetu z dziedziny nauk przyrodniczych. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania maszynopisu. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco:

14. XYZ Website 14 listopada 2004 roku (online), nazwisko wydawcy, jeśli jest znane, <http://cbx.iou.pgr>. (10 Października 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu). Cytowanie książek powinno zawierać szczegółowe dane o wydawnictwie. Cytacje prac oryginalnych przesyłanych poprzez sieć komputerową powinna zawierać następujące dane:

Nazwisko autora, inicjały imion, data przyjęcia pracy, tytuł pracy. Nazwa czasopisma, numer: strony (jeśli są dostępne) (online), adres internetowy, data potwierdzenia ważności adresu.

### 1.3.2. Elektroniczne wersje ilustracji

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* akceptuje ilustracje zachowane w formatach: TIFF, JPG lub EPS. Wszystkie grafiki należy przysyłać w 100% wymiarze bez konieczności skalowania. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Grafiki kolorowe należy zachowywać w formacie CMYK. Dane są przyjmowane na standardowych mediach takich jak dyskietki (3,5 cala), płyty CD lub DVD. Przesłane dyski lub dyskietki nie będą zwracane autorem. Zalecana przez redakcję kompresja informacji to **ZIP** lub **RAR**. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres jbielecki@biol.uw.edu.pl.

## 2. Prawo autorskie

W przypadku reprodukcji w pracy cudzych rysunków lub tabel – nawet w formie zmodyfikowanej – bądź cytowania fragmentów cudzego tekstu, Autorzy *Postępów Mikrobiologii* przed przysłaniem tych materiałów do Redakcji są zobowiązani do uzyskania pisemnej zgody od Autorów oryginalnych prac i Wydawnictwa (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk. Zaświadczenia wraz z informacją którego rysunku, tabeli lub cytatu dotyczą, należy przesłać wraz z manuskrytem przeznaczonej do publikacji pracy. Uprzejmie zawiadamiamy, iż Autorów PM obowiązuje składanie wraz z manuskrytem „Oświadczenia dotyczącego praw Autorskich” oraz „Oświadczenia dotyczącego konfliktów interesów”. Załączenie ww. dokumentów jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.

## 3. Zalecenia szczegółowe\*

### 3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją ASM – można znaleźć w **Instructions to Authors, J. Bacteriol. Jan. 1999**.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* („Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars” (M.Y. Popoff and L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and „Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme” (A.C. McWhorter-Murlin and F.W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki tj. *S. enterica* i *S. bongori* – pierwszy z nich podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie posiadające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp**, **typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem

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

(np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. sv. Typhimurium, bądź po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

### 3.2. Nomenklatura genetyczna

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

- Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol<sup>+</sup>); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol<sup>-</sup>). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (Str<sup>S</sup>).
- Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą (np. *ara*, *his*, *rps*). Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p*, *t* oraz *o* (np. *lacZp*, *lacZt*, *lacZo*; Bachman i Low; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56, 1980).
- Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie *plus* nad oznaczeniem genu np. *ara*<sup>+</sup>, *his*<sup>+</sup>, nie oznacza się natomiast zmutowanych alleli znakiem *minus*.
- Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawianie liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1*, *araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus, zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara-23*).
- Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami jak *plus*, dla typu dzikiego czy *minus* dla mutanta – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.
- Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. *his*<sub>*E.coli*</sub> lub *his*<sub>*K-12*</sub>. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; *glnA*<sub>1</sub> i *glnA*<sub>2</sub>.
- Delecję oznacza się symbolem, D usytuowanym przed zdelecjonowanym genem lub regionem np. *D trpA432*, *D (aroP-aceE)419*, lub *D his(dhuA hisJ hisQ)1256*. Fuzyj genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – *F (ara-lac)1256*. Podobnie *F (araB<sup>-</sup>-lacZ<sup>+</sup>)(Hyb)* oznacza, że fuzyja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco *IN (rrnD-rrnE)1*. Insercję genu *his E. coli* do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0kb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12hisB)4.

Oznaczenie obecności epizomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F'8(*gal*<sup>+</sup>).

### 3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:

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

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

### 3.4. Pisownia danych numerycznych

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

### 3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób  $^{14}\text{CO}_2$ ,  $^3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ . Taki sam sposób zapisu stosuje

się gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np.  $^{32}\text{S}$ -ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np.  $^{14}\text{C}$  aminokwasy,  $^3\text{H}$ -liganty itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [ $^{14}\text{C}$ ] mocznik, L-[metylo- $^{14}\text{C}$ ] metionina, [ $\text{g}^{-32}\text{P}$ ] ATP.

### 4. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi jeden egzemplarz pracy oraz dyskietkę w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w maszynopisie pracy po piśmiennictwie. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. W razie nie przyjęcia pracy do druku Redakcja zwraca dyskietkę oraz jeden egzemplarz wydruku, drugi zatrzymuje u siebie. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Autorzy otrzymują bezpłatnie 15 odbitek pracy. Za prace opublikowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie przewiduje się honorariów autorskich. Prace należy nadsyłać na adres sekretarza naukowego redakcji:

Dr Bohdan Jerzy Starościak  
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej  
Akademia Medyczna  
ul. Oczki 3  
02 - 007 Warszawa  
tel. (22) 628-08-22 lub 621-13-51

## Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1. ....  
(nazwisko/a i imię/ona autora/ów – proszę podkreślić autora korespondencyjnego)

Adres Autorów: .....

Tytuł pracy: .....

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

- (a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania rysunki oraz tabele, są oryginalne tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji.

.....  
(miejsce i data)

.....  
(podpis korespondencyjnego autora)

- (b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Autorów na reprodukcję rysunków nr:

.....  
zamieszczonych w\* .....

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Autorów na reprodukcję tabel nr: .....

zamieszczonych w\* .....

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Wydawnictwa na reprodukcję rysunków nr: .....

zamieszczonych w\*: .....

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Wydawnictwa na reprodukcję tabel nr: .....

zamieszczonych w\*: .....

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

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

tabel: ....., cytowanego tekstu: .....

.....  
(miejsce i data)

.....  
(podpis korespondencyjnego autora)



## Spis treści

Profesor dr hab. n. farm. Wanda Woźniak-Parnowska (1928–2007) .....	3
D. Kmieciak, S. Dębicki – Rola wirusa JC w patogenezie chorób nowotworowych i zaburzeń związanych z osłabieniem odporności .....	5
T. Dzieciatkowski, A. Rola, A. Midak-Siewirska – Adenowirusowe zakażenia ludzi .....	15
A. Reśliński, J. Kwiecińska, E. Gospodarek – Właściwości antyapoptyczne bakterii .....	23
I. Komaniecka, A. Choma – Peryplazmatyczne $\beta$ -glukany bakterii Gram-ujemnych .....	35
A. Mroziak, K. Hupert-Kocurek, B. Nowak, S. Łabużek – Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego i ich znaczenie w ochronie środowiska .....	43
A. Bednarczyk, E. G. Daczkowska-Kozon – Pathogenic features of bacteria from the <i>Bacillus cereus</i> group .....	51

## Publikacje metodyczne i standardy

K. B. Obrębska, A. Szczygła, M. Matejczyk – Skażenia mikrobiologiczne surowców i produktów kosmetycznych .....	65
Informacje, komunikaty, recenzje .....	73
Instrukcja dla autorów .....	75

## Contents

Professor Wanda Woźniak-Parnowska (1928–2007) .....	3
D. Kmieciak, S. Dębicki – Role of the JC virus in the pathogenesis of cancer diseases and disorders associated with compromised immunity .....	5
T. Dzieciatkowski, A. Rola, A. Midak-Siewirska – Adenoviral infections in humans .....	15
A. Reśliński, J. Kwiecińska, E. Gospodarek – Bacterial antiapoptotic properties .....	23
I. Komaniecka, A. Choma – Periplasmic $\beta$ -glucans of Gram-negative bacteria .....	35
A. Mroziak, K. Hupert-Kocurek, B. Nowak, S. Łabużek – Microbial lipases and their significance in the protection of the environment .....	43
A. Bednarczyk, E. G. Daczkowska-Kozon – Pathogenic features of bacteria from the <i>Bacillus cereus</i> group .....	51

## Methods and standards

K. B. Obrębska, A. Szczygła, M. Matejczyk – Microbiological contamination of raw materials and cosmetic products .....	65
Information, new reports, books reviews .....	73
Instruction to authors .....	75