

Kwartalnik

**Tom 50**

**Zeszyt 2•2011**

KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:

PMKMAV 50 (2)

2011

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Punktacja za publikację naukową wg MNiSW: 13.00 (2010)

Index Copernicus ICV = 9,00 (2010)

Impact Factor ISI = 0,108 (2010)

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

## RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), 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 (Warszawski Uniwersytet Medyczny),  
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),  
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),  
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), 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. (22) 554 13 05/304, fax (22) 554 14 04  
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

### Sekretarz

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

## 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: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.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  
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

### *Informacja o zdjęciu na okładce:*

Komórki *Bacillus subtilis* (BR-1-S) wnikające do komórki linii Int 407  
Fotografia: J. Wiśniewski – Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego

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

Nakład 1150 + 15 egz., Objętość 12 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk: *Zakład Wyd. Letter Quality*, tel. 22 631 45 18, 607 217 879,  
e-mail: letter.quality@neostrada.pl; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

## Prof. dr hab. Konrad Malicki – (1929–2011)



### Konrad Malicki – Wspomnienie

Prof. dr hab. Konrad Malicki urodził się 25 lutego 1929 roku w Grudziądzu. Lata dziecięce i młodość spędził w różnych miastach, co wynikało z częstych przeniesień służbowych ojca, Walentego Malickiego, który w latach 1928–1935, w randze kapitana, pełnił obowiązki kierownika Ambulatorium Weterynaryjnego w Centrum Wyszkozenia Kawalerii w Grudziądzu, następnie w latach 1935–1938 służył w 2 Pułku Artylerii ciężkiej (PAC) w Chełmie Lubelskim.

Od października 1939 do końca wojny przebywał w Kielcach, gdzie ukończył szkołę podstawową, a następnie kontynuował naukę na kompletach tajnego nauczania. W tym samym czasie uczestniczył w działalności konspiracyjnej – ZWZ i AK. W latach 1945–1947 ukończył Gimnazjum i Liceum im. Stefana Żeromskiego i uzyskał świadectwo dojrzałości. W okresie szkolnym Profesor Malicki uprawiał kilka dyscyplin lekkiej atletyki, gry zespołowe oraz ukończył kursy pilotażu szybowcowego i kurs spadochronowy.

Idąc w ślady ojca podjął studia wyższe w zakresie medycyny weterynaryjnej, które odbył w latach 1947–1951 na Uniwersytecie Warszawskim. Dyplom i tytuł zawodowy lekarza weterynarii uzyskał w roku 1952, już po przyłączeniu warszawskiego wydziału weterynaryjnego do SGGW. Jeszcze podczas studiów zatrudniony był jako asystent na Wydziale Weterynaryjnym SGGW, w Katedrze Mikrobiologii. W latach 1947–1949 był członkiem

członkiem Bratniej Pomocy Uniwersytetu Warszawskiego i uczestniczył w działalności sekcji wydawniczej. Na podstawie wykładów Profesora Kazimierza Krysiaka, wraz z kolegami opracował pierwszy powojenny skrypt z anatomii prawidłowej, odbity w 127 egzemplarzach na powielaczu spirytusowym. W roku 1949 rozpoczął pracę w Kole Naukowym Medyków Weterynaryjnych, a w marcu 1950 roku, będąc studentem III roku studiów, podjął obowiązki wolontariusza w Zakładzie Bakteriologii Wydziału Weterynaryjnego UW, późniejszej Katedry Mikrobiologii. Uczestniczył w tym czasie w badaniach prowadzonych przez prof. dr hab. Juliusza Brilla i ówczesną adiunkt dr Stanisławę Woyciechowską, nad wirusowym ronieniem klaczy. Z dniem 1 października 1950 roku, uzyskał pierwsze zatrudnienie etatowe, na stanowisku zastępcy asystenta w wymienionym Zakładzie.

Profesor Konrad Malicki przeszedł wszystkie etapy kariery naukowej nauczyciela akademickiego, uzyskując w macierzystej placówce stopnie naukowe: doktora nauk weterynaryjnych w 1964 roku, doktora habilitowanego nauk weterynaryjnych w zakresie wirusologii w 1967 roku, a także tytuły i stanowiska: docenta w 1968 roku, profesora nadzwyczajnego w 1979 roku i profesora zwyczajnego SGGW w 1992 roku. W latach 1970–1975 pełnił przez dwie kadencje obowiązki zastępcy dyrektora Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, a w latach 1976–1981 był dyrektorem tego Instytutu. W roku 1976 zrealizował plany swoich poprzedników i stworzył Zakład Wirusologii, którym kierował do czasu przejścia na emeryturę w 1999 roku.

W latach 1964/65 Profesor Malicki uzyskał roczne stypendium habilitacyjne Fundacji im. A. von Humboldta (1964/65) i w Instytucie Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych Zwierząt Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium kontynuował rozpoczęte w Polsce prace doświadczalne dotyczące wirusa ospy.

W roku 1972 zainicjował i przez kilka lat wraz z zespołem prowadził kompleksowe badania doświadczalne dotyczące wirusa choroby pęcherzykowej świń, objęte kryptonimem P-3. Ich efektem było uzyskanie na skalę laboratoryjną dwóch swoistych szczepionek profilaktycznych (żywej atenuowanej oraz inaktywowanej).

W tym samym okresie przez kilka kolejnych kadencji powoływany był na członka Komitetu Mikrobiologii II Wydziału PAN, a w Polskim Towarzystwie Mikrobiologów, pełnił funkcję przewodniczącego Krajowego Zarządu Sekcji Wirusologicznej.

U schyłku lat 70., wraz z zespołem badawczym Zakładu Wirusologii i Katedry patologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, Profesor Malicki podjął eksperymentalną tematykę badawczą dotyczącą enterotropowych i enteropatogennych wirusów prosiąt i cieląt (rotawirusy, koronawirusy, kalciwirusy i inne), zjawisk wirusowej patogeny na poziomie ultrastruktury komórek oraz wirusowej morfogenezy, z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej i immunoelektronomikroskopii (EM, IEM).

Prócz nowej tematyki, Profesor przez wiele lat kontynuował w Zakładzie Wirusologii tradycyjne tematy badawcze jego poprzedników, dotyczące diagnostyki i profilaktyki zakaźnego wirusowego ronienia klaczy, diagnostyki grypy koni, oraz osobiste zainteresowania zagadnieniami taksonomii i nomenklatury wirusologicznej.

W latach 1988–1989, przez 15 miesięcy uczestniczył w realizacji programu UNDP-FAO (United Nations Development Program FAO – MOZ/86-028), dotyczącym rozwoju obszaru mikrobiologii weterynaryjnej w Uniwersytecie im. Eduardo Mondlane w Maputo (Mozambik).

Dorobek naukowy Jego ponad 50-letniej działalności badawczej i wyraża się liczbą około 120 różnych opracowań naukowych, w tym około 50 prac badawczych, które ukazały się w czasopiśmie krajowych i zagranicznych, 12 opracowań mnograficznych i dydaktycznych (skrypty, przewodniki do ćwiczeń, rozdziały książek, i podręczników), w tym współautorstwo i współredakcja podręczników „Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej” tom I i tom II. Ponadto Pan Profesor Konrad Malicki był promotorem 8 rozpraw doktorskich.

Z Panem Profesorem Konradem Malickim zetknąłem się w roku akademickim 1975/76, kiedy przysze-

dłem na pierwsze zajęcia z mikrobiologii weterynaryjnej. Pan Profesor potrafił mówić bardzo ciekawie i od samego początku poczułem, że „to jest to”. Prawdziwe jednak zainteresowanie przyszło po pierwszym wykładzie z wirusologii i wtedy już bez wahania, pod koniec drugiego roku studiów, podjąłem, pod okiem Pana Profesora, pracę w Kole Naukowym. I tak zostało – po uzyskaniu dyplomu – długie lata współpracy w Zakładzie Wirusologii. Pierwsze sukcesy i porażki, długie godziny spędzone na doglądaniu zwierząt doświadczalnych i pracy przy stole laboratoryjnym. Spotkania całego Zespołu podczas przerwy śniadaniowej wypełnione były rozmowami, a Pan Profesor często opowiadał o czasach studenckich i zainteresowaniu anatomią, o początkach swojej pracy w Katedrze Mikrobiologii i różnych wydarzeniach z jej działalności. Te rozmowy, nawiązujące do historii, wyrobiły w nas poczucie ciągłości Zakładu Wirusologii już od czasów Rudolfa Weigla, którego portret, wraz z portretami Pani Profesor Woyciechowskiej i Pana Profesora Brilla, do dziś wisi na ścianie laboratorium. To dzięki Panu Profesorowi pieczołowicie przechowujemy cenne pamiątki po naszych poprzednikach, zarówno te materialne, jak muzealny zestaw do hodowli wszy, jak i te ulotne, przekazywane w postaci opowiadań i anegdot.

To dzięki Panu Profesorowi przeżyłem wielką przygodę z wirusologią i chciałbym Mu za to ostatni raz podziękować.

Warszawa, 28 kwietnia 2011 r.

*Marcin Bańbura*

\* \* \*

Z głębokim smutkiem przyjęliśmy wiadomość o śmierci prof. dr hab. nauk weterynaryjnych Konrada Malickiego. Prof. Konrad Malicki był w latach 1991–2005 członkiem Rady Redakcyjnej *Postępów Mikrobiologii*, recenzentem wielu nadsyłanych do naszego czasopisma prac z zakresu wirusologii oraz jednym z naszych Autorów.

*Redakcja  
Postępów Mikrobiologii*

### mgr Jarosław Marek Wiśniewski (1964 – 2011)



**Jarosław Marek Wiśniewski**  
– Wspomnienie

W dniu 20 kwietnia 2011 r. zmarł Jarosław Marek Wiśniewski, mikrobiolog, dla wielu z nas – po prostu Jarek. Odszedł zdecydowanie za wcześnie, w pełni sił zawodowych, współprowadząc wiele rozpoczętych projektów i planując kolejne.

Jarek urodził się w 1964 roku we Włocławku. Tam się wychował i tam zdał maturę aby następnie podjąć studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Swoje zamiłowanie do biologii rozwinął już w okresie szkolnym, czego wyrazem był Jego udział w ogólnopolskich zawodach III Olimpiady Biologicznej, na których zdobył srebrną odznakę. Studia ukończył w 1989 roku obroną pracy magisterskiej pt. „Identyfikacja białek błony zewnętrznej w kilku gatunkach *Yersinia*”. Wkrótce potem, Jarek, jako młody magister, został pracownikiem Zakładu Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii UW. Z ogromną pasją wykonywał zadania badawcze Zakładu, koncentrujące się głównie na analizie mechanizmów patogenezы bakterii z rodzaju *Listeria* oraz *Yersinia*. Od 1993 roku, po powrocie ze stażu naukowego w USA (School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia), podjął intensywne badania nad patogenami bakteryjnymi pod kątem ich

zastosowania w opracowaniu szczepionek najnowszej generacji. W ramach tej pracy stał się naszym zakładowym „ekspertem” od hodowli tkankowych i technik mikroskopowania.

Jarek był też świetnym dydaktykiem. Każdego roku kształcił liczne grupy studenckie sprawował opiekę naukową nad dyplomantami. Jego dynamiczny, nowoczesny, pozbawiony akademickiej sztywności styl prowadzenia zajęć zjednał mu sympatię wielu studentów. W swojej pracy ze studentami, a także kolegami „po fachu” był zawsze otwarty i życzliwy. Każdemu służył radą i pomocną dłońią.

Entuzjazm i zaangażowanie w pracy naukowej doskonale łączył z popularyzacją nauki. Na drzwiach Jego pokoju w Zakładzie pojawił się sporządzony przez studentów, żartobliwy napis „Gwiazda TV”. I rzeczywiście Jarek był „gwiazdą” Telewizji Akademickiej, jako popularyzator nauki. Zrealizowany przez niego cykl wykładów i seminariów poświęconych mikrobiologii cieszył się wielkim zainteresowaniem wśród studentów. Mikrobiologię Jarek popularyzował także poprzez aktywność publikacyjną, będąc autorem licznych artykułów przeglądowych i monografii. Ostatnia praca Jarka, którą napisał, poświęcona była sylwetce Roberta Kocha, w setną rocznicę urodzin odkrywcy prątką gruźlicy. Artykuł ten, który ukazał się w czasopiśmie *Kosmos* w maju ub. r. stał się jednym z najlepszych polskojęzycznych opracowań monograficznych na temat tego wielkiego mikrobiologa, jakie kiedykolwiek o nim napisano. SeminaRIA, które prowadził w różnych ośrodkach naukowych w całym kraju były zawsze starannie przygotowane i były dla ich słuchaczy prawdziwą przyjemnością, ucztą wiedzy i humoru.

Jarek był ogromnie oddany pracy zawodowej i społecznej. Uniwersytet Warszawski był dla Niego jak drugi dom; był wyjątkowo wierny swojej Alma Mater. To co Jego wyróżniało to pewien rodzaj pozytywnego uporu, konsekwencji w dążeniu do obranego przez siebie celu. Pamiętam jak na znalezienie zdjęcia, przedstawiającego proces wnikania bakterii do komórki eukariotycznej (ostatnia praca Jarka, która zdobi okładkę naszego pisma) Jarek poświęcił kilka miesięcy. Wykonał i obejrzał parę tysięcy zdjęć, aby wybrać to jedno właśnie, które najbardziej Go satysfakcjonuje.



Pasja i ogromny talent Jarka do robienia wspaniałych fotografii nie ograniczała się do zdjęć mikroskopowych, ale również świata zauważalnego gołym okiem. Fotografia zawsze była jego hobby, które doprowadził do profesjonalnej perfekcji. Zamiłowanie Jarka do robienia oryginalnych zdjęć ściśle współgrało z ciekawością świata i podróżami. Obie te pasje zaprowadziły Go w najodleglejsze zakątki świata i podmorskie głębiny, dlatego na Jego zdjęciach można podziwiać wiele niezwykłych okazów flory i fauny.

Jarek był też instytutowym „guru” w zakresie wiedzy informatycznej. To On uczył nas podstaw pracy z komputerami. Czuwał jak dobry duch nad naszymi „łączami ze światem”. Jego zaangażowanie na polu informatyki miało i nadal ma dla nas wymierne korzyści. To właśnie Jarek organizował i prowadził jako „webmaster” strony

internetowe na Wydziale Biologii i w Polskim Towarzystwie Mikrobiologów (którego był wieloletnim członkiem).

Jarek kochał swoją pracę, w niej potrafił rozwiązywać najtrudniejsze problemy. Zawsze pełen pomysłów, niespożytej energii, nigdy się nie poddawał. Dlatego tym bardziej nie możemy zrozumieć co się stało. Jak to możliwe, że już nigdy nie przyjdzie uśmiechnięty do naszego Zakładu i nie opowie o najświeższych technicznych nowinkach?

Jarku, choć Cię z nami już nie ma, zostaniesz na zawsze na kartach naszych wspólnych artykułów, w autorских stopkach pięknych mikrofotografii, ale przede wszystkim w naszej wdzięcznej, koleżeńskej pamięci.

*Jacek Bielecki  
oraz członkowie „Listeria Team”*

\* \* \*

Z głębokim smutkiem donosimy, iż 20 kwietnia 2011 roku zmarł niespodziewanie nasz najbliższy współpracownik i przyjaciel mgr Jarosław Marek Wiśniewski.

Śp. J.M. Wiśniewski był projektantem oraz współtwórcą strony internetowej *Postępów Mikrobiologii*, jak również witryny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Od wielu lat sprawował opiekę nad elektronicznymi wydawnictwami PTM. Był autorem zdjęć reprodukowanych na okładkach *Postępów Mikrobiologii* – pożegnał się z nami oddając do ostatniego zeszytu, chyba najlepszą swoją pracę. Zawsze żywo interesował się nowościami w takich dziedzinach jak mikrobiologia, biotechnologia oraz informatyka.

Jarku brak nam będzie Twoich mądrych rad i Twojego optymizmu.

*Jerzy Hrebenda i Koledzy z Redakcji*

Łukasz Dziewit<sup>\*1</sup>, Dariusz Bartosik<sup>1</sup>

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa, Polska

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Wielkość genomów prokariotycznych. 3. Organizacja strukturalna genomów prokariotycznych. 3.1. Genomy zawierające plazmidy. 3.2. Genomy wielochromosomowe. 4. Informacja genetyczna w genomach prokariotycznych. 4.1. Sekwencje kodujące białka. 4.2. Sekwencje kodujące RNA. 4.3. Pseudogeny. 4.4. Sekwencje repetytywne. 4.5. Ruchome elementy genetyczne zintegrowane z genomowym DNA. 5. Minimalny genom i pangenom. 6. Ewolucja genomów prokariotycznych. 7. Podsumowanie

### Prokaryotic genomes in the light of genomic analyses

**Abstract:** Genomic analyses revealed that prokaryotic genomes are very diverse. They differ in size, architecture and genetic information which they encode. The plasticity of the genomes is the result of several factors, including (i) horizontal gene transfer (responsible for the acquisition of exogenous DNA), (ii) genetic rearrangements (resulting from diverse recombinational events), and (iii) genome reduction, which leads to the loss of genetic information of a low adaptive value. The insertions and deletions of DNA permanently alter the genomes and result in adaptation of the microorganisms to their specific environments by genome optimization. For this reason we observe a straight correlation between metabolic versatility of prokaryotes and the size of their genomes.

1. Introduction. 2. Size of prokaryotic genomes. 3. Structural organization of prokaryotic genomes. 3.1. Genomes containing plasmids. 3.2. Multichromosomal genomes. 4. Genetic information within prokaryotic genomes. 4.1. Protein encoding sequences. 4.2. RNA encoding sequences. 4.3. Pseudogenes. 4.4. Repeated sequences. 4.5. Mobile genetic elements integrated in genomic DNA. 5. Minimal genome and pangenomes. 6. Evolution of prokaryotic genomes. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** genom, horyzontalny transfer genów, pangenom, plazmid  
**Key words:** genome, horizontal gene transfer, pangenome, plasmid

## 1. Wstęp

Odczytanie sekwencji nukleotydowej genomu bakterii *Haemophilus influenzae* Rd KW20, zapoczątkowało w 1995 roku [14] erę genomiki prokariotów. Od tego czasu obserwuje się coraz bardziej dynamiczny rozwój tej dziedziny badań, szczególnie zintensyfikowany w ostatnich latach dzięki opracowaniu i wprowadzaniu nowych technik sekwencjonowania DNA. Według informacji zawartych w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI), odczytano dotychczas kompletne sekwencje nukleotydowe genomów 1279 szczepów bakterii oraz 93 przedstawicieli *Archaea*. Co więcej, kolejnych 3 531 projektów genomicznych bakterii i 83 archeonów jest obecnie w trakcie realizacji (dane z 13.12.2010). Najwięcej danych zgromadzono dotąd o genomach szczepów bakterii zaliczanych do typów: *Proteobacteria* (607 zsekwencjonowanych genomów), *Firmicutes* (317), *Actinobacteria* (123) oraz *Cyanobacteria* (41).

Oprócz kompleksowych badań kompletnych genomów prokariotycznych realizowane są również projekty, których celem jest poznanie sekwencji jedynie mniejszych replikonów, tj. bakteriofagów i plazmidów. Do momentu zakończenia przygotowywania manuskryptu

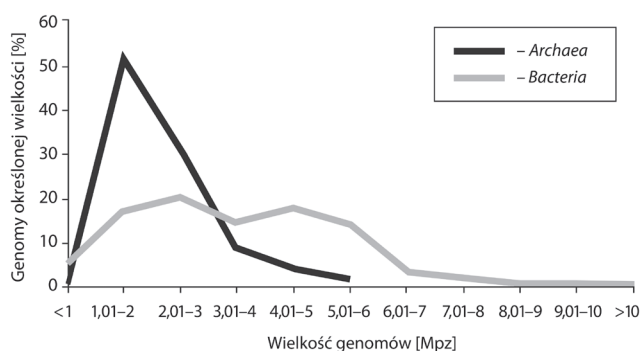
tej pracy poznano kompletne sekwencje 2 155 plazmidów bakteryjnych, 100 plazmidów archeonów oraz 595 bakteriofagów (NCBI).

Analiza tak olbrzymiej puli danych uświadomiła badaczom, że genomy są bardzo zróżnicowane, zarówno pod względem (i) wielkości, (ii) organizacji strukturalnej, jak i (iii) rodzaju niesionej informacji genetycznej. Zmienność ta jest wypadkową wielu procesów, m.in. wprowadzania do komórki nowej, egzogennej informacji genetycznej w wyniku horyzontalnego transferu genów (HGT – horizontal gene transfer), jak i różnego typu rekombinacji, które mogą powodować rozległe zmiany w strukturze DNA (np. delecje, translokacje, inwersje bądź duplikacje).

## 2. Wielkość genomów prokariotycznych

Wielkość genomów prokariotycznych jest bardzo zróżnicowana. Genomy archeonów mają dość kompaktową strukturę. Ich rozmiary zawierają się w przedziale od 0,49 Mbp do 5,75 Mbp, przy czym ponad połowa z nich liczy około 2 Mbp. Rozpiętość wielkości genomów bakteryjnych jest znacznie większa. Znane bakterie,

<sup>\*</sup> **Autor korespondencyjny:** Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa; tel: (22) 554 13 44; fax: (22) 554 14 02; e-mail: ldziewit@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Zróżnicowanie wielkości genomów *Archaea* i *Bacteria*, wg [21], (zmodyfikowany)

Powyższe zestawienie wykonano w oparciu o dane zamieszczone do dnia 1 grudnia 2010 w bazie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

których genomy nie przekraczają 0,2 Mpz, jak również prawdziwego „giganta” świata bakteryjnego, którego genom (13 Mpz) jest ponad 65 razy większy. Jednak wielkość genomów zdecydowanej większości bakterii (70%) plasuje się w zakresie od 2 do 5 Mpz (rys. 1).

Najmniejsze genomy wśród mikroorganizmów prokariotycznych mają obligatoryjne symbionty i pasożyty. Przyczyną tego jest stopniowa redukcja ich genomów, która jest wynikiem: (i) generowania większej liczby delecji niż insercji (co jest spowodowane m.in. ograniczeniem zakresu wprowadzania egzogennej DNA w wyniku horyzontalnego transferu genów) oraz (ii) utraty genów warunkujących biosyntezę związków, które są dostarczone przez gospodarza. W konsekwencji, z genomów symbiontów i pasożytów eliminowane są geny umożliwiające im przeżycie poza organizmem gospodarza, co jednocześnie czyni stan symbiozy lub pasożytnictwa, obligatoryjnym [29].

Najmniejszy genom wśród archeonów ma *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M, obligatoryjny symbiont innego archeona – *Ignicoccus hospitalis* KIN4/I, który jest hipertermofilnym chemolitoautotrofem [33]. Pojedynczy, kolisty chromosom *N. equitans*, o wielkości 490 885 pz, koduje jedynie 540 białek. Archeon ten nie posiada większości genów umożliwiających syntezę *de novo*: aminokwasów, lipidów, kofaktorów i nukleotydów (które są dostarczane przez gospodarza), może on jednak przeprowadzać proteolizę białek i deaminację aminokwasów z uwolnieniem amoniaku. Stwierdzono, że *N. equitans*, po osiągnięciu odpowiedniej liczebności hamuje wzrost *I. hospitalis*, co może sugerować, że archeon ten nie jest symbiontem, lecz pasożytem swego gospodarza [45].

Najmniejszy z poznanych do tej pory genomów bakteryjnych (143 795 pz) występuje u „*Candidatus Hodgkinia cicadicola*” Dsem (*Alphaproteobacteria*). Bakteria ta jest obligatoryjnym endosymbiontem cykady *Diceroprocta semicincta*. Jej genom koduje zaledwie 169 białek oraz 19 strukturalnych RNA, a w przeciwieństwie do innych symbiontów prokariotycznych,

charakteryzuje się dość dużą zawartością par GC w sekwencji nukleotydowej (58,4%).

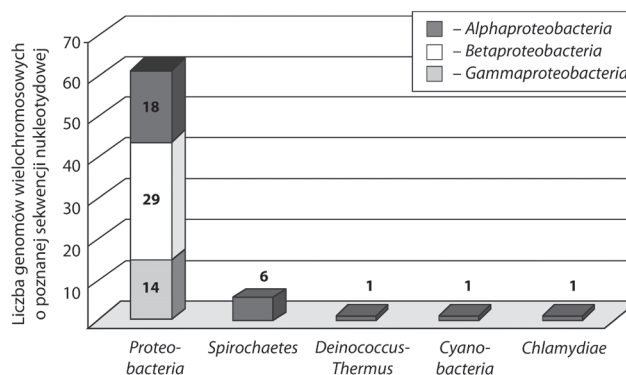
Z kolei, najmniejsze genomy wśród wolno żyjących mikroorganizmów prokariotycznych mają odpowiednio: (i) wspomniany wyżej archeon – *Ignicoccus hospitalis* KIN4/I – 1 297 538 pz [33] oraz (ii) bakteria należąca do klasy *Alphaproteobacteria* – „*Candidatus Pelagibacter ubique*” HTCC 1062 – 1 308 759 pz [19]. Na drugim końcu skali znajduje się bakteria glebowa *Sorangium cellulosum* ‘So ce 56’ (*Deltaproteobacteria*), której genom (13 033 799 pz) jest o około 10% większy od chromosomu *Saccharomyces cerevisiae* S288c (12 Mpz). Genom tej bakterii składa się z pojedynczego, kolistego chromosomu, w obrębie którego zidentyfikowano 9 381 genów kodujących m.in. białka zaangażowane w syntezę wielu metabolitów wtórnych, np. barwników karotenoidowych oraz różnorodnych substancji cytotoksycznych [36].

### 3. Organizacja strukturalna genomów prokariotycznych

Ponieważ pierwsze poznane genomy bakteryjne (*H. influenzae*, *E. coli*) zawierały pojedynczy, kolisty chromosom, dość długo błędnie uważano, że jest to typowe dla chromosomów wszystkich bakterii. Okazało się jednak, że w wielu przypadkach genomy mają strukturę wieloreplikonową, składają się bowiem z dwóch, bądź trzech różnych chromosomów, wśród których spotyka się też replikony o strukturze liniowej (rys. 2). Ważną częścią wielu genomów są również plazmidy, których wielkość może niekiedy przekraczać rozmiary pewnych chromosomów.

#### 3.1. Genomy zawierające plazmidy

Plazmidy są to pozachromosomowe, kolisty lub liniowe cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej replikacji. Występują one powszechnie w bardzo wielu



Rys. 2. Występowanie genomów wielochromosomowych u bakterii. Powyższe zestawienie wykonano w oparciu o dane zamieszczone do dnia 1 grudnia 2010 w bazie NCBI.



organizmach prokariotycznych, a także u niektórych eukariotów. Analiza poznanych dotąd genomów wskazuje, że ok. 20% archeonów i 36% bakterii niesie co najmniej jeden plazmid.

Plazmidy, choć zwykle nie są niezbędne dla swoich gospodarzy (nie noszą kluczowych genów metabolizmu podstawowego – house keeping genes), odgrywają ważną rolę w ewolucji prokariotów, umożliwiając bowiem wprowadzanie do komórki puli egzogennej DNA, w drodze horyzontalnego transferu genów. Wiele z nich niesie informację genetyczną warunkującą różnorodne cechy fenotypowe (np. oporność na antybiotyki bądź jony metali ciężkich, czy też zdolność do wykorzystywania trudno przyswajalnych źródeł węgla), które w określonych warunkach środowiska mogą zapewnić przewagę gospodarzowi w konkurencji z innymi mikroorganizmami zasiedlającymi tę samą niszę ekologiczną.

Wśród archeonów najwięcej plazmidów, bo aż siedem, zidentyfikowano w genomie *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 [1], zaliczanego do rodziny *Halobacteriaceae*. W halofilnych archeonach z tej rodziny występuje niemal połowa wszystkich poznanych dotąd plazmidów *Archaea*. Wykryto tam również najmniejszy oraz największy zidentyfikowany dotąd plazmid archeonów, odpowiednio: (i) pZMX201 (1 668 pz) z *Natri-nema* sp. CX2021, który zawiera tylko jeden gen oraz (ii) pHLAC01 (413 338 bp) z *Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 niosący aż 402 geny.

W przypadku bakterii, prawdziwym rekordzistą pod względem liczby niesionych plazmidów, jest znany patogen *Borrelia burgdorferi* B31, wywołujący boreliozę. W bakterii tej występuje aż dwadzieścia jeden plazmidów, z których dwanaście ma strukturę liniową. Łączna wielkość tych replikonów wynosi około 533 kpz, podczas gdy liniowy chromosom szczepu B31 ma za ledwie 911 kpz. Plazmidy te noszą niemal 50% wszystkich genów *B. burgdorferi* B31 (rys. 3). Przypuszcza

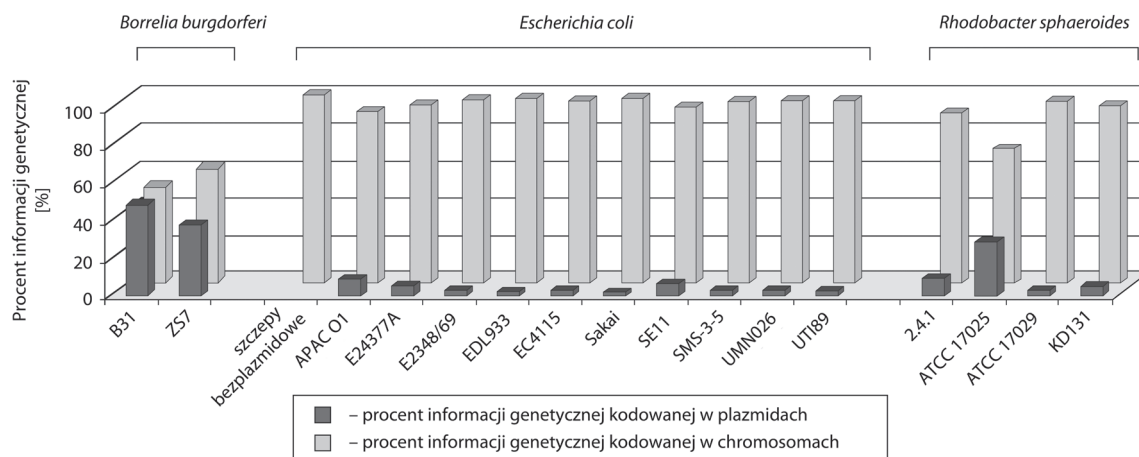
się, że wiele z tych genów może kodować białka odpowiedzialne za wirulencję, w tym za zmienność antygenów powierzchniowych [15]. Co ciekawe, w jednym z plazmidów tego szczepu (cp26; 26,5 kpz) zidentyfikowano gen kodujący resolwazę telomerów – enzym zaangażowany w proces replikacji liniowego chromosomu [6]. Plazmidy tego typu, zawierające pojedyncze, niezbędne dla bakterii geny metabolizmu podstawowego pochodzenia chromosomowego, określa się jako *essential genetic elements*, a więc można je nazwać „niezbędnikami”.

Największym poznany dotąd plazmidem jest pNGR234b (2 430 033 pz) pochodzący z *Rhizobium* sp. NGR234 (*Alphaproteobacteria*). Choć plazmid ten niesie ponad 35% genów szczepu NGR234, to jednak nie jest on „niezbędnikiem”, gdyż nie zawiera unikalnych genów metabolizmu podstawowego. Niemniej jednak koduje on wiele systemów transportu (ponad 50% transporterów tego szczepu, głównie typu ABC) oraz potencjalne elementy transpozycyjne (ok. 40% całkowitej puli transpozonów zidentyfikowanych w szczepie NGR234), co sugeruje zarówno obecność genów o charakterze adaptacyjnym, jak i duży potencjał rekombinogeny tego replikonu [35].

U bakterii przeważają jednak znacznie mniejsze plazmidy. Najmniejsze z nich to pRKU1 i pRQ7 (oba o wielkości 846 pz), które zidentyfikowano, odpowiednio, w *Thermotoga petrophila* RKU-1 oraz *Thermotoga* sp. RQ7. Są one niemal identyczne i zawierają tylko jeden gen – kodujący białko replikacyjne.

### 3.2. Genomy wielochromosomowe

Jak wynika z danych zamieszczonych w bazie NCBI, poznano dotąd 70 genomów bakteryjnych, w skład których wchodzi dwa lub trzy chromosomy. W większości (ponad 80%) genomy takie występują u przedstawicieli



Rys. 3. Dystrybucja sekwencji kodujących białka w plazmidach i chromosomach szczepów wybranych gatunków bakterii. Powyższe zestawienie wykonano w oparciu o dane zamieszczone do dnia 1 grudnia 2010 w bazie NCBI.

typu *Proteobacteria*, głównie z klasy *Betaproteobacteria* (rys. 2). Z kolei wśród *Archaea*, jedynie *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 (halofilny archeon wyizolowany z Morza Martwego) oraz (ii) *Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 (psychrofilny halofil wyizolowany na Antarktydzie) posiadają dwa chromosomy [1].

Analiza informacji genetycznej zawartej w genomach wielochromosomowych wskazuje, że chromosomy nie są równocenne, można bowiem wyróżnić wśród nich: (i) chromosom główny (oznaczany jako chromosom 1), który zawiera zasadniczą część genów metabolizmu podstawowego, rozmieszczonych równomiernie w całym replikonie oraz (ii) chromosom (bądź chromosomy) dodatkowy (secondary chromosomes), niosący zazwyczaj mniejszą pulę genów metabolizmu podstawowego, skupionych w obrębie stosunkowo niewielkich segmentów DNA. W chromosomach tych spotyka się charakterystyczne dla plazmidów systemy replikacyjne (np. replikony typu *repABC* występujące często w bakteriach z klasy *Alphaproteobacteria*) oraz geny o charakterze adaptacyjnym, które zazwyczaj sprzężone są z plazmidami. Obserwacje te sugerują, że drugi i kolejne chromosomy powstają prawdopodobnie z protoplasty plazmidowego, na skutek wewnątrzkomórkowego transferu genów z pierwszego chromosomu [38]. Wyniki analiz bioinformatycznych sekwencji genomów bakterii należących do rzędu *Rhizobiales* potwierdzają tę hipotezę, wskazując jednocześnie, że plazmidy (protoplasty chromosomów) ulegały wielu zmianom w wyniku kolejnych duplikacji, delecji, a także insercji segmentów DNA wprowadzanych w horyzontalnym transferze genów [3].

Istnieją także inne możliwości pojawiania się dodatkowych chromosomów, takie jak (i) defektywny rozdział chromosomów po replikacji, (ii) defektywny rozdział kointegratów chromosomów utworzonych w wyniku różnego typu rekombinacji – homologicznej, specyficznej wobec miejsca bądź transpozycji oraz (iii) kumulacji mutacji punktowych w chromosomie występującym w komórce w wielu kopiach.

Sugeruje się, że wspólny przodek wielu współczesnych bakterii posiadał zapewne pojedynczy chromosom, zaś stopniowe zmiany, zachodzące na zasadzie przypadkowych rekombinacji, doprowadziły do obserwowanej obecnie różnorodności w architekturze genomów bakteryjnych [42].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że bakterie posiadające złożone genomy charakteryzuje bardzo plastyczny metabolizm. Doskonale radzą sobie one w środowiskach otwartych, a także mogą wchodzić w interakcje z innymi organizmami. Przykładowo, bakterie z rodzajów *Agrobacterium* oraz *Brucella* są patogenami (odpowiednio roślin i zwierząt), a z rodzaju *Rhizobium* – symbiontami roślin motylkowych. Występowanie złożonego genomu może być korzystne dla organizmów żyjących

w zmiennych warunkach środowiska, bowiem genom taki szybciej ulega replikacji (co skraca czas generacji), ponadto łatwiej ulega różnym rearanżacjom strukturalnym, co z kolei może pociągać za sobą pojawienie się nowych cech o charakterze adaptacyjnym [13]. Przyjmuje się również, że kolejne chromosomy stają się miejscem akumulacji nowej informacji genetycznej wówczas, gdy pojemność kodująca pierwszego chromosomu osiągnęła maksimum [38].

#### 4. Informacja genetyczna w genomach prokariotycznych

Podstawowy etap projektów genomicznych zakłada przeprowadzenie szczegółowych analiz sekwencji nukleotydowych w celu zdefiniowania występującej w nich informacji genetycznej. Konieczna jest zatem (i) identyfikacja i charakterystyka sekwencji kodujących białka i cząsteczki RNA, (ii) wyróżnienie pseudogenów oraz (iii) sekwencji repetytywnych, a także (iv) zdefiniowanie innych składowych, w tym ruchomych elementów genetycznych, z których wiele występuje w formie zintegrowanej z genomowym DNA.

##### 4.1. Sekwencje kodujące białka

Genomy bakterii i archeonów mają kompaktową strukturę, bowiem kodują maksymalną ilość informacji genetycznej w obrębie jak najmniejszego regionu DNA. Zagęszczenie sekwencji kodujących (w przeliczeniu na 1 kbp genomowego DNA) wynosi od 0,8 do 1,2 genu, przy średniej długości pojedynczego genu wynoszącej około 1 kbp [21].

Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych 573 szczepów bakterii stwierdzono, że przeciętny genom składa się z 3053 genów, wśród których można wyróżnić: (i) geny stanowiące konserwowany rdzeń genomów, (ii) geny nadające cechy charakterystyczne danemu gatunkowi oraz (iii) geny dodatkowe. Geny konserwowanego rdzenia należą do prawie 250 rodzin genów i stanowią około 8% każdego genomu bakteryjnego, niezależnie od gatunku. Kodują one białka zaangażowane w translację, replikację i zachowanie równowagi energetycznej – są to zatem geny metabolizmu podstawowego. Znajdują się one stale pod wpływem presji selekcyjnej, bowiem ich inaktywacja wywołuje efekt letalny. Geny nadające cechy charakterystyczne danemu gatunkowi stanowią około 64% przeciętnego genomu bakteryjnego i zalicza się je do prawie 7900 rodzin. Z kolei geny zaliczane do ostatniej kategorii (zajmują około 28% genomu) stanowią niezwykle różnorodną pulę, w której spotyka się reprezentantów aż około 140 000 rodzin. Postuluje się, że stanowią one swoisty rezerwuar sekwencji kodujących białka o nieznanym

funkcji, z których wiele może pełnić ważną rolę w specyficznych warunkach środowiska [2, 22].

Kompleksowe analizy z zakresu genomiki porównawczej pozwoliły wyróżnić grupy genów ortologicznych (COG – cluster of ortholog genes), pochodzących od wspólnego przodka [20]. Obecność ortologów w genomach różnych gatunków prokariotów nie jest jednak jednoznaczna z filogenetycznym pokrewieństwem tych organizmów, geny te mogą być bowiem wprowadzane do różnych gospodarzy w drodze horyzontalnego transferu genów. Okazało się, że przeciętnie około 80% genów w danym genomie należy do znanych grup ortologów, a tym samym wykazuje pokrewieństwo z innymi genami [21].

W obrębie genomów bakterii i archeonów zidentyfikowano również wiele potencjalnych genów, które kodują białka niewykazujące znaczącego podobieństwa sekwencji aminokwasowej do poznanych dotąd białek. Białka te określane są w bazach danych jako „hipotetyczne białka o nieznannej funkcji”, a ich potencjalne geny noszą angielskie nazwy ORFans lub ELFs (evil little fellows). Te „hipotetyczne geny” stanowią nawet do 15% całkowitej puli genowej organizmów prokariotycznych i zaliczane są do puli genów rzadko spotykanych, które nie zostały dotąd zaklasyfikowane do żadnej z grup ortologów. Niekiedy postuluje się ich fagowe pochodzenie, co w świetle wciąż dość słabo rozwiniętej genomiki bakteriofagów, mogłoby tłumaczyć brak zidentyfikowanych homologów [21]. Nie można też wykluczyć, że przynajmniej część z nich jest wynikiem błędów popełnianych podczas adnotacji sekwencji nukleotydowych [31].

#### 4.2. Sekwencje kodujące RNA

Analizując długość regionów międzygenowych u *Archaea* i *Bacteria*, uzyskujemy wartości bimodalne, osiągające maksima dla: (i) około 0 pz (głównie w przypadku operonów, gdzie poszczególne geny zachodzą na siebie) oraz (ii) około 100 pz (dla regionów położonych między operonami) [21]. Duże regiony międzygenowe, o wielkości przekraczającej 1 000 pz, kodują tzw. funkcjonalny RNA lub mogą zawierać pseudogeny.

Do funkcjonalnego RNA zaliczamy: (i) transportujący RNA (tRNA), który odpowiada za przyłączanie aminokwasów i ich transport do rybosomów (gdzie zostają one włączane do powstającego, w trakcie translacji, łańcucha polipeptydowego) oraz (ii) mały, regulacyjny RNA (sRNA – small RNA), nazywany także niekodującym RNA (ncRNA – non-coding RNA). Bakteryjne ncRNA mają zwykle od 50 do 400 nukleotydów. Są one kluczowymi regulatorami ekspresji genów zaangażowanych w różne procesy komórkowe, m.in. w adaptację do warunków stresowych, wirulencję, transdukcję sygnałów komórkowych oraz szeroko pojęty metabolizm.

Działają one na różnych etapach ekspresji genów, m.in. poprzez kontrolę procesu: (i) transkrypcji, (ii) stabilizacji i procesowania RNA, (iii) translacji oraz (iv) translokacji i degradacji białek [8, 25].

Sekwencje, które są transkrybowane w niekodujące, regulatorowe RNA stanowią średnio 10–15% genomu [46]. W ciągu ostatnich 10 lat, dzięki rozwojowi genomiki porównawczej oraz technik bioinformatycznych, udało się ponad dziesięciokrotnie zwiększyć liczbę identyfikowanych ncRNA. Są to jednak, w większości, cząsteczki wyróżnione jedynie *in silico*, których obecność nie została dotąd zweryfikowana eksperymentalnie. Nie wiadomo również, jaką specyficzną rolę mogą one odgrywać w komórkach. Dobry przykład stanowią genomy szczepów *E. coli* gdzie, stosując metody bioinformatyczne, wykryto ponad 100 cząsteczek ncRNA, z których jedynie dwudziestu udało się przypisać funkcje biologiczne [4].

#### 4.3. Pseudogeny

Pseudogeny to niekodujące regiony DNA powstałe z defektywnych genów, które utraciły swą pierwotną funkcję. Początkowo uważano, że występują one sporadycznie u prokariotów, jednak kompleksowa analiza 64 wybranych genomów bakteryjnych, wykazała obecność ponad 7 000 pseudogenów. W niektórych szczepach mogą one stanowić nawet do 5% wszystkich sekwencji o charakterze genów [26].

Pseudogeny identyfikuje się zarówno w chromosomach, jak i w plazmidach bakterii oraz archeonów. Analizując ich dystrybucję w genomach, nie dostrzega się żadnych prawidłowości. Sytuacja ta wynika z losowego generowania pseudogenów, które mogą powstawać w wyniku (i) powolnej i stopniowej akumulacji mutacji w obrębie poszczególnych genów bądź (ii) szybkiej inaktywacji genów, spowodowanej insercją egzogenego DNA, np. w wyniku transpozycji elementu transpozycyjnego [16].

Szczególne dużo pseudogenów zawierają genomy niektórych wewnątrzkomórkowych patogenów, głównie z rodzajów *Mycobacterium* i *Rickettsia*. Na przykład w *Mycobacterium leprae* TN zidentyfikowano aż 1 115 pseudogenów, stanowiących prawie 30% całego genomu. Jest wielce prawdopodobne, że nagromadzenie pseudogenów w genomach patogenów wewnątrzkomórkowych wynika ze specyficznego środowiska życia tych mikroorganizmów. Bogactwo substancji odżywczych wewnątrz komórek gospodarza oraz ograniczona presja selekcyjna środowiska zewnętrznego sprzyjają akumulacji mutacji w obrębie genów kodujących zbędną, w tych warunkach, informację genetyczną. Zmiany te są szybko utrwalane w toku ewolucji, a z czasem DNA zawierający zmutowane geny zostaje usunięty, co prowadzi do redukcji genomu [16, 26].



#### 4.4. Sekwencje repetytywne

W genomach prokariotycznych występuje wiele sekwencji repetytywnych. Analizy bioinformatyczne wykazały, że stanowią one średnio 6,9% genomu, niekiedy jednak przekraczają nawet 40%. Rekordzistą (42,2%) jest bakteria *Orientia tsutsugamushi* str. Ikeda, w genomie której występuje około 1 000 kopii sekwencji o wielkości 770 pz [44].

Większość powtórzeń w DNA to tzw. sekwencje rozproszone (interspaced repeats), które występują powszechnie. Uważa się, że mogą odgrywać ważną rolę w organizacji i ewolucji genomów prokariotycznych. Wykazano, że w obrębie takich sekwencji dochodzi dość często do różnego typu zdarzeń rekombinacyjnych, które prowadzą do mniej bądź bardziej rozległych zmian w strukturze DNA [44].

Sekwencje repetytywne są zwykle zlokalizowane w regionach międzygenowych, dzięki czemu mogą być transkrybowane wraz z przyległymi genami. Ich obecność niejednokrotnie umożliwia wytworzenie struktur drugorzędowych mRNA, które determinują stabilność powstałych transkryptów. Sekwencje te mogą zatem pełnić również ważne funkcje regulacyjne [9, 32].

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych klas sekwencji repetytywnych są MITE (miniature inverted-repeat transposable element), które zaliczane są do grupy nieautonomicznych elementów transpozycyjnych. Ich wielkość zawiera się w przedziale od 70 do 300 pz. MITE to prawdopodobnie zredukowane formy sekwencji insercyjnych, których mobilność jest determinowana przez dostarczone *in trans* transpozazy, kodowane przez inne, funkcjonalne elementy transpozycyjne. Występują one powszechnie u wielu prokariotów, w liczbie od kilkudziesięciu do kilkuset kopii, zaś w niektórych przypadkach mogą stanowić nawet około 2% genomu gospodarza [10]. Elementy typu MITE oprócz pełnienia funkcji regulacyjnych mogą także odgrywać istotną rolę w ewolucji białek oraz regulacyjnego RNA [11].

Powtórzone sekwencje są także elementem składowym systemów CRISPR (clustered, regulary interspaced short palindromic repeats), zawierających regularnie rozmieszczone, krótkie sekwencje palindromowe. Systemy te to największe zgrupowania sekwencji repetytywnych, jakie poznano dotąd w genomach prokariotycznych. Występują one aż w około 90% genomów *Archaea* oraz w ponad 40% genomów bakteryjnych. Regiony te mogą zawierać od 2 do 249 powtórzeń prostych, o długości w zakresie od 24 do 47 pz, które są rozdzielone regionami łącznikowymi (26 pz – 72 pz). Wraz z przyległymi obszarami kodującymi CAS (CRISPR associated sequences) oraz tzw. sekwencjami liderowymi, tworzą one systemy CRISPR-CAS, które pełnią funkcję analogiczną do systemu interferencyjnego RNA (siRNA) *Eucaryota* [27, 39].

Za sekwencje repetytywne można także uznać ruchome elementy genetyczne oraz genomy profagów, które występują w większości genomów prokariotycznych, niekiedy w wielu kopiach.

#### 4.5. Ruchome elementy genetyczne zintegrowane z genomowym DNA

Ruchome elementy genetyczne (MGE – mobile genetic elements) są ważnym składnikiem genomów prokariotycznych. Występują one powszechnie zarówno u bakterii jak i archeonów. Niekiedy mogą one stanowić nawet 40% ogólnej puli informacji genetycznej zawartej w danym szczepie.

Do grona ruchomych elementów genetycznych zalicza się, oprócz plazmidów i genomów bakteriofagów: (i) elementy transpozycyjne (sekwencje insercyjne i ranspozony), (ii) elementy integrujące z DNA (w tym elementy koniugacyjne i mobilizowalne, odpowiednio, ICE – integrative and conjugative elements i IME – integrative and mobilizable elements) oraz (iii) introny i inteiny. Elementy te (z wyjątkiem plazmidów) występują w formie zintegrowanej z genomowym DNA.

Niektóre z nich (plazmidy, ICE, IME) mogą być przekazywane drogą koniugacji nawet do odległych filogenetycznie gatunków – są to zatem naturalne wektory genetyczne odgrywające zasadniczą rolę w horyzontalnym transferze genów. Należy również podkreślić, że niemal wszystkie typy MGE kodują różnego typu rekombinazy, których aktywność może prowadzić do licznych zmian w strukturze materiału genetycznego gospodarza. Z tej przyczyny uważane są one za jeden z najbardziej rekombinogennych czynników, który decyduje, w dużej mierze, o architekturze genomu oraz odgrywa rolę istotnego czynnika zwiększającego zmienność, a tym samym tempo ewolucji swoich gospodarzy [37].

### 5. Minimalny genom i pangenu

Wyniki dogłębnych analiz genomowych skłaniają do przypuszczeń, że minimalny genom bakteryjny może składać się, teoretycznie, z zaledwie 206 genów, których produkty umożliwiają zachowanie podstawowych funkcji życiowych mikroorganizmu, takich jak: (i) replikacja DNA, (ii) naprawa DNA, (iii) transkrypcja i translacja, (iv) obróbka potranslacyjna, (v) sekrecja i procesowanie białek, (vi) podział komórki, (vii) transport substratów, (viii) pozyskiwanie energii, (ix) odpowiedź na stresowe warunki środowiska oraz (x) synteza aminokwasów, lipidów, nukleotydów i niektórych kofaktorów [18].

W 1999 roku stworzono komputerowy model komórki (projekt E-CELL; <http://www.e-cell.org/ecell/>), której minimalny genom zawierał jedynie 127 genów. Teoretycznie jest to wystarczająca ilość informacji

genetycznej, która powinna zapewnić takiej wirtualnej komórce zdolność do samodzielnego funkcjonowania. Chociaż komórka taka, jak zakładano, mogłaby osiągnąć metaboliczną homeostazę, nie byłaby ona jednak zdolna do reprodukcji i ewolucji. Większość genów wykozystanych w tym projekcie pochodziła z *Mycoplasma genitalium*, której chromosom, o wielkości 580 kpb, koduje 482 białka [43].

Dla porównania – w obrębie jednego z najmniejszych, poznanych dotychczas genomów, należącego do bakterii „*Candidatus Carsonella ruddii*” PV, kodowane są zaledwie 182 białka, a całkowita liczba genów wynosi 213. Należy jednak pamiętać, że bakteria ta jest obligatoryjnym symbiontem, który nie jest zdolny do przeżycia poza organizmem swojego gospodarza – wykorzystuje zatem jego informację genetyczną, kompensując własne „braki” [30]. Z kolei „*Candidatus Pelagibacter ubique*” HTCC 1062, który posiada najmniejszy genom wśród bakterii swobodnie żyjących (1389 genów), koduje aż 1354 białka. Zestawienie tych danych uświadamia, że chociaż minimalny, uniwersalny rdzeń genomu prokariotycznego może być rzeczywiście niewielki, to jednak mikroorganizmy swobodnie żyjące, ze względu na zmienne warunki środowiska oraz konieczność przeprowadzania złożonych procesów metabolicznych muszą kodować, co najmniej, kilkaset białek [7].

W ostatnich latach rozpoczęto również bardziej kompleksowe analizy, których celem było zdefiniowanie pangenu (nazywanego również supragenomem), stanowiącego całkowitą pulę genów obecnych w genomach bakterii zaliczanych do danej grupy taksonomicznej (zwykle gatunku) [22, 40]. Analizy te wykazały, że pangenuy większości analizowanych bakterii są „otwarte”. Oznacza to, że kolejne poznawane szczepy niosą zestawy unikatowych genów, które wzbogacają pangenu danego gatunku [2]. Sugeruje się, że pangenuy nielicznych bakterii są „zamknięte”, a więc zidentyfikowano ich całkowitą pulę genową. Wykazano, na przykład, że dla zdefiniowania pełnego pangenu *Bacillus anthracis* wystarczy wiedza o informacji genetycznej niesionej przez zaledwie cztery szczepy tej bakterii. Przypuszcza się jednak, że *B. anthracis* stanowi odmianę klonalną *Bacillus cereus*. Gdyby to stwierdzenie było prawdziwe, pula genów tego gatunku zostałaby znacznie zwiększona. Z „zamkniętymi” pangenuami prawdopodobnie mamy również do czynienia w przypadku: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* oraz *Ureoplasma ureolyticum* [28, 41]. Wprowadzenie pojęcia „zamkniętego” pangenu budzi jednak pewne wątpliwości, zakłada bowiem występowanie w genomach ograniczonego zestawu genów, co nie jest zgodne z obserwacjami wskazującymi na powszechność i zakres horyzontalnego transferu genów.

Analizy pangenuów umożliwiły również zdefiniowanie zestawu genów stanowiących konserwowany

rdzeń genomu, który jest specyficzny dla danego gatunku. Wykazano, na przykład, że dla ośmiu analizowanych szczepów *Streptococcus agalactiae* rdzeń taki składa się z 1806 genów, co stanowi około 80% każdego z badanych genomów [40]. Analizując z kolei genom 17 szczepów *E. coli* stwierdzono obecność 2344 genów wspólnych, co stanowi średnio mniej niż 50% pojedynczego genomu i, co ciekawe, jedynie około 17% pangenu tego gatunku [34]. Przytoczone dane dowodzą ogromnej zmienności genetycznej szczepów w obrębie jednego gatunku bakterii i wskazują na rolę HGT w tym procesie.

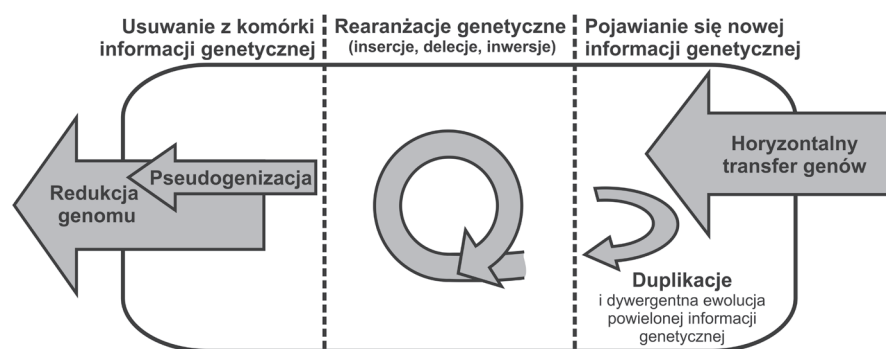
## 6. Ewolucja genomów prokariotycznych

Przytoczone w tej pracy przykłady wskazują, że genomu prokariotyczne nie są statycznymi, monolitycznymi strukturami, lecz podlegają licznym rearranżacjom genetycznym. Plastyczność i ewolucja genomów jest przede wszystkim wypadkową trzech procesów: (i) horyzontalnego transferu genów, (ii) rekombinacji prowadzących do różnego typu rearranżacji genetycznych oraz (iii) redukcji, która prowadzi do zmniejszenia rozmiaru genomów.

Powszechnie przyjmuje się, że horyzontalny transfer genów jest siłą napędową ewolucji bakterii. Kompensuje on bakteriom brak możliwości rozmnażania płciowego, które u innych organizmów warunkuje zmienność genetyczną. Istnieje wiele dróg wprowadzania egzogennej DNA do komórek bakteryjnych, takich jak koniugacja, transdukcja, transformacja, naturalna elektroporacja (indukowana wyładowaniami atmosferycznymi) czy też transfer za pośrednictwem cząstek GTA (gene transfer agents) [12, 24]. W wyniku tych procesów, teoretycznie dowolny segment genomowego DNA może zostać przeniesiony nawet do odległych filogenetycznie gatunków bakterii, co pozwala zdefiniować informację genetyczną tych mikroorganizmów jako ogromną, wspólną pulę różnorodnych genów. Wprowadzony do komórki DNA zawiera niekiedy kompletne operony bądź większe zgrupowania genów chromosomowych o wyspecjalizowanych funkcjach. Często są to geny metabolizmu podstawowego, bądź geny o charakterze adaptacyjnym, których obecność może zmienić profil metaboliczny nowego gospodarza. Tego typu egzogennej informację określa się często jako wyspy genomowe (GI lub GEI – genomic islands).

W wyniku HGT możliwe jest zatem uzyskanie *en bloc* dużej ilości informacji genetycznej. Takie skokowe zmiany są niewątpliwie ważnym czynnikiem przyspieszającym znacznie tempo ewolucji bakterii. Alternatywnym, lecz bardzo długotrwałym procesem prowadzącym do pojawienia się w komórce nowej informacji genetycznej jest duplikacja segmentów DNA,





Rys. 4. Procesy wpływające na strukturę i ewolucję genomów prokariotycznych, wg [29] (zmodyfikowany)

a następnie ich dywergentna ewolucja, która może doprowadzić do powstania genów, kodujących białka o nowych właściwościach (rys. 4).

Poczynione obserwacje wskazują, że wielkość genomu jest bardzo często skorelowana ze środowiskiem bytowania mikroorganizmu. Duże znaczenie odgrywa tu m.in. dostępność związków odżywczych oraz stabilność warunków w danej niszy ekologicznej. Zasiedlanie zmiennych środowisk, w których bakteria narażona jest na wpływ czynników stresowych i musi współzawodniczyć z innymi mikroorganizmami, promuje utrzymanie dużej różnorodności metabolicznej. Konieczne jest tym samym zachowanie dużej puli informacji genetycznej. W warunkach bardziej stabilnych ta informacja może stać się zbędna – ulega więc redukcji, co pociąga za sobą zmniejszenie wielkości genomu.

Redukcji podlegają genomy wszystkich organizmów prokariotycznych. Według hipotezy zakładającej „optymalizację genomu” (streamlining hypothesis), zjawisko to polega na eliminacji informacji genetycznej o małej wartości adaptacyjnej do danych warunków środowiska, w celu ograniczenia obciążenia metabolicznego wynikającego z utrzymywania i replikacji „mało wartościowego” DNA. Tego typu selekcja „oczyszczająca” odgrywa bardzo ważną rolę i jest szczególnie widoczna w przypadku genomów prokariotycznych endosymbiontów i pasożytów wewnątrzkomórkowych. Wzrastająca liczba pseudogenów jest pierwszym symptomem wskazującym na możliwość utraty części informacji genetycznej, co w konsekwencji prowadzi do redukcji genomu.

Należy też pamiętać, że informacja genetyczna utracona w wyniku delecji, potencjalnie może być ponownie odzyskana za sprawą HGT (z tej przyczyny niektórzy przyrównują genomy do palimpsestów – średniowiecznych manuskryptów, w których pozornie usunięte teksty, z czasem pojawiały się ponownie i stawały się w pełni czytelne). Przykładem jest transpozon występujący w obrębie wyspy genomowej PAI II *E. coli* 536, który niesie homologi genów występujących w operonie *pdu* *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (operon warunkuje rozkład 1,2-propanodiolu). W świetle

przeprowadzonych analiz wydaje się, że operon ten został utracony przez protoplastę rodzajów *Salmonella* i *Escherichia*, a następnie odzyskany przez bakterie z rodzaju *Salmonella* oraz szczep *E. coli* 536 na drodze niezależnych zdarzeń HGT [5, 23]. Obserwacje te potwierdzają założenie, że żadna informacja genetyczna nie musi być tracona bezpowrotnie.

## 7. Podsumowanie

Wyniki analiz genomicznych przyniosły wiele cennych danych świadczących o ogromnej zmienności genomów prokariotycznych. Tempo ewolucji prokariotów jest bardzo wysokie, co wynika, w dużej mierze, z szerokiego zakresu horyzontalnego transferu genów oraz częstych mutacji i rearanżacji genetycznych, które prowadzą do dywersyfikacji pierwotnie homogennej informacji genetycznej. Proces kształtowania i ewolucji genomów jest zatem wypadkową ciągłych zmian, spowodowanych kolejnymi insercjami, rearanżacjami i delecjami w obrębie DNA (rys. 4). Poziom tych zmian jest dość zbalansowany, co powoduje, że genomy nie rozrastają się do monstrualnych rozmiarów, a ich wielkość, w obrębie danego gatunku, nie jest zbyt zróżnicowana.

Szczegółowe analizy sekwencji nukleotydowych genomów przynoszą wiele informacji na temat potencjału metabolicznego danego mikroorganizmu, jak również umożliwiają wyciągnięcie bardziej ogólnych wniosków na temat plastyczności genomu, jego ewolucji oraz zakresu zdarzeń horyzontalnego transferu genów. Ze względu na ogromne zróżnicowanie bakterii, nie jesteśmy jednak w stanie stworzyć uniwersalnego modelu typowego genomu prokariotycznego. Możliwe jest jednak określenie, które z jego elementów są absolutnie niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Analizy takie są doskonałym punktem wyjścia dla biologii syntetycznej, której największym osiągnięciem jest, jak dotąd, stworzenie „sztucznej” bakterii – *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, której genom został w całości zsintetyzowany chemicznie w laboratorium [17].

Zmienność genomów jest również ważnym przyczynkiem do dyskusji na temat taksonomii prokariotów, a w szczególności kryteriów stosowanych przy definiowaniu gatunków tych organizmów. Nie ulega wątpliwości, że klasyfikacja taka powinna być oparta wyłącznie na wynikach kompleksowych analiz z zakresu genomiki porównawczej. Dynamiczny rozwój wysoko-przepustowych technik sekwencjonowania DNA, pozwala przypuszczać, że może to nastąpić już w bardzo niedalekiej przyszłości.

#### Podziękowania

Praca ta powstała w trakcie realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych przez MNiSW (IP2010 008670 i N N303 816340), dotyczących analiz genomicznych bakterii z rodzajów *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*) oraz *Psychrobacter* (*Gammaproteobacteria*). Autorzy dziękują dr Jadwidze Baj za krytyczne uwagi na temat manuskryptu.

#### Literatura

- Baliga N.S., Ng W.V. i wsp.: Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Res.* **14**, 2221–2234 (2004) (praca jest dziełem 15 autorów)
- Bentley S.: Sequencing the species pan-genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 258–259 (2009)
- Boussau B., Karlberg E.O., Frank A.C., Legault B.A., Andersson S.G.: Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9722–9727 (2004)
- Brantl S.: Bacterial chromosome-encoded small regulatory RNAs. *Future Microbiol.* **4**, 85–103 (2009)
- Brzuszkiewicz E., Dobrindt U. i wsp.: How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12879–84 (2006) (praca jest dziełem 13 autorów)
- Byram R., Stewart P.E., Rosa P.: The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 3561–3569 (2004)
- Carbone A.: Computational prediction of genomic functional cores specific to different microbes. *J. Mol. Evol.* **63**, 733–746 (2006)
- Chang T.-H., Wub L.-C., Lin J.-H., Huang H.-D., Liu B.-J., Cheng K.-F., Horng J.-T.: Prediction of small non-coding RNA in bacterial genomes using support vector machines. *Expert Syst. Appl.* **37**, 5549–5557 (2010)
- Cozzuto L., Petrillo M., Silvestro G., Di Nocera P.P., Paoletta G.: Systematic identification of stem-loop containing sequence families in bacterial genomes. *BMC Genomics*, **9**, 20 (2008)
- De Gregorio E., Abrescia C., Carlomagno M.S., Di Nocera P.P.: Ribonuclease III-mediated processing of specific *Neisseria meningitidis* mRNAs. *Biochem. J.* **374**, 799–805 (2003)
- Delilhas N.: Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. *Mol. Microbiol.* **67**, 475–481 (2008)
- Demaneche S., Bertolla F., Buret F., Nalin R., Sailland A., Auriol P., Vogel T.M., Simonet P.: Laboratory-scale evidence for lightning-mediated gene transfer in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3440–3444 (2001)
- Egan E.S., Fogel M.A., Waldor M.K.: Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.* **56**, 1129–1138 (2005)
- Fleischmann R.D., Venter J.C. i wsp.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496–512 (1995) (praca jest dziełem 15 autorów)
- Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997) (praca jest dziełem 40 autorów)
- Fuxelius H.H., Darby A.C., Cho N.H., Andersson S.G.: Visualization of pseudogenes in intracellular bacteria reveals the different tracks to gene destruction. *Genome Biol.* **9**, R42 (2008)
- Gibson D.G., Venter J.C. i wsp.: Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, **329**, 52–56 (2010) (praca jest dziełem 24 autorów)
- Gil R., Silva F.J., Pereto J., Moya A.: Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 518–37 (2004)
- Giovannoni S.J., Mathur E.J. i wsp.: Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*, **309**, 1242–1245 (2005) (praca jest dziełem 14 autorów)
- Koonin E.V.: Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309–338 (2005)
- Koonin E.V., Wolf Y.I.: Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6688–6719 (2008)
- Lapierre P., Gogarten J.P.: Estimating the size of the bacterial pan-genome. *Trends Genet.* **25**, 107–110 (2009)
- Lawrence J.G., Roth J.R.: Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. *Genetics*, **142**, 11–24 (1996)
- Leung M.M., Florizone S.M., Taylor T.A., Lang A.S., Beatty J.T.: The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **675**, 253–264 (2010)
- Liu J.M., Camilli A.: A broadening world of bacterial small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 18–23 (2010)
- Liu Y., Harrison P.M., Kunin V., Gerstein M.: Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biol.* **5**, R64 (2004)
- Marraffini L.A., Sontheimer E.J.: CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, **322**, 1843–1845 (2008)
- Medini D., Donati C., Tettelin H., Massignani V., Rappuoli R.: The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 589–594 (2005)
- Mira A., Ochman H., Moran N.A.: Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.* **17**, 589–596 (2001)
- Nakabachi A., Yamashita A., Toh H., Ishikawa H., Dunbar H.E., Moran N.A., Hattori M.: The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science*, **314**, 267 (2006)
- Ochman H.: Distinguishing the ORFs from the ELFs: short bacterial genes and the annotation of genomes. *Trends Genet.* **18**, 335–337 (2002)
- Ogata H., Audic S., Barbe V., Artiguenave F., Fournier P.E., Raoult D., Claverie J.M.: Selfish DNA in protein-coding genes of *Rickettsia*. *Science*, **290**, 347–350 (2000)
- Podar M., Stetter K.O. i wsp.: A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol.* **9**, R158 (2008) (praca jest dziełem 27 autorów)
- Rasko D.A., Ravel J. i wsp.: The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* **190**, 6881–6893 (2008) (praca jest dziełem 34 autorów)
- Schmeisser C., Streit W.R. i wsp.: *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* **75**, 4035–4045 (2009) (praca jest dziełem 18 autorów)
36. Schneiker S., Muller R. i wsp.: Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1281–1289 (2007) (praca jest dziełem 59 autorów)
  37. Siefert J.L.: Defining the mobilome. *Methods Mol. Biol.* **532**, 13–27 (2009)
  38. Slater S.C., Wood D.W. i wsp.: Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J. Bacteriol.* **191**, 2501–2511 (2009) (praca jest dziełem 36 autorów)
  39. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P.: CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 181–186 (2008)
  40. Tettelin H., Fraser C.M. i wsp.: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13950–13955 (2005) (praca jest dziełem 46 autorów)
  41. Tettelin H., Riley D., Cattuto C., Medini D.: Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 472–477 (2008)
  42. Teyssier C., Marchandin H., Jumas-Bilak E.: The genome of *Alphaproteobacteria*: complexity, reduction, diversity and fluidity. *Can. J. Microbiol.* **50**, 383–396 (2004)
  43. Tomita M., Hutchison C.A. 3<sup>rd</sup> i wsp.: E-CELL: software environment for whole-cell simulation. *Bioinformatics*, **15**, 72–84 (1999) (praca jest dziełem 11 autorów)
  44. Treangen T.J., Abraham A.L., Touchon M., Rocha E.P.: Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 539–571 (2009)
  45. Waters E., Noordewier M. i wsp.: The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12984–12988 (2003) (praca jest dziełem 22 autorów)
  46. Westhof E.: The amazing world of bacterial structured RNAs. *Genome Biol.* **11**, 108 (2010)

Urszula Kuklińska<sup>1</sup>, Anna Maria Łasica<sup>1</sup>, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego,  
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 1.1. Historia odkrycia *Helicobacter pylori*. 1.2 Infekcje *H. pylori* – epidemiologia, objawy chorobowe. 1.3. Główne czynniki wirulencji *H. pylori*. 2. CagA – jako czynnik wirulencji. 2.1. Charakterystyka CagA. 2.2. Polimorfizm CagA. 2.3. IV typ sekrecji *H. pylori*. 2.4. Fosforylacja CagA. 2.5. Multimeryzacja CagA. 3. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-zależna. 3.1. Interakcja z SHP-2. 3.2. Interakcje z kinazami obecnymi w komórce gospodarza. 4. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-niezależna. 4.1. Zaburzenia ścisłych powiązań międzykomórkowych oraz ich polarności. 4.2. Destabilizacja kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -kanteina. 4.3. Deregulacja czynników transkrypcyjnych. 5. CagA – bakteryjna onkoproteina – doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznym myszy. 6. Podsumowanie

#### ***Helicobacter pylori* CagA protein – the first identified bacterial oncoprotein**

**Abstract:** *Helicobacter pylori* is a gramnegative spiral-shaped  $\epsilon$ -Proteobacterium, which colonizes the gastric mucosa of humans. Infections caused by *H. pylori* are associated with different symptoms ranging from mild gastritis to ulcers. CagA is a highly immunogenic, polymorphic protein and the main *H. pylori* virulence factor. Infection with cagA-positive *H. pylori* is associated with the risk of development of gastric adenocarcinoma. CagA injected into eukaryotic cells by the type IV transport system apparatus interacts with various host proteins influencing many signal-transduction pathways in a phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent manner. These interactions result in the perturbations of cell morphology, proliferation, differentiation and spreading. All these interactions influence the process of carcinogenesis. Recently conducted experiments on transgenic mice producing CagA documented that CagA is a bacterial oncoprotein. The presented review summarizes the recent achievements concerning the details of CagA interaction with host proteins.

1. Introduction. 1.1. Discovery of *Helicobacter pylori*. 1.2. Epidemiology and disease symptoms. 1.3 Main *H. pylori* virulence factors. 2. CagA as a virulence factor. 2.1. Main CagA features. 2.2. CagA polymorphism. 2.3. *H. pylori* type four secretion system. 2.4. CagA phosphorylation. 2.5. CagA multimerization. 3. CagA phosphorylation-dependent activity. 3.1. Interaction with SHP-2. 3.2. Interaction with cellular kinases. 4. CagA phosphorylation-independent activity. 4.1. Disturbances of cellular tight junctions and cell polarity. 4.2. Destabilisation of E-cadherin/ $\beta$ -catenin system. 4.4. Dereglulation of transcription factor activities. 5. CagA – bacterial oncoproteins – experiments using transgenic mice. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** *Helicobacter pylori* nowotwór żołądka, CagA, onkoproteina, cag-PAI, IV typ sekrecji

**Key words:** *Helicobacter pylori*, stomach cancer, CagA, oncoprotein, cag-PAI, T4SS (type four secretion system)

## **1. Wstęp**

### **1.1. Historia odkrycia *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* to Gram-ujemna, mikroaerofilna pałeczka należąca do klasy *Epsilonproteobacteria*, z rzędu *Campylobacteriales* o helikalnym kształcie i długości około 3  $\mu$ m. Mikroorganizmy kolonizują powierzchnię komórek nabłonka żołądka. Pierwszym naukowcem który opisał ten mikroorganizm był Włoch Giulio Bizzozero. Zidentyfikował on bakterie o helikalnym kształcie obecne w żołądku psa (1893 rok). W 1899 roku bakterie zostały ponownie zauważone przez Walerego Jawskiego z Uniwersytetu Jagiellońskiego, który jako pierwszy zasugerował, że mogą one powodować schorzenia górnego odcinka przewodu pokarmowego. Początkowo bakteria otrzymała nazwę

*Campylobacter pylori*, ze względu na bardzo duże podobieństwo morfologiczne do przedstawicieli rzędu *Campylobacteriales*, ale po zsekwencjonowaniu 16 sRNA w 1989 roku okazało się, że nie należy do tego rzędu i otrzymała nazwę *Helicobacter pylori* [48].

*H. pylori* został dokładnie scharakteryzowany przez australijskich naukowców: B.J. Marshalla i J.R. Warrena w 1982 roku, którzy wykazali bezpośredni związek między infekcją *H. pylori*, a rozwojem stanu zapalnego błony śluzowej żołądka. Za to odkrycie zostali uhonorowani nagrodą Nobla w 2005 roku w dziedzinie medycyny.

Zakażenie *H. pylori* jest powszechne na całym świecie. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – World Health Organization) 80% populacji ludzkiej w krajach rozwijających się i 20–50% w krajach rozwiniętych jest zakażona tą bakterią. Rozbieżność

\* Adres korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl



między krajami rozwijającymi się, a rozwiniętymi jest prawdopodobnie spowodowana gorszymi warunkami sanitarnymi w krajach rozwijających się. Według Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii w Polsce zakażone jest 70% społeczeństwa [16]. Zakażenie następuje zazwyczaj na drodze pokarmowej: oralno-oralnej lub fekalno-oralnej. Do infekcji dochodzi najczęściej u dzieci przed 10 rokiem życia, źródłem zakażenia są przeważnie członkowie najbliższej rodziny. Bakteria jest często obecna w układzie pokarmowym do końca życia człowieka, jednak opisano przypadki, w których u dzieci doszło o samoistnego wyleczenia [23].

### 1.2. Infekcje *H. pylori* – epidemiologia, objawy chorobowe

Zakażenia *H. pylori* najczęściej przebiegają bezobjawowo. Tylko u 10–20% zakażonych osób dochodzi do rozwinięcia objawów chorobowych. Objawem klinicznym infekcji jest zapalenie błony śluzowej. Znane są trzy fenotypy stanów zapalnych jelit: fenotyp łagodnego zapalenia błony śluzowej żołądka, fenotyp wrzodowy i fenotyp raka. Zmianom zapalnym może towarzyszyć atrofia i metaplasja jelitowa oraz spadek wydzielania soku żołądkowego, co w konsekwencji może prowadzić do choroby wrzodowej żołądka i nowotworu tkanki nabłonkowej żołądka. Rozwój chłoniaka MALT (mucosa associated lymphatic tissue) nowotworu tkanki limfatycznej związanej z układem pokarmowym może być zaindukowany długotrwałą stymulacją układu immunologicznego przez ten mikroorganizm. Infekcja *H. pylori* może także skutkować rozwojem choroby wrzodowej dwunastnicy. Ciekawe jest to, że fenotyp wrzodowy i rak żołądka nawzajem się wykluczają, rak żołądka nigdy nie występuje u pacjentów z objawami choroby wrzodowej dwunastnicy. Występowanie wymienionych wyżej objawów chorobowych w populacji jest silnie skorelowane z obecnością *H. pylori* w organizmie. 95% przypadków choroby wrzodowej dwunastnicy i 85% choroby wrzodowej żołądka jest związane z zakażeniem. Z drugiej strony tylko 10–12% pacjentów zainfekowanych *H. pylori* cierpi na chorobę wrzodową żołądka, a u 1–2% dochodzi do rozwoju choroby nowotworowej, reszta przypadków infekcji przebiega łagodnie bądź asymptotycznie. Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła *H. pylori* do klasy 1 karcynogenów. Różnorodność objawów chorobowych będących skutkiem infekcji *H. pylori* zależy zarówno od genotypu patogenu jak i genotypu organizmu gospodarza, które warunkują przebieg oddziaływań pomiędzy dwoma organizmami [41].

Eradykacja *H. pylori* skutkuje znaczącym obniżeniem ryzyka rozwoju raka żołądka, lecz terapia może być stosowana tylko w uzasadnionych przypadkach. Polskie Towarzystwo Gastroenterologiczne podaje dokładne

wskazania do leczenia infekcji. W wytycznych PTG znalazło się stwierdzenie, że u osób bez objawów klinicznych (i bez czynników ryzyka raka żołądka) nie ma wskazań do leczenia przeciwbakteryjnego [16].

### 1.3. Główne czynniki wirulencji *H. pylori*

*H. pylori* produkuje wiele czynników wirulencji – białek umożliwiających bakterii przetrwanie w kwaśnym środowisku żołądka, adhezję do komórek gospodarza, modulowanie przemian metabolicznych komórek gospodarza oraz przezwycięzenie obronnych mechanizmów układu immunologicznego. Ich działanie umożliwia ustanowienie chronicznej, trwającej całe życie człowieka infekcji. Istotnym czynnikiem wirulencji *H. pylori* jest wakuolizująca cytotoksyna VacA. Aktywność tego białka hamuje proliferację komórek epitelium, indukuje zmiany w cytoszkieletu komórek oraz indukuje proces apoptozy poprzez stymulację uwalniania cytochromu c z mitochondriów. Dodatkowo białko wpływa na poziom odpowiedzi immunologicznej: hamuje proliferację limfocytów T, blokuje proces fagocytozy, blokuje prezentację antygenów limfocytom T oraz obniża efektywność działania limfocytów Th co skutkuje niezbyt wysokim poziomem odpowiedzi immunologicznej organizmu. VacA wpływa także na rozluźnienie ścisłych połączenia międzykomórkowych komórek nabłonkowych żołądka [12]. Innym czynnikiem wirulencji jest ureaza, która rozkładając mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla powoduje alkalizację kwasowego środowiska żołądka. Rozmieszczone biegunowo rzęski umożliwiają ruch i przemieszczanie komórek patogenu do warstwy podsłuzowej w żołądku. Wytwarzane enzymy będące antyoksydantami takie jak katalaza, czy dysmutaza ponadtlenkowa neutralizujące wolne rodniki pozwalając mikroorganizmowi przezwyciężyć antybakteryjne działanie neutrofilii [46, 73].

W genomie *H. pylori* występuje obszar DNA nabyty drogą horyzontalnego transferu – wyspa patogenności cag-PAI długości około 40 kbp. Cag-PAI zawiera około 40 genów i podzielona jest na dwa segmenty: I i II. Pomiędzy dwoma segmentami występuje nukleotydowa sekwencja insercyjna IS605 [7]. Analiza transkryptomu komórek gospodarza (linia komórkowa T84) po infekcji *H. pylori* udokumentowała zmianę poziomu ekspresji 670 genów zainfekowanych komórek nabłonka, z czego 92% było uzależnione od aktywności genów wyspy cag-PAI [16]. Do najważniejszych produktów genów wyspy patogenności zaliczamy: białka budujące układ sekrecji typu IV TFSS (type four secretion system) odpowiedzialny za przekazywanie czynników efektorowych do wnętrza komórek gospodarza oraz białko CagA – produkt genu *cagA* (cytotoxin associated gene) [47].

Praca przeglądowa dotyczy charakterystyki białka CagA i opisuje skomplikowany mechanizm jego oddzia-



ływań na procesy fizjologiczne komórki gospodarza. Jego aktywność jest bezpośrednio związana z procesem nowotworzenia. Na modelach mysich udokumentowano, że CagA jest onkoproteiną [55].

## 2. CagA – jako czynnik wirulencji

### 2.1. Charakterystyka CagA

CagA (cytotoxin associated protein A), jest to duże 120–145 kDa silnie immunogenne białko, kodowane przez gen *cagA* znajdujący się w obrębie wyspy patogenności *cag* PAI. Gen kodujący to białko jest obecny w genomach około 60% szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów [73].

Białko CagA zostało odkryte w latach dziewięćdziesiątych poprzedniego wieku równocześnie przez trzy zespoły naukowe. Eksperymenty koncentrowały się na identyfikacji genu odpowiedzialnego za produkcję tego silnie immunogennego białka o aktywności cytotoksycznej, oznaczeniu jego sekwencji nukleotydowej oraz analizie polimorfizmów w obrębie nukleotydowej sekwencji kodującej [10, 13, 73]. Te pionierskie badania umożliwiły dalszą analizę funkcji CagA. Silna immunogenność białka CagA sugerowała, że może być ono użyteczne do produkcji szczepionek przeciw *H. pylori*. Wytwarzanie przeciwciał przeciwko CagA przez organizm gospodarza jest silnie skorelowane z występowaniem choroby wrzodowej żołądka u pacjentów, co sugeruje, że CagA jest istotnym czynnikiem wirulencji [11]. CagA w komórkach gospodarza oddziałuje z wieloma białkami, zaangażowanymi w różne szlaki sygnałowe regulujące proliferację, ruchliwość i polarność komórek, co skutkuje zmianą fenotypu komórek eukariotycznych. Białko może oddziaływać z innymi białkami na dwa różne sposoby: sposób zależny od fosforylacji co doprowadza do zmian w cytoszkieletcie oraz adhezji między komórkami epitelium i deregulacji ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Nieufosforylowane CagA wpływa na osłabienia ścisłych połączeń między komórkowych, utratę polarności komórek jak również poziom czynników transkrypcyjnych [24]. Szczegółowo mechanizmy tych oddziaływań opisano w dalszych fragmentach pracy.

### 2.2. Polimorfizm białka CagA

Motywy EPIYA Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala są zlokalizowane na C-terminalnym końcu białka CagA i występują w różnej liczbie powtórzeń. Po przekazaniu do komórek eukariotycznych przez aparat sekrecji typu IV białko lokalizuje się w błonie komórki eukariotycznej a tyrozyna motywów EPIYA jest fosforylowana przez kinazy komórkowe. Funkcją motywów EPIYA jest

interakcja z białkami komórki gospodarza zawierającymi domeny fosfataz tyrozynowych (SHP-2 protein tyrosine phosphatase). Segmenty zawierające motywy EPIYA różnią się długością i składem aminokwasów otaczających poszczególne motywy EPIYA. Wykazano występowanie w białkach CagA czterech różnych rodzajów segmentów z motywami: EPIYA: -A, -B, -C, -D. W szczepach izolowanych od pacjentów w Europie, Ameryce, Australii i Afryce występuje odmiana zachodnia białka CagA z segmentami typu EPIYA-A-B, po nich występuje od 0 do 3 powtórzeń segmentu EPIYA-C. W szczepach izolowanych od pacjentów krajów azjatyckich (Korea, Japonia, Chiny) po segmente EPIYA-A-B występuje segment EPIYA-D. W rzadkich przypadkach występują nietypowe kombinacje rodzajów segmentów [22]. Także liczba motywów aminokwasowych odpowiedzialnych za proces multimeryzacji CagA (CM) również może być różna w różnych szczepach, co wpływa na poziom zmian fenotypowych komórek poprzez deregulację  $\beta$ -kateniny oraz zmianę oddziaływania CagA z SHP-2. Wśród szczepów izolowanych od pacjentów z Japonii wykazano występowanie polimorfizmu genu PTPN11 kodującego SHP-2 (w obrębie domeny SH) co również wpływa na siłę wiązania SHP-2 z CagA, a tym samym warunkuje ryzyko wystąpienia zmian atroficznych i w konsekwencji rozwój choroby nowotworowej [52].

### 2.3. IV typ sekrecji *H. pylori*

CagA jest przekazywane do komórek epitelialnych poprzez jednoetapowy system transportu T4SS (czwarty system transportu), kodowany przez geny wyspy patogenności *cag*-PAI. Wprowadza on cząsteczki efektorowe, w wypadku *H. pylori* białko CagA i produkty rozpadu peptydoglikanu, bezpośrednio z cytozolu komórki bakteryjnej do komórek gospodarza z pominięciem przestrzeni peryplazmatycznej [41]. Przeprowadzono badania polegające na systematycznej mutageniezie genów wyspy *cag*-PAI, udokumentowały, że aktywność 17 z 27 genów wyspy patogenności jest niezbędna do translokacji CagA do komórek eukariotycznych. Architektura T4SS jest morfologicznie podobna do biorących udział w procesie koniugacji pili). Typowy aparat sekrecyjny typu czwartego T4SS jest zbudowany z 11 białek VirB i białka VirD4. Białka budujące aparat sekrecyjny można podzielić na 3 grupy: (i) białka budujące rdzeniowe części kanału (CagT, CagX, CagY homologiczne białkom VirB-7, VirB-9 i VirB-10), (ii) białka „energetyczne” (VirB4-CagE, VirB11) (iii) białka budujące elementy zewnętrzne aparatu transportu – pili (VirB2, VirB3, VirB5). Kotwiczenie aparatu sekrecyjnego w ścianie komórkowej bakterii zachodzi dzięki aktywności białka homologicznego do VirB1: transglikozylazie, która warunkuje proces lizy mureiny.

Wyspa patogenności *cag*-PAI zawiera prawie wszystkie geny kodujące białka homologiczne do białek VirB i VirD4 [19]. W transporcie typu IV biorą też udział białka opiekuńcze, w przekazywaniu CagA taką funkcję spełnia CagF łączące się z C-terminalnym fragmentem jego substratu (złożony z 20 aminokwasów odcinek niezbędny do zajścia translokacji) i transportujące CagA do T4SS [56]. Badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazały, że w skład T4SS wychodzą pili wystające z powierzchni bakterii. Na ich końcu odnajdywana jest mała ilość białka CagA, które oddziałuje za pomocą N-terminalnego końca z podjednostką  $\beta 1$  integryny obecnej na powierzchni zainfekowanych komórek. Interakcja ta doprowadza do przemian w cytoszkielecie aktynowym komórek eukariotycznych i odgrywa kluczową rolę w translokacji CagA [36]. Na końcu pili lokuje się również adhezyjne białko CagL oraz CagY, które także oddziałują z integrynami obecnymi na powierzchni komórek gospodarza. Łączą się one z integrynami  $\alpha 1\beta 1$  (receptor dla kolagenu i lamininy) oraz integrynami  $\alpha 5\beta 1$  (receptor dla fibronektyny) za pomocą motywu arginina-glicyna-asparagina (RGD). Oba rodzaje oddziaływań warunkują adhezję obu komórek pro- i eukariotycznej, przetransportowanie CagA do komórek oraz aktywację kinaz FAK (focal adhesion kinase) i Src [36, 42]. Dodatkowo IV aparat sekrecyjny aktywuje wydzielanie interleukiny 8 przez komórki nabłonkowe. Proces ten nie jest związany z aktywnością białka CagA lecz z cząsteczkami peptydoglikanu, które są wprowadzane do komórek gospodarza także za pomocą tego samego transportera.

#### 2.4. Fosforylacja CagA

CagA po wprowadzeniu do komórek gospodarza jest fosforylowane przez dwa rodzaje współdziałających ze sobą kinaz komórkowych: kinazy SFKs (Src-famili protein tyrosine kinases) oraz kinazy Abl (Abelson tyrosine kinase). Fosforylacji ulega tyrozyna motywu EPIYA, który, jak wspomniano wyżej, jest powtarzany wielokrotnie w C-końcowym fragmencie CagA. Polimorfizm sekwencji aminokwasowych tych odcinków białka determinuje siłę fosforylacji, ponieważ różne rodzaje segmentów EPIYA wykazują różne powinowactwo do kinaz fosforylujących CagA [25]. „Wschodnio-azjatyckie” typy CagA zawierające na C-terminalnym końcu sekwencję aminokwasową EPIYA-D charakteryzują się wyższym powinowactwem do kinazy Src, co powoduje indukcję bardziej znaczących zmiany fenotypowych zainfekowanych komórek w porównaniu do tych indukowanych przez CagA ze szczepów typu „zachodniego”. Badania dowiodły, że 100% osób zbadanych w Korei Południowej, u których wystąpiła choroba nowotworowa żołądka była zainfekowana *H. pylori* produkującym białko CagA zawierające

motyw EPIYA-A-B-D. Jednakże infekcja „szczepem wschodnim” nie jest równoznaczna z zachorowaniem na nowotwór, ponieważ wystąpienie objawów chorobowych zależy również od środowiska życia, diety oraz genotypu organizmu pacjenta. Infekcja tymi szczepami jest jednak powiązana z wysokim prawdopodobieństwem zachorowania na chorobę wrzodową żołądka (90% pacjentów zainfekowanych „wschodnim szczepem”) i dwunastnicy (82% pacjentów zainfekowanych „wschodnim szczepem”) [37]. W „szczepach zachodnich” zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem fosforylacji CagA a liczbą powtórzeń sekwencji aminokwasowej EPIYA-C. Szczepy izolowane od pacjentów z rakiem żołądka zawierają przeważnie kilka takich powtórzeń [28, 45]. Kinazy, które odpowiadają za fosforylację CagA są powszechnie znane jako białka onkogenne kontrolujące przemiany cytoszkieletu, proliferację i różnicowanie się komórek [41]. Aktywność obu kinaz wobec CagA jest zależna od czasu infekcji [68]. Fosforylacja CagA odgrywa istotną rolę w modulacji szlaków przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. Ufosforylowane segmenty EPIYA-C są motywem dokującym dla domeny SH w fosfatazy SHP-2, dlatego ich liczba determinuje siłę i czas oddziaływania SHP-2 CagA, co w dalszej konsekwencji moduluje aktywność fosfatazy [27]. Ufosforylowane CagA oddziałuje także z kinazami Csk (C terminal Src kinase) i Crk (Adapter molecule crk) [24].

#### 2.5. Multimeryzacja CagA3

W komórkach gospodarza białko CagA ulega multimeryzacji (homodimeryzacja) w procesie niezależnym od jego fosforylacji. Bierze w nim udział silnie konserwowana 16-aminokwasowa sekwencja (CM), która znajduje się w obrębie segmentu EPIYA-C lub w pobliżu segmentów EPIYA-C i EPIYA-D na C-terminalnym końcu białka. Multimeryzacja CagA warunkuje interakcję między ufosforylowanym CagA i SHP-2. tak więc jego zahamowanie potencjalnie powinno uniemożliwić patofizjologiczną aktywność CagA [57]. Motyw CM jest dodatkowo niezbędny do zainicjowania oddziaływania CagA z kinazami PAR1b/MARK2 (partitioning-defective-1/microtubule-affinity-regulating-kinases), co skutkuje rozluźnieniem połączeń międzykomórkowych ale też dodatkowo wzmacnia aktywność kompleksu CagA-SHP-2 co wpływa na zmianę kształtu komórek tzw. fenotyp kolibra. Dodatkowo multimeryzacji CagA jest zaangażowana w deregulację aktywności  $\beta$ -kateniny [40]. W tzw. „szczepach zachodnich” *H. pylori* CagA może mieć kilka powtórzeń sekwencji aminokwasowej EPIYA-C w obrębie, którego znajduje się sekwencja CM co powoduje, że białko to stosunkowo łatwo ulega multimeryzacji. Motyw biorący udział w multimeryzacji CagA (CM) również charakteryzuje się polimorfizmem.

CagA obecne w większości tzw. szczepach azjatyckich silniej wiąże się z PAR1b/MARK niż białko obecne w „szczepach zachodnich”. Z drugiej strony w CagA ze „szczepów zachodnich” motyw multimerizacji może być wielokrotnie powtarzany, ponieważ znajduje się w obrębie segmentu EPIYA-C, co również zwiększa powinowactwo białka do odpowiednich kinaz [44]. Dodatkowo multimerizacji CagA jest zaangażowana w deregulację aktywności  $\beta$ -kanteniny [40]. Szczegóły tych procesów opisano w dalszych fragmentach pracy przeglądowej.

### 3. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-zależna

#### 3.1. Interakcja z SHP-2

Po fosforylacji tyrozyny motywu EPIYA białka CagA przez kinazy SFKs uzyskuje ono zdolność do wiązania się z cytoplazmatyczną fosfatazą SHP-2 posiadającą dwie tandemowo powtórzone domeny SH2 (Src Homology 2) [28]. SH2 łączy się z CagA poprzez ufosforylowany motyw EPIYA [27]. W naturalnych warunkach poziom aktywności fosfatazy SHP-2 w komórkach jest niski. Interakcja domen SH2 z CagA skutkuje zmianą jego konformacji, podwyższeniem aktywności domeny PTP (protein tyrosine phosphatase) zlokalizowanej w N-terminalnym końcu białka [27, 31]. Fosfataza SHP-2 bierze udział w transdukcji sygnałów szlaków regulacji proliferacji i różnicowania się komórek, wpływa również na receptory cytokin znajdujące się na komórkach nabłonka oraz na poziom odpowiedzi układu immunologicznego [53]. Interakcja CagA-SHP-2 pełni kluczową rolę w zmianach fenotypu komórek nabłonka a rozregulowanie jej aktywności potencjalnie może indukować powstawanie zmian nowotworowych [60]. Patofizjologiczna aktywność SHP-2 związana jest z aktywacją kinaz Erk/MAP (Extracellular signal-regulated protein kinases) na drodze zależnej lub niezależnej od białek Ras (Rat Sarcoma) [53]. Wzmocniona aktywność Erk wpływa na fazy G1, G2, S cyklu komórkowego co skutkuje rozregulowaniem wzrostu komórek nabłonka. Za pomocą analizy mikroskopowej wykazano, że kinaza Erk ma wpływ również na kształt (wydłużanie się – fenotyp kolibra) i ruchliwość komórek (wzrost rozproszony – cell scattering) [29]. Nadmierna aktywność fosfatazy SHP-2 powoduje także defosforylację kinazy FAK (Focal Adhesion Kinase) będącej także regulatorem ruchliwości i kształtu komórki. Dodatkowo C-terminalny koniec (FAT) białka poprzez oddziaływanie z białkiem odpowiedzialnym za adhezję komórek, paksyliną, wpływa na procesy adhezji komórek nabłonka do siebie oraz rearanżację cytoszkieletu aktywnego. Spadek poziomu aktywnego (ufosforylowanego) białka FAK dodatkowo wzmacnia zmiany w fenotypie komórek nabłonka [72].

#### 3.2. Interakcje z kinazami obecnymi w komórce gospodarza

Białko Crk pełni istotne funkcje w procesach proliferacji, adhezji i migracji komórek. Wpływa na szlaki apoptotyczne, regulacyjne, fagocytarne i endocytarne jak również na regulację ekspresji genów [12]. Crk podobnie jak SHP-2 aktywuje kinazy Erk/MAP znane aktywatory czynników transkrypcji genów, między innymi czynnika transkrypcyjnego ELK1 (E-26 like protein 1) odpowiedzialnego za ekspresję genów promujących wzrost komórki. Ufosforylowane białko CagA oddziałując z Crk zaburza proliferację komórek co może skutkować zmianami nowotworowymi. Rozluźnianie ścisłych połączeń międzykomórkowych indukowane przez receptor dla HGF/c-Met (hepatocyte growth factor) wymaga aktywacji białka Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) oraz aktywacji białka WAVE (WASP family Verprolin-homologous protein). Białko Crk oddziałując z Rac1 i WAVE powoduje rozluźnienie połączeń między komórkami nabłonka a regulacja poziomu Rac1 poprzez kompleks CagA/Crk może pełnić kluczową rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktywnego w komórkach nabłonka. Infekcje *H. pylori* powodują również uwolnienie  $\beta$ -kanteniny z kompleksów Ajs (adherence junctions) tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe i przetransportowanie jej do jądra komórkowego gdzie aktywuje transkrypcję genów powodujących postępy zmian nowotworowych. Uwolnienie  $\beta$ -kanteniny z kompleksów Ajs również jest kontrolowane poprzez kompleks CagA/Crk [67].

Aktywność CagA podczas infekcji *H. pylori* prowadzi też do apoptozy komórek nabłonka żołądka i choroby wrzodowej żołądka, co „z punktu widzenia” *H. pylori* jest niekorzystne, ponieważ pożądana jest długotrwała kolonizacja tej niszy ekologicznej. Aby opóźnić te procesy patogen wypracował system regulujący ilość ufosforylowanego CagA. Kinaza Csk działa na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Inaktywuje ona kinazy Src fosforylujące białko CagA uniemożliwiając przyłączanie się SHP-2 do ufosforylowanych motywów EPIYA co opóźnia zmiany fenotypowe komórek i ich apoptozę. Csk jest aktywowana poprzez małą część CagA wprowadzonego do komórki, co wskazuje, że kinaza Csk konkuruje z fosfatazą SHP-2 o łączenie się z CagA. Białka CagA zawierające dużą liczbą powtórzeń odmian segmentów EPIYA-A-B powodują inhibicję wiązania się kompleksu CagA-SHP-2 tym samym zmniejszając zmiany fenotypowe zainfekowanych komórek nabłonka żołądka [37].

Zaobserwowano też drugi proces regulujący poziom ufosforylowanego CagA w komórce. Kinaza Src powoduje fosforylację CagA, z kolei ufosforylowane CagA reguluje fosforylację i defosforylację kinazy Src. Oba procesy to klasyczny przypadek sprzężenia zwrotnego ujemnego. Ufosforylowane białko CagA powoduje



zmianę konformacji kinazy Src co uniemożliwia dalsza fosforylację CagA [63].

Kortaktyna to białko oddziałujące z aktywną odgrywającą rolę w polimeryzacji i przebudowie szkieletu aktynowego. Defosforylacja kortaktyny powoduje istotne zmiany w szkielecie aktynowym komórki co doprowadza do rozluźnienia ścisłych połączeń międzykomórkowych i rozproszenia się komórek [58]. Kinaza Src o prawidłowej konformacji odpowiedzialna jest za fosforylację kortaktyny lecz zmiana konformację Src przez ufosforylowane CagA skutkuje defosforylacją kortaktyny. *H. pylori* jest jedynym znanym patogenem indukującym proces defosforylację kortaktyny [63].

#### 4. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-niezależna

##### 4.1. Zaburzenia ścisłych powiązań międzykomórkowych oraz ich polarności

Badania z wykorzystaniem komórek MDCK (Madin-Darby canine kidney) wykazały, że po infekcji *H. pylori* komórki te tracą polarność oraz zaburzone są połączenia między nimi [47]. Kinazy PAR1b/MARK2, warunkują powstawanie ścisłych połączeń międzykomórkowych oraz wpływają na polarność komórek, co umożliwia powstawanie zwartego, jednowarstwowego nabłonka, którego komórki są spolaryzowane [43]. Połączenie tych dwóch faktów sugerowało istnienie interakcji CagA z kinazami serynowo-treoninowymi PAR1b podczas infekcji *H. pylori* [78]. Udokumentowano, że rzeczywiście CagA w formie homodimeru łączy się z kinazą PAR1b za pomocą motywu CM [44]. Na powierzchni szczytowej komórki znajduje się kompleks aPKC (atypical protein kinase C) pełniący kluczową rolę w polaryzacji, podczas gdy kinaza PAR1b będąca regulatorem aktywności kompleksu aPKC, zlokalizowana jest w części lateralnej komórek. PAR1b zapobiega aktywności kompleksu aPKC w lateralnej części komórki, z kolei kompleks aPKC pośredniczy w fosforylacji PAR1b powodując aktywację tego białka, co w efekcie uniemożliwia przemieszczanie się PAR1b z części lateralnej komórki zachowując jej polarność [33]. Ścisłe połączenia międzykomórkowe tworzą się na granicy występowania kompleksu aPKC (część szczytowa) i kinazy PAR1b (część lateralna). Białko CagA powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu tego mechanizmu poprzez interakcję z PAR1b i przetransportowanie go spod bocznej błony komórkowej do części szczytowej, powodując zaburzenia powiązań międzykomórkowych oraz polarności komórek, zahamowanie biogenezy mikrotubul oraz zmiany w różnicowaniu się komórek [78]. Przypuszcza się również, że interakcja CagA z kinazą PAR1b powoduje deregulację aktywności  $\beta$ -kanteniny [40], choć nie jest to jedyny mechanizm

rozregulowujący szlak sygnalizacyjny Wnt/ $\beta$  kantenina indukowany przez CagA (patrz niżej). CagA na drodze niezależnej od fosforylacji oddziałuje również z białkiem Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). Białko to powoduje aktywację szlaku kinaz Ras/MAP, których działanie warunkuje zmiany w proliferacji komórek oraz ich ruchliwości, głównie poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NFAT (nuclear factor of activated T-cells) [49].

Dodatkowo CagA doprowadza do rozluźnienia ścisłych połączeń międzykomórkowych nabłonka na drodze niezależnej od kinaz PAR1b/MARK2, oddziałując z białkami tworzącymi ścisłe połączenia międzykomórkowe: ZO1 (zonula occludens) i JAM (junctional adhesion molecule) znajdującymi się pod powierzchnią błony komórkowej gospodarza [47].

CagA oddziałuje również z fosfolipazą C-gamma (PLC $\gamma$ ), która jest kluczowym czynnikiem powodującym aktywację kinaz Erk powodujących zmiany w polimeryzacji aktyny skutkujące rozpraszaniem się ścisłe powiązanych ze sobą komórek. Inhibicja fosfolipazy C-gamma może zapobiegać rozpraszaniu się komórek, co potencjalnie może zostać wykorzystane w strategii zapobiegania rozwojowi nowotworu [20].

Kontrowersyjne są dane dotyczące oddziaływania CagA z receptorem C-met dla HGF (hepatocyte growth factor) stymulującym mitozę, ruchliwość komórek oraz ich morfogenezę. Początkowe badania wskazywały, że CagA powoduje aktywację tego receptora, poprzez pośrednią indukcję jego fosforylacji [8]. Jednakże badania z 2009 roku, prowadzone na komórkach z unieczynionym genem C-met nie potwierdziły tych obserwacji. Autorzy sugerują, że infekcja *H. pylori* wpływa na sygnalizację związaną z c-met indukującą ruchliwość komórek ale w sposób niezależny od białka CagA [65].

##### 4.2. Destabilizacja kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -kantenina

Deregulacja poziomu  $\beta$ -kantenina może także odbywać się na drodze niezależnej od kinaz PAR1b. Multimer CagA bezpośrednio oddziałuje E-kadheryną powodując obniżenie stabilności kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -kantenina w błonie komórkowej [66]. Proces ten skutkuje translokacją  $\beta$ -kanteniny z błony komórkowej do cytoplazmy oraz jądra komórkowego i aktywacją transkrypcji niektórych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za ekspresję genów warunkujących różnicowanie się komórek [40]. W konsekwencji ten rodzaj oddziaływań może doprowadzać do rozwoju metaplastji oraz zmian przednowotworowych. Zmiany w aktywności i lokalizacji  $\beta$ -kanteniny mogą być także indukowane poprzez interakcję CagA-Crk, o czym wspomniano w podrozdziale 3.2, co dowodzi, że zmiany te mogą być powodowane zarówno

poprzez mechanizmy fosforylacyjno-zależne jak również fosforylacyjno-niezależne [67, 40, 50]. Aktywność  $\beta$ -kanteniny jest istotnym czynnikiem w procesie nowotworzenia. Dowiodły tego badania przeprowadzone na modelu mysim, u których unieczynniono gen kodujący  $\beta$ -kanteninę, co skutkowało wzrostem częstości występowania zmian nowotworowych wątroby, trzustki oraz odbytu. Dodatkowo translokacja  $\beta$ -kanteniny do jądra komórkowego doprowadza do podwyższenia poziomu czynnika transkrypcyjnego Lef/TCF (T-cell factor) stymulującego proliferację komórek, co wpływa na proces onkogenezy [22].

### 4.3. Deregulacja czynników transkrypcyjnych

Aktywacja wielu szlaków sygnalizacyjnych przez CagA zarówno na drodze zależnej jak i niezależnej od fosforylacji prowadzi do indukcji ekspresji genów kodujących kilku czynników transkrypcyjnych takich jak: ELK, NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), NFAT, czy TCF. Ekspresja genu kodującego czynnik ELK1 jest aktywowana poprzez interakcję CagA z fosfatazą SHP-2 oraz z białkiem Grb2. Zatem zmiany w poziomie ELK1 są skutkiem działania CagA zarówno na drodze zależnej jak i niezależnej od fosforylacji [30]. NF- $\kappa$ B jest aktywowany głównie poprzez szlaki kinaz Ras/MAP i dodatkowo przez mechanizm niezależny od CagA, poprzez wprowadzenie przez IV system sekrecji fragmentów rozpadu peptydoglikanu oddziałujących na receptory NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1). NF- $\kappa$ B indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych za wytwarzanie interleukiny 8 (cytokiny prozapalnej), metaloproteaz oraz genów anty-apoptotycznych [46, 74]. Infekcja *H. pylori* poprzez interakcję CagA z fosfolipazą gamma, powodującą gromadzenie się w komórce jonów wapniowych doprowadza także do podwyższenia poziomu kalcyneuryny – fosfatazy serynowo-teroninowej, wpływającej na poziom czynnika transkrypcyjnego NFAT, aktywującego limfocyty T. NFAT doprowadza do zahamowania proliferacji komórek, co jest procesem antagonistycznym do procesu aktywacji proliferacji poprzez kinazy Ras/MAP [8, 77]. Cytotoksyna VacA również powoduje aktywację tego czynnika transkrypcyjnego, sekrecja VacA jest zsynchronizowana z wprowadzeniem CagA do komórek nabłonka co dowodzi, że obie cytotoksyny wzajemnie ze sobą oddziałują [3].

### 5. CagA jest onkoproteina – doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznym myszy

Wyżej przedstawiono skomplikowane przemiany szlaków metabolicznych indukowane przez białko CagA *H. pylori* dostarczane do komórek gospodarza przez

IV system sekrecji. Wiele z nich, co wykazano w eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem różnych linii komórkowych może odgrywać kluczową rolę w procesach nowotworzenia. Doświadczenia na modelu zwierzęcym (mongolskich myszokoczkach) zakażonych *H. pylori* wykazały korelację pomiędzy interakcją komórek nabłonkowych z CagA, a rozwojem nowotworu przewodu pokarmowego, co potwierdza hipotezę o onkogenym działaniu tego białka [59, 64]. Dalsze eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem transgenicznym myszy wytwarzających dwa rodzaje CagA: typ dziki oraz białko zmutowane – nieulegające procesowi fosforylacji. U myszy produkujących dziką formę CagA powstawały zmiany fenotypu tkanek nabłonkowych przewodu pokarmowego prowadzące do rozwoju hiperplazji oraz nowotworu żołądka i jelita cienkiego oraz nowotwory układu odpornościowego. U myszy, które produkowały CagA nieulegające fosforylacji nie zaobserwowano takich zmian. Badania te bezspornie potwierdziły, że CagA jest onkoproteina oraz dowiodły jak ważną rolę w zmianach fenotypowych komórek odgrywa proces fosforylacji [55].

Na bezpośredni wpływ białka CagA na procesy nowotworzenia wskazuje także wyniki eksperymentów *in vitro* (co-immunoprecypitacja oraz eksperymenty typu „pull-down”) w których wykazano bezpośrednie oddziaływanie CagA z białkiem RUNX3, obecnym w wielu tkankach supresorem nowotworów, często nieaktywnym w komórkach raka żołądka. Oddziaływanie pomiędzy domeną WW CagA a motywem PY RUNX3 indukuje ubiquitytację białka supresorowego i kieruje go na drogę degradacji [70].

Poznanie podstaw rozwoju choroby nowotworowej zaindukowanej aktywnością CagA może być podstawą do zrozumienia generalnych mechanizmów warunkujących procesy nowotworzenia związane z infekcjami lub reakcjami zapalnymi organizmu [21, 75]. Doświadczenia badające stabilność CagA w komórkach nabłonkowych żołądka dowiodły, że CagA jest białkiem „krótko żyjącym”, a jego degradacja jest procesem niezależnym od proteosomu 26S. Oprócz tego udokumentowano, że zablokowanie oddziaływania CagA z kinazą PAR1b skutkuje kierowaniem CagA na drogę degradacji. Fakt ten może być wykorzystany w opracowaniu nowych metod profilaktycznych – zapobieganiu powstawaniu nowotworu, polegającym na hamowaniu oddziaływania białka CagA z kinazą PAR1b [34].

### 6. Podsumowanie

Rozwój nowotworu jest to proces wieloetapowy wymagający zmian w ekspresji onkogenów oraz genów supresorów nowotworowych komórek gospodarza. Wprowadzone CagA oddziałuje z białkami gospodarza



na drodze zależnej i niezależnej od fosforylacji powodując zmiany w ruchliwości, proliferacji komórek oraz osłabiając połączenia między nimi, tym samym powodując zmiany w architekturze nabłonka żołądka. Dobrze udokumentowano, że aktywność CagA powoduje rozwój metaplastji, dysplazji, a w efekcie nowotworu tkanki nabłonkowej żołądka. Główną rolę w tym procesie odgrywa interakcja CagA z SHP-2 – wewnątrzkomórkowym onkogenem, choć zdumienie budzą możliwości interakcji z wieloma białkami komórek nabłonkowych prowadzące w konsekwencji do kilku procesów – ustanowienia chronicznego stanu infekcji i powolnych zmian w ruchliwości, proliferacji i polarności komórek nabłonka. Rozwój procesu nowotworzenia bez wątplenia związany jest z polimorfizmem dwu podstawowych czynników wirulencji białek VacA i CagA. Analizując polimorfizm tych genów patogenu będziemy mogli choć w przybliżeniu określić poziom ryzyka rozwoju choroby nowotworowej u konkretnego pacjenta.

Eradykacja *H. pylori* obniża prawdopodobieństwa wystąpienia nowotworu żołądka, aczkolwiek może ona prowadzić do powstawania choroby refluksowej przełykowej żołądka, która również stwarza ryzyko powstawania nowotworu (w tym przypadku nowotworu przełyku). Poznawanie podłoża molekularnego działania CagA może doprowadzić do opracowania rewolucyjnych metod zapobiegania rozwojowi choroby nowotworowej nawet bez konieczności usuwania infekcji.

## Piśmiennictwo

- Amieva M.R., Vogelmann R., Covacci A., Tompkins L.S., Nelson W.J., Falkow S.: Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, **300**, 1430–1434 (2003)
- Andrzejewska J., Lee S.K., Olbermann P., Lotzing N., Katzowitsch E., Linz B., Achtman M., Kado C.I., Suerbaum S., Josenhans C.: Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J. Bacteriol.* **188**, 5865–5877 (2006)
- Atherton J.C., Cao P., Peek R.M., Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L.: Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**, 17771–17777 (1995)
- Backert S., Selbach M.: Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.* **10**, 1573–1581 (2008)
- Birge R.B., Kalodimos C., Inagaki F., Tanaka S.: Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun. Signal.* **7**, 13 (2009)
- Brandt S., Kwok T., Hartig R., Konig W., Backert S.: NF-kappa B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9300–9305 (2005)
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A.: Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14648–14653 (1996)
- Churin Y., Al-Ghoul L., Kepp O., Meyer T.F., Birchmeier W., Naumann M.: *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response. *J. Cell. Biol.* **161**, 249–255 (2003)
- Correa P.: Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer. Res.* **52**, 6735–6740 (1992)
- Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burroni D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N. i wsp.: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5791–5795 (1993)
- Cover T.L., Dooley C.P., Blaser M.J.: Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* **58**, 603–610 (1990)
- Cover T.L., Blanke S.R.: *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 320–332 (2005)
- Crabtree J.E., Taylor J.D., Wyatt J.I., Heatley R.V., Shallcross T.M., Tompkins D.S., Rathbone B.J.: Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet*, **338**, 332–335 (1991)
- Ding S.Z., Fischer W., Kaparakis-Liaskos M., Liechti G., Merrell D.S., Grant P.A., Ferrero R.L., Crowe S.E., Haas R., Hatakeyama M. i wsp.: *Helicobacter pylori*-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis. *PLoS One*, **5**, e9875 (2010)
- Dziesięszewski J.J.M.P.: Postępowanie w zakażeniu *Helicobacter pylori*. Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa gastroenterologicznego ds. zakażenia *Helicobacter pylori*. *Gastroenterologia Polska*, **5**, 323–331 (2008)
- El-Etr S.H., Mueller A., Tompkins L.S., Falkow S., Merrell D.S.: Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *J. Infect. Dis.* **190**, 1516–1523 (2004)
- Ferrasi A.C., Pinheiro N.A., Rabenhorst S.H., Caballero O.L., Rodrigues M.A., de Carvalho F., Leite C.V., Ferreira M.V., Barros M.A., Pardini M.I.: *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J. Gastroenterol.* **16**, 312–319 (2010)
- Fincham V.J., Frame M.C.: The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J.* **17**, 81–92 (1998)
- Fischer W., Puls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., Haas R.: Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**, 1337–1348 (2001)
- Franke R., Muller M., Wundrack N., Gilles E.D., Klamt S., Kahne T., Naumann M.: Host-pathogen systems biology: logical modelling of hepatocyte growth factor and *Helicobacter pylori* induced c-Met signal transduction. *BMC Syst. Biol.* **2**, 4 (2008)
- Fukase K., Kato M., Kikuchi S., Inoue K., Uemura N., Okamoto S., Terao S., Amagai K., Hayashi S., Asaka M.: Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of meta-chronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, **372**, 392–397 (2008)

22. Giles R.H., van Es J.H., Clevers H.: Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1653**, 1–24 (2003)
23. Granstrom M., Tindberg Y., Blennow M.: Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 468–470 (1997)
24. Hatakeyama M., Higashi H.: *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* **96**, 835–843 (2005)
25. Hatakeyama M. SAgA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 30–37 (2008)
26. Hatakeyama M.: Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene*, **27**, 7047–7054 (2008)
27. Higashi H., Tsutsumi R., Fujita A., Yamazaki S., Asaka M., Azuma T., Hatakeyama M.: Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14428–14433 (2002)
28. Higashi H., Tsutsumi R., Muto S., Sugiyama T., Azuma T., Asaka M., Hatakeyama M.: SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**, 683–686 (2002)
29. Higashi H., Nakaya A., Tsutsumi R., K., Fujii Y., Ishikawa S., Higuchi M., Takahashi A., Kurashima Y., Teishikata Y. i wsp.: *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 17205–17216 (2004)
30. Hirata Y., Maeda S., Mitsuno Y., Tateishi K., Yanai A., Akanuma M., Yoshida H., Kawabe T., Shiratori Y., Omata M. *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology*, **123**, 1962–1971 (2002)
31. Hof P., Pluskey S., Dhe-Paganon S., Eck M.J., Shoelson S.E.: Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*, **92**, 441–450 (1998)
32. Houghton J., Sticov C., Nomura S., Rogers A.B., Carlson J., Li H., Cai X., Fox J.G., Goldenring J.R., Wang T.C.: Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, **306**, 1568–1571 (2004)
33. Hurov J.B., Watkins J.L., Piwnicka-Worms H.: Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr. Biol.* **14**, 736–741 (2004)
34. Ishikawa S., Ohta T., Hatakeyama M.: Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS Lett.* **583**, 2414–2418 (2009)
35. Jagusztyn-Krynicka E.K., Godlewska R.: New approaches for *Helicobacter* vaccine development-difficulties and progress. *Pol. J. Microbiol.* **57**, 3–9 (2008)
36. Jimenez-Soto L.F., Kutter S., Sewald X., Ertl C., Weiss E., Kapp U., Rohde M., Pirch T., Jung K., Retta S.F. i wsp.: *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog.* **5**, e1000684 (2009)
37. Jones K.R., Joo Y.M., Jang S., Yoo Y.J., Lee H.S., Chung I.S., Olsen C.H., Whitmire J.M., Merrell D.S., Cha J.H.: Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 959–968 (2009)
38. Kaise M., Yamasaki T., Yonezawa J., Miwa J., Ohta Y., Tajiri H.: CpG island hypermethylation of tumor-suppressor genes in *H. pylori*-infected non-neoplastic gastric mucosa is linked with gastric cancer risk. *Helicobacter*, **13**, 35–41 (2008)
39. Kang G.H., Lee H.J., Hwang K.S., Lee S., Kim J.H., Kim J.S.: Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am. J. Pathol.* **163**, 1551–1556 (2003)
40. Kurashima Y., Murata-Kamiya N., Kikuchi K., Higashi H., Azuma T., Kondo S., Hatakeyama M.: Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int. J. Cancer.* **122**, 823–831 (2008)
41. Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449–490 (2006)
42. Kwok T., Zabler D., Urman S., Rohde M., Hartig R., Wessler S., Misselwitz R., Berger J., Sewald N., Konig W. i wsp.: *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, **449**, 862–866 (2007)
43. Li C.X., Poznansky M.J.: Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J. Cell. Sci.* **97** (Pt 2), 231–237 (1990)
44. Lu H.S., Saito Y., Umeda M., Murata-Kamiya N., Zhang H.M., Higashi H., Hatakeyama M.: Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci.* **99**, 2004–2011 (2008)
45. Maekita T., Nakazawa K., Mihara M., Nakajima T., Yanaoka K., Iguchi M., Arii K., Kaneda A., Tsukamoto T., Tatematsu M. i wsp.: High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin. Cancer Res.* **12**, 989–995 (2006)
46. Malfertheiner P., Bornschein J., Selgrad M.: Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: a chance for prevention. *J. Dig. Dis.* **11**, 2–11 (2010)
47. Marshall B.: *Helicobacter pylori*: past, present and future. *Keio J. Med.* **52**, 80–85 (2003)
48. Matsumoto Y., Marusawa H., Kinoshita K., Endo Y., Kou T., Morisawa T., Azuma T., Okazaki I.M., Honjo T., Chiba T.: *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat. Med.* **13**, 470–476 (2007)
49. Mimuro H., Suzuki T., Tanaka J., Asahi M., Haas R., Sasaki C.: Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol. Cell.* **10**, 745–755 (2002)
50. Murata-Kamiya N., Kurashima Y., Teishikata Y., Yamahashi Y., Saito Y., Higashi H., Aburatani H., Akiyama T., Peek R.M., Jr., Azuma T. i wsp.: *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, **26**, 4617–4626 (2007)
51. Nakajima T., Enomoto S., Yamashita S., Ando T., Nakanishi Y., Nakazawa K., Oda I., Gotoda T., Ushijima T.: Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J. Gastroenterol.* **45**, 37–44 (2010)
52. Narumi Y., Isomoto H., Shiota M., Sato K., Kondo S., Machida H., Yanagihara K., Mizuta Y., Kohno S., Tsukamoto K.: Polymorphisms of PTPN11 coding SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J. Clin. Immunol.* **29**, 303–310 (2009)
53. Neel B.G., Gu H., Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284–293 (2003)
54. Nguyen L.T., Uchida T., Murakami K., Fujioka T., Moriyama M.: *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1445–1453 (2008)
55. Ohnishi N., Yuasa H., Tanaka S., Sawa H., Miura M., Matsuhi A., Higashi H., Musashi M., Iwabuchi K., Suzuki M. i wsp.: Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1003–1008 (2008)

56. Patis I., Weiss E., Laugks R., Haas R., Fischer W.: The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology*, **153**, 2896–2909 (2007)
57. Ren S., Higashi H., Lu H., Azuma T., Hatakeyama M.: Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 32344–32352 (2006)
58. Ren G., Crampton M.S., Yap A.S.: Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **66**, 865–873 (2009)
59. Rieder G., Merchant J.L., Haas R.: *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, **128**, 1229–1242 (2005)
60. Roovers K., Assoian R.K.: Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays*, **22**, 818–826 (2000)
61. Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y., Lu H., Ohnishi N., Azuma T., Suzuki A. i wsp.: *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, **447**, 330–333 (2007)
62. Schneider B.G., Peng D.F., Camargo M.C., Piazuelo M.B., Sicinski L.A., Mera R., Romero-Gallo J., Delgado A.G., Bravo L.E., Wilson K.T. i wsp.: Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int. J. Cancer*. **127**, 2588–2597 (2010)
63. Selbach M., Moese S., Hurwitz R., Hauck C.R., Meyer T.F., Backert S.: The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* **22**, 515–528 (2003)
64. Shibata W., Hirata Y., Maeda S., Ogura K., Ohmae T., Yanai A., Mitsuno Y., Yamaji Y., Okamoto M., Yoshida H. i wsp.: CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J. Pathol.* **210**, 306–314(2006)
65. Snider J.L., Cardelli J.A.: *Helicobacter pylori* induces cancer cell motility independent of the c-Met receptor. *J. Carcinog.* **8**, 7 (2009)
66. Sokolova O., Bozko P.M., Naumann M.: *Helicobacter pylori* suppresses glycogen synthase kinase 3beta to promote beta-catenin activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 29367–29374 (2008)
67. Suzuki M., Mimuro H., Suzuki T., Park M., Yamamoto T., Sasakawa C.: Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* **202**, 1235–1247 (2005)
68. Tammer I., Brandt S., Hartig R., König W., Backert S.: Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*, **132**, 1309–1319(2007)
69. Tanaka J., Suzuki T., Mimuro H., Sasakawa C.: Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* **5**, 395–404 (2003)
70. Tsang Y.H., Lamb A., Romero-Gallo J., Huang B., Ito K., Peek R.M., Jr., Ito K., Chen L.F.: *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, **29**, 5643–5650 (2010)
71. Tsutsumi R., Higashi H., Higuchi M., Okada M., Hatakeyama M.: Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 3664–3670 (2003)
72. Tsutsumi R., Takahashi A., Azuma T., Higashi H., Hatakeyama M.: Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell Biol.* **26**, 261–276(2006)
73. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J.: Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**, 1799–1809 (1993)
74. Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., Memet S., Huerre M.R., Coyle A.J. i wsp.: Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**, 1166–1174 (2004)
75. Wong B.C., Lam S.K., Wong W.M., Chen J.S., Zheng T.T., Feng R.E., Lai K.C., Hu W.H., Yuen S.T., Leung S.Y. i wsp.: *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*, **291**, 187–194 (2004)
76. Yamaoka Y., El-Zimaity H.M., Gutierrez O., Figura N., Kim J.G., Kodama T., Kashima K., Graham D.Y.: Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology*, **117**, 342–349 (1999)
77. Yokoyama K., Higashi H., Ishikawa S., Fujii Y., Kondo S., Kato H., Azuma T., Wada A., Hirayama T., Aburatani H. i wsp.: Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9661–9666 (2005)
78. Zeaiter Z., Cohen D., Musch A., Bagnoli F., Covacci A., Stein M.: Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol.* **10**, 781–794(2008)



Monika Kordowska-Wiater<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Drożdże w ochronie owoców i warzyw przed chorobami pochodzenia grzybowego. 3. Zastosowanie drożdży do hamowania fitopatogenów grzybowych pochodzenia glebowego. 4. Mechanizmy antagonistycznego działania drożdży. 4.1. Konkurencja o składniki odżywcze i przestrzeń. 4.2. Produkcja czynników antybiotycznych. 4.3. Produkcja enzymów litycznych. 4.4. Indukcja odporności roślin. 5. Poprawa skuteczności czynników biokontroli. 6. Preparaty ochronne oparte o drożdże. 7. Perspektywy stosowania drożdży antagonistycznych. 8. Podsumowanie

### Yeasts as biological control agents for plants

**Abstract:** Yeasts can be used for biocontrol of fungal phytopathogens of plants. Antagonistic strains have been selected from different plant niches. The most effective are *Cryptococcus laurentii*, *Candida sake*, *C. oleophila*, *Metschnikowia* spp. and yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*, which are able to reduce or inhibit the growth of fungi such as e.g. *Botrytis*, *Penicillium* and *Rhizopus* causing rots of fruit and vegetables or act on other field phytopathogens. Some yeasts from rhizosphere are able to promote plant growth. Different modes of yeast action have been suggested to be responsible for biological control: competition for nutrients and space on plant organ surfaces, antibiotic production, lytic enzyme (mainly glucanases and chitinases) excretion and induction of plant resistance by specific enzymes and phytohormone production. Since the effectiveness of investigated yeasts is sometimes insufficient, different kinds of biocontrol improvement have been investigated and antagonist mixture, addition of adjuvants, natural substances, mild fungicides or modification of physical agents have been suggested. Formulas of effective biocontrol preparations based on yeasts have been under investigation. Freezing, freeze-drying and vacuum-drying have been proposed to be the best methods of yeasts stabilization. High viability, stability, efficiency of cells and safety during the storage of products have been the goal of investigations. Some commercial preparations have been registered e.g. "Shemer" based on *Metschnikowia fructicola* action, "Candifruit" based on *Candida sake* which can be used for protection of fruit and vegetables. Nowadays, the importance of this kind of protective products is restricted but in the future there is a chance for propagation of biocontrol yeast formulas.

1. Introduction. 2. Yeasts in fruit and vegetable protection against diseases of fungal origin. 3. Application of yeasts for inhibition of fungal phytopathogens of soil origin. 4. Mechanisms of antagonistic action of yeasts. 4.1. Competition for nutrients and space. 4.2. Antibiotic agent production. 4.3. Lytic enzyme production. 4.4 Induction of plant resistance. 5. Improvement of biocontrol agent efficiency. 6. Protective products based on yeasts. 7. Perspectives of antagonistic yeast application. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** antagonizm, biokontrola, drożdże, fitopatogeny

**Key words:** antagonism, biocontrol, yeasts, phytopathogens

## 1. Wstęp

Rośliny uprawne, w tym owoce i warzywa w czasie wzrostu, jak i po zbiorze narażone są na choroby wywołane mikroorganizmami. Oczywistym efektem występowania chorób jest obniżenie zbiorów i pogorszenie ich jakości. Sumaryczne straty w produkcji roślinnej wywołane przez choroby i szkodniki roślin szacowane są przez Światową Organizację Wyżywienia i Rolnictwa na około 30% rocznie w skali całego świata. Występowanie chorób roślin podnosi również koszty produkcji roślinnej oraz ma skutki estetyczne poprzez obniżanie walorów zdobniczych [48].

Mykozy roślin, choroby powodowane przez grzyby, stanowią najliczniejszą i najistotniejszą z gospodarczego punktu widzenia grupę chorób. Jak wiadomo, do walki z nimi stosuje się fungicydy, które mimo skuteczności i prostoty użycia, nie cieszą się uznaniem ze względu

na zagrożenie bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów spowodowane pozostałościami fungicydów w roślinach, uodparnianie się patogenów na środki chemiczne, redukcję organizmów pożytecznych, a także trudności i duże koszty wynalezienia nowych, bezpiecznych preparatów. Te zastrzeżenia do stosowania fungicydów spowodowały wzrost zainteresowania biologicznymi metodami ochrony roślin [80]. Klasyczna definicja głosi, że biologiczna metoda ochrony polega na ograniczaniu rozwoju organizmów szkodliwych dla roślin za pomocą czynników biologicznych – innych organizmów lub produktów ich metabolizmu [47]. Badania nad czynnikami biologicznymi, służącymi do zwalczania flory patogennej koncentrują się na poszukiwaniu mikroorganizmów antagonistycznych dla patogenów ran, gdyż do infekcji przez zarodniki grzybów dochodzi najczęściej poprzez miejsce zranienia tkanki roślinnej. Dlatego też szybka kolonizacja i wzrost antagonisty w miejscu zranienia

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; tel. 81 462 33 57; e-mail: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl



decydują o jego skuteczności. Proces infekcji owoców i warzyw odpowiedzialny za ich gnicie może nastąpić w okresie pomiędzy kwitnieniem, a uzyskaniem dojrzałości lub w czasie zbiorów. Użycie mikroorganizmów do kontroli chorób roślin wymaga zakłócenia jakiegoś etapu choroby lub cyklu życia patogenu, zwykle ich działanie dotyczy prewencji infekcji, redukcji kolonizacji tkanek gospodarza lub sporulacji i przeżycia patogenu [71]. Aby skutecznie zapobiegać infekcjom surowców roślinnych przez grzyby fitopatogenne, antagonistą powinien być obecny na ich powierzchni przed wystąpieniem infekcji. Powinien charakteryzować się wysoką zdolnością do kolonizacji powierzchni ran, szybkim wzrostem, zdolnością do wykorzystania składników odżywczych występujących w małych ilościach w miejscach zranienia oraz większą zdolnością do przeżycia i rozwoju niż patogen w szerokim zakresie temperatur, pH i ciśnienia osmotycznego. Powinien być skuteczny nawet w niskich stężeniach oraz mieć szerokie spektrum działania. Powinien być stabilny genetycznie, mieć umiarkowane wymagania odżywcze i nie powinien produkować metabolitów szkodliwych dla zdrowia ludzi oraz nie wywierać szkodliwego działania na surowiec. Powinien również charakteryzować się odpornością na pestycydy [21].

Wiele czynników biokontroli egzystuje naturalnie na liściach roślin, korzeniach i innych strukturach jako epifity lub saprofity wykorzystujące składniki odżywcze w danej niszy ekologicznej. Intensywne badania nad takimi mikroorganizmami trwają od około 25 lat i doprowadziły do komercyjnego użycia zarejestrowanych czynników biologicznych do kontroli chorób roślin. Do grupy drobnoustrojów antagonistycznych zalicza się pożyteczne bakterie, drożdże i grzyby strzępkowe. Dużo uwagi poświęcono też bakteriom antagonistycznym, czego wynikiem są dostępne na rynku preparaty bakteryjne oparte o wykorzystanie aktywnych szczepów [80]. Grzyby strzępkowe są również przedmiotem badań nad wykorzystaniem ich w biokontroli kilka gatunków, zwłaszcza grzybów z rodzaju *Trichoderma*, posłużyło do sporządzenia komercyjnych preparatów do ochrony różnych upraw – patrz publikacje na ten temat [47, 61, 62, 70, 71, 99]. Niniejsza praca koncentruje się na wykorzystaniu drożdży jako czynników ochrony biologicznej, nad którymi prowadzi się w ostatnich latach badania zarówno laboratoryjne, jak i polowe, ale także pojawiają się na rynku środków ochrony roślin preparaty oparte o ich działanie.

## 2. Drożdże w ochronie owoców i warzyw przed chorobami pochodzenia grzybowego

Pierwsze badania dotyczące zastosowania drożdży antagonistycznych w stosunku do grzybów patogennych, atakujących po zbiorze owoce i warzywa koncentrowały

się na zaplikowaniu ich po zbiorze w stabilnym i kontrolowanym środowisku przechowywania, ocenie ich aktywności przeciwgrzybiczej, gdy czynniki biologiczne łatwo stosować na zgromadzone plony [97]. Według innej hipotezy użycie czynników biokontroli przed zbiorem może być bardziej korzystne niż po zbiorze, chociaż wymaga dobrego zrozumienia epidemiologii choroby, biologii, ekologii i dynamiki populacji antagonistów [5, 41].

Stosowanie drożdży po zbiorze owoców przedstawiono w licznych publikacjach, szczególnie z przełomu XX i XXI w. (Tab. I). Filonow i wsp. [31] przebadali 28 izolatów drożdży z rodzaju *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Rhodosporeidium*, *Rhodotorula*, *Sirobasidium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Tilletiopsis*, *Tremella*, *Trichosporon* i *Yarrowia* pod kątem ich ochronnego działania na jabłka zakażane konidiami *Botrytis cinerea* po zbiorze i stwierdzili najlepszą przydatność drożdży *Cryptococcus humicola* Y1266, *Filobasidium floriforme* Y7454 i *Rhodosporeidium toruloides* Y1091 do ograniczania wielkości i stopnia zaawansowania zgnilizny na jabłkach przechowywanych zarówno w temperaturze pokojowej, jak i chłodniczej. Drożdże szybko kolonizowały miejsca zranień owoców, namnażały się i ograniczały kiełkowanie i wzrost patogenu [31]. Wagner i wsp. [93] przebadali 18 szczepów drożdży i wyłonili 4 szczepy skutecznie hamujące wzrost *B. cinerea* na jabłkach podczas przechowywania. W doświadczeniu infekcyjnym najwyższy stopień hamowania wzrostu patogenu uzyskano działając drożdżami *Pichia stipitis* CBS 5773 (98,5% po 5 dniach po inokulacji, 52% po 14 dniach), *Candida melibiosica* 2515 (odpowiednio 75% i 25%) oraz *Candida butyri* JCM 1501 i *Candida parapsilosis* DSM 70125 (odpowiednio 70% i 10–13%) [93]. Skuteczne działanie antagonistyczne wobec *B. cinerea* oraz *Penicillium expansum* na jabłkach drożdży *Rhodotorula glutinis* LS11, *Cryptococcus laurentii* LS28 i *Aureobasidium pullulans* LS30 wykazali Lima i wsp. [51] podczas badań przechowalniczych w temp. 3°C i 20°C. Uzyskali oni redukcję zgnilizny o 89–91% stosując szczep LS30, LS28 ograniczył zmiany chorobowe na jabłkach o 86–91% w temp. pokojowej, zaś izolat LS11 był najskuteczniejszy w temp. 3°C dając redukcję zmian o 63–72% [51]. Z kolei Qin i wsp. [72] zastosowali drożdże: *Trichosporon pullulans*, *C. laurentii*, *R. glutinis* i *Pichia membranefaciens* do pozbiorowej ochrony czerśni przed *Alternaria alternata*, *P. expansum*, *B. cinerea* i *Rhizopus stolonifer* i stwierdzili skuteczną ochronę owoców (zmiany gnilne mniejsze niż w kontroli o 73–94%) przez *T. pullulans* w temp. 25°C, zaś przez *R. glutinis* w 0°C. W badaniach laboratoryjnych Schena i wsp. [79] przebadali właściwości antagonistyczne izolatów drożdży z gatunków: *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia* spp. wobec *B. cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger* i *R. stolonifer* na owocach winogron, grejfrutach i pomi-

Tabela I

## Drożdże wykorzystywane w ochronie biologicznej roślin

Drożdże – skuteczni antagoniści	Grzyby fitopatogenne	Rośliny (plony)	Piśmiennictwo
Aplikacja po zbiorze			
<i>Cryptococcus humicola</i> , <i>Filobasidium floriforme</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Jabłka	[31]
<i>Pichia stipitis</i> , <i>Candida melibiosica</i> , <i>C. butyri</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Jabłka	[93]
<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Jabłka	[51]
<i>Trichosporon pullulans</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Czereśnie	[72]
<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Candida oleophila</i> , <i>Metschnikowia</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Winogrona, grapefruity, pomidory	[79]
<i>Pseudozyma fusiformata</i> , <i>Metschnikowia</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Monilinia laxa</i>	Brzoskwinie	[102]
<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	Brzoskwinie nektaryny	[30]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	Morele	[36]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Jabłka	[44]
Aplikacja przed zbiorem			
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , and <i>Pezizula malicorticis</i>	Jabłka	[49]
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Truskawki	[52]
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Monilinia laxa</i>	Czereśnie	[98]
<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Jabłka	[87]
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Winogrona	[41]
<i>Metschnikowia</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>	Winogrona	[79]
<i>Candida infirmominatus</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Gruszki	[9]
<i>Candida valida</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Trichosporon asahii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Buraki cukrowe	[28]
<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Candida slooffiae</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Cephalosporium maydis</i>	Kukurydza	[25]
<i>Saccharomyces unispora</i> , <i>Candida steatolytica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fasola	[26]

dorach. Uzyskali bardzo wysoki poziom redukcji zgnilizn, uzależniony od gęstości zawiesin drożdży, sięgający nawet blisko 100% w przypadku *Botrytis* i *Rhizopus*, a najefektywniejszym szczepem okazał się izolat *Metschnikowia* LS15 [79]. Zhang i wsp. [102] wyizolowali spośród 210 izolatów drożdży i grzybów drożdżopodobnych 3 izolaty zidentyfikowane jako *Pseudozyma fusiformata*, *Metschnikowia* sp. i *A. pullulans*, które dobrze chroniły owoce brzoskwinii przed *Monilinia laxa* po zbiorze ograniczając występowanie zmian gnilnych odpowiednio do 29,3%, 21,3% i 29,3% (stosując gęstość komórek  $1 \times 10^8$ /ml). Badacze wykazali, że żywe komórki antagonistów w znacznym stopniu hamowały kiełkowanie zarodników i wydłużanie strzępek kielkowych [102]. O działaniu ochronnym *Metschnikowia fructicola*

na owocach brzoskwinii i nektaryny przeciw rozwojowi *Monilinia fructigena* po zbiorze donieśli Ferrari i wsp. [30], a o zastosowaniu *Metschnikowia pulcherrima* przeciw brunatnej zgniliznie moreli pisali Grebenisan i wsp. [36]. Z kolei Janisiewicz i wsp. [44] badali zdolności różnych szczepów wyżej wymienionego gatunku drożdży do hamowania zgnilizny powodowanej przez *P. expansum* na jabłkach i uzyskali zadowalające rezultaty, chociaż różnicowanie między szczepami w potencjale biokontrolnym było widoczne.

Druga koncepcja stosowania drożdży do pozbiorowej ochrony owoców i warzyw dotyczy aplikacji tych drobnoustrojów przed zbiorem, jeszcze podczas uprawy. Wiele patogenów właśnie wtedy dostaje się do rośliny (infekcje ukryte i spokojne), a powodowane przez nie

zgnilizny pojawiają się dopiero na dojrzałych owocach [41]. Użycie drożdży na polu, szczególnie przed infekcją patogenem, może wówczas być bardziej efektywne. Oczywiście antagonistą wykorzystywanym do aplikacji polowej powinien być bardziej odporny niż antagonistą stosowany po zbiorze na niskie stężenia składników odżywczych, promieniowanie UV, suszę, gwałtowne zmiany klimatu czy obecność środków chemicznych [41, 49]. Powinien również wykazać się szybko i skuteczną zdolnością kolonizacji powierzchni roślin, zwłaszcza organów docelowych [41]. Drożdże aplikowane przed zbiorem przedstawiono w Tab. I. Gatunki *A. pullulans* oraz *R. glutinis* w badaniach Leibernera i wsp. [49] po zaaplikowaniu na jabłonie wykazały wysoką adaptację do warunków polowych i przechowywania w chłodni przez okres 6 miesięcy. Stwierdzono, że ochrona kwiatów truskawki, które stanowią wrota infekcji, jest kluczową strategią zapobiegania rozwojowi *B. cinerea* zarówno przez środki biologiczne, jak i chemiczne. Stwierdzono, że grzyby drożdżopodobne *A. pullulans* oraz drożdże *C. oleophila* były bardziej efektywne wobec zgnilizny przechowalniczej *B. cinerea* na truskawkach, gdy były stosowane na polu w porównaniu z użyciem bezpośrednio po zbiorze. Oba drobnoustroje kolonizowały kwiaty i nie dopuszczały do infekcji przez *B. cinerea* [52]. Aplikacja *A. pullulans* i *Epicoccum purpurascens* na kwiaty czereśni redukowałą liczbę ukrytych infekcji przez *Monilinia laxa* w zielonych owocach [98]. Dobre rezultaty może dać zastosowanie drożdży tuż przed zbiorem, aby przeciwdziałać rozwojowi patogenów w rankach powstałych podczas uszkodzeń w trakcie zbioru lub po nim. *Candida sake* zaaplikowane 2 dni przed zbiorem skutecznie przeciwdziałały rozwojowi niebieskiej zgnilizny na jabłkach przez 4 miesiące przechowywania [87]. *A. pullulans* zastosowany na truskawki bezpośrednio przed zbiorem redukowałą zgniliznę *Rhizopus* o 72%, natomiast słabo działał na *Botrytis* [52]. Innym wskazaniem dla aplikacji preparatów drożdżowych przed zbiorem jest specyfika owoców, które posiadają woskowe naloty (winogrona) lub niekorzystny jest ich kontakt z wodą podczas przechowywania (truskawki). Ben-Arie i wsp. [41] badali działanie drożdży *P. guilliermondii* na hamowanie zgnilizny pozbiorowej na winogronach aplikując antagonistę przed i po zbiorze owoców. Stwierdzili skuteczny efekt hamujący w obu przypadkach, lecz preparat aplikowany po zbiorze usunął powierzchniowy nalot, co nie było korzystne dla owoców [41]. Schena i wsp. [79] zastosowali szczep *Metschnikowia* LS15 na owoce winogron przed zbiorem i przy pięciokrotnych opryskach zawiesiną antagonisty uzyskali redukcję zmian chorobowych wywołanych *B. cinerea* o 38,2%, jednak populacja drożdży w warunkach polowych szybko zmniejszała się. Drożdże *Cryptococcus infirmominatus*, *C. laurentii* i *R. glutinis* zastosowano 1 dzień lub 3 tygodnie przed zbiorem do hamowania szarej i niebieskiej

zgnilizny na gruszkach. Obiecujące wyniki uzyskano dla *C. infirmominatus*, które po aplikacji przez 3 tygodnie utrzymywały liczebność na wysokim poziomie i kilkakrotnie zmniejszały ogólny stan zmian chorobowych w trakcie przechowywania owoców [9].

### 3. Zastosowanie drożdży do hamowania fitopatógenów grzybowych pochodzenia glebowego

El-Tarabily [28] doniósł o zastosowaniu trzech gatunków drożdży: *Candida valida*, *R. glutinis* i *Trichosporon asahii* z ryzosfery buraka cukrowego, które indywidualnie lub w kombinacji redukowałą zgorzel siewek i zgniliznę korzeni buraka cukrowego powodowaną przez *Rhizoctonia solani* AG-2-2. Wykazano, że za aktywność przeciwgrzybową *C. valida* odpowiedzialne są różne mechanizmy: produkcja  $\beta$ -1,3-glukanazy, związków lotnych, metabolitów przeciwgrzybowych, obecność lotnych związków inhibujących stwierdzono u *R. glutinis* a u *T. asahii* wydzielanie metabolitów przeciwgrzybowych. Badane drożdże stosowano również w kombinacji do wzmocnienia działania protekcyjnego buraka cukrowego przed chorobami [28]. El-Mehalawy i wsp. [25] donieśli o zastosowaniu drożdży *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Candida slooffiae*, *Rhodotorula rubra* i *Trichosporon cutaneum* indywidualnie lub łącznie do znacznej redukcji *Cephalosporium maydis*, grzyba powodującego chorobę kukurydzy. Drożdże produkowałą dyfuzyjne metabolity antygrzybowe i enzymy degradowujące ścianę komórkową [25]. Natomiast drożdże z ryzosfery *Saccharomyces unispora* i *Candida steatolytica* znacznie ograniczały wzrost *Fusarium oxysporum*, przyczynę fuzariozy fasoli, produkując związki antybiotyczne [26] (Tab. I). Sugeruje się, że wydzieliny korzeni odgrywają znaczną rolę w efektywności drożdży w biokontroli [27].

Ważnym zjawiskiem odpowiadającym za skuteczność czynników biokontroli wobec grzybów patogennych pochodzenia glebowego jest zdolność do ochrony nasion i korzeni roślin przejawiająca się szybką kolonizacją powierzchni korzeni przez antagonistę. Zjawisko to nazwano kompetencją ryzosfery [3]. W pracy El-Tarabily [28] stwierdzono, że drożdże *C. valida* oraz *T. asahii* skolonizowałą 95% korzeni po 6 dniach od pojawienia się korzeni buraka cukrowego, zaś *R. glutinis* skolonizowałą 90% korzeni po 8 dniach. Stwierdzono, że gęstość populacji poszczególnych drożdży zmieniała się w zależności od głębokości w glebie i była największa w pierwszych 4 cm systemu korzeniowego. Jednak badania tego zjawiska u drożdży są nieliczne [26, 28], a warto byłoby wziąć je pod uwagę jako warunek wstępny do skutecznej kontroli biologicznej chorób korzeni. Obserwowany w badaniach brak niezawodnej kontroli może być związany z niepowodzeniami w kolonizacji korzeni przez badane drobnoustroje [27].



Wykazano, że niektóre drożdże pochodzące z ryzo-sfery lub gleby mogą wykazywać właściwości stymulujące wzrost roślin, a więc można je zaliczyć do grupy drobnoustrojów PGP (Plant Growth Promoting), do której należą rhizobakterie oraz grzyby strzępkowe np. z rodzaju *Trichoderma*. Drobnoustroje zaliczane do tej grupy mogą wspomagać wzrost roślin poprzez produkcję fitohormonów (gibereliny, auksyny, cytokininy), witamin, zwiększenie dostępności niektórych pierwiastków biogenych (azot, fosfor), uruchamianie składników pokarmowych z gleby i materii organicznej (np. produkcja sideroforów), zwiększenie intensywności pobierania i przemieszczania składników mineralnych oraz obniżanie aktywności patogenów glebowych [27, 99]. W literaturze można znaleźć kilka doniesień sugerujących, że drożdże wywierają efekt stymulacyjny na wzrost roślin. Peron d i i wsp. [67] zastosowali *Sporobolomyces roseus* do zwiększenia wydajności pszenicy o 16–30%, zaś Abd El-Hafez i Shehata [2] użyli drożdży z rodzaju *Rhodotorula* do zwiększenia wzrostu i owocowania pomidorów. Inokulacja gleby wspomnianymi wcześniej drożdżami *C. valida*, *R. glutinis* i *T. asahii* korzystnie wpływała na wzrost buraka cukrowego zarówno w obecności, jak i przy braku patogenu *R. solanii* w próbach szklarniowych. Wykazano, że inokulacja drożdżami spowodowała wzmocniony wzrost korzenia i pędu na skutek aktywności kwasu indolo-3-octowego (IAA), giberelin (GA3) i prawdopodobnie innych regulatorów wzrostu [28]. El-Mehalawy i wsp. [25] zauważyli, że zastosowanie drożdży *C. glabrata*, *C. maltoza*, *C. slooffiae*, *R. rubra* i *T. cutaneum* pojedynczo lub w kombinacji sprzyjało wzrostowi kukurydzy przy nieobecności *C. maydis*. El-Mehalawy [26] zauważył pozytywne działanie drożdży *S. unispora* i *C. steatolytica* na wzrost fasoli wtedy, gdy grzyb *F. oxysporum* był nieobecny.

Obecnie duże nadzieje są pokładane w działaniu drobnoustrojów endofitycznych, czyli bytujących naturalnie w tkankach roślinnych w określonej fazie cyklu życiowego i nie powodujących w nich żadnych uszkodzeń [68, 84]. Oprócz bakterii i grzybów strzępkowych, również niektóre drożdże endofityczne były badane pod kątem aktywności stymulującej wzrost roślin. Nasari i wsp. [64] wykazali, że izolat drożdży *Wiliopsis saturnus* był zdolny do produkcji IAA i kwasu indolo-3-piironowego (IPYA) *in vitro*, na podłożu wzbogaconym w L-tryptofan jako prekursor auksyn. Wprowadzenie tych drożdży do sadzonek kukurydzy poprzez zanurzenie przyciętych korzeni w ich zawiesinie znacznie wzmacniało ich wzrost w warunkach szklarniowych w glebie wzbogaconej tryptofanem lub bez tryptofanu. Uzyskano wzrost suchej masy roślin, wydłużenie korzeni i pędów oraz oznaczono wyższe stężenia IAA i IPYA w porównaniu z roślinami kontrolnymi z tym, że działanie drożdży było wzmocnione obecnością L-tryptofanu w glebie [64]. Oprócz wyżej wspomnianych substancji

IAA i IPYA, stwierdzono zdolność drożdży do wytwarzania takich regulatorów wzrostu jak etylen [54] i GA3 [28]. Istnieją również dowody, że poliaminy: putrescyna, spermidyna i spermina odgrywają pozytywną rolę jako modulatory wzrostu roślin wyższych [33]. Ze względu na obfitość występowania w środowisku nie są one uważane za hormony, lecz tylko za regulatory wzrostu roślin.

#### 4. Mechanizmy antagonistycznego działania drożdży na wzrost grzybów fitopatogennych

Mechanizmy odgrywające znaczną rolę w aktywności biokontrolnej antagonistycznych drożdży wobec grzybów patogennych roślin obejmują: współzawodnictwo o składniki odżywcze i przestrzeń, produkcję enzymów degradujących ścianę komórkową, produkcję metabolitów przeciwwgrzybowych i związków lotnych, indukcję odporności gospodarza oraz mykopasożytnictwo [27]. Badania dotyczące mechanizmów oddziaływania drożdży na grzyby patogenne prowadzono na przedstawicielach różnych rodzajów: *Debaryomyces* [77], *Kloeckera* [57], *Sporothrix* [37], *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* [87], *Sporobolomyces* [31, 32, 43], *Metschnikowia* [46, 102], *Tilletiopsis* [65], *Rhodotorula* [50, 74], *Cryptococcus* [4, 31, 50], *Aureobasidium* [12, 42, 102], *Pichia* [55, 76], *Candida* [34, 57, 73], *Pseudozyma* [71, 102]. Skuteczne działanie czynnika biokontroli może być efektem występowania kilku mechanizmów jednocześnie [22]. Według El-Tarabily i Sivasithamparam [27] zrozumienie sposobów działania antagonistycznego drożdży pomoże nie tylko w udoskonaleniu ich aktywności i efektywności jako czynników biokontroli, ale umożliwi również rozwój kryteriów do szybkiego skringu czynników ochrony biologicznej.

##### 4.1. Konkurencja o składniki odżywcze i przestrzeń

Grzyby fitopatogenne dostają się do tkanek rośliny poprzez bezpośrednią penetrację strzępek przez kutikulę i epidermę rośliny (pasożyty obligatoryjne) lub poprzez ranki, uszkodzone tkanki czy naturalne otwory: aparaty szparkowe i przetchlinki (pasożyty względne). W obszarach tych znajduje się wiele składników odżywczych. Czynniki biologicznej ochrony mogą skutecznie współzawodniczyć z patogenem o zajęcie miejsca infekcji i wykorzystując składniki, wypierać patogen poprzez zapobieganie kiełkowaniu lub infekcji [32]. W niektórych badaniach obejmujących obserwacje mikroskopowe autorzy wykazali, że komórki drożdży występują w bliskim związku ze strzępkami lub agregatami grzybni, gdzie pojawiają się wydzieliny grzyba i nie oznacza to tylko istnienia chemoatrakcji komórek drożdżowych w kierunku strzępek znajdujących się na powierzchni liści, korzeni, owoców, ale również jest dowodem na występowanie zjawiska konkurencji



o pokarm i przestrzeń [6, 13]. Stwierdzono, że wcześniejsze (poprzedzające) zajęcie przez drożdże *P. guilliermondii* i *C. oleophila* miejsc infekcji grzyba i wykluczenie w ten sposób patogenu jest jednym z mechanizmów skutecznej ochrony jabłek przed szarą pleśnią [60, 96]. Współzawodnictwo o pokarm było bardzo intensywnie badane również w innych układach drożdże – grzyb patogenny m.in.: *R. glutinis* i *C. laurentii* – *B. cinerea* lub *P. expansum* [13], *D. hansenii* – *P. digitatum* [19], *C. laurentii* i *S. roseus* – *B. cinerea* [31, 32], *P. guilliermondii* – *P. italicum* [6], *C. oleophila* – *P. digitatum* [10], *M. pulcherrima* – *B. cinerea* [69, 83], *A. pullulans* – *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer*, *A. niger* [12], *P. fusiformata*, *Metschnikowia* sp. AP47 i *A. pullulans* – *M. laxa* [102]. Ten rodzaj oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami występuje zwłaszcza na owocach zawierających cukry na zranionych powierzchniach. Szybkie rozmnażanie drożdży pomaga im w eliminacji patogenów grzybowych, np. kiełkowanie zarodników *B. cinerea* było całkowicie zahamowane w czasie wspólnej hodowli *in vitro* z komórkami *M. pulcherrima*, natomiast nie stwierdzono działania hamującego wzrost pleśni podczas użycia komórek autoklawowanych lub filtratów komórkowych [83]. Podobne obserwacje zachowania zarodników *M. laxa* w obecności żywych i inaktywowanych komórek oraz filtratów pochodzących poczynili Z h a n g i wsp. [102].

#### 4.2. Produkcja czynników antybiotycznych

Jest to zjawisko charakterystyczne dla wielu drobnoustrojów efektywnie oddziałujących na inne mikroorganizmy. U drożdży nie jest obserwowane powszechnie. Istnieje kilka doniesień w literaturze wskazujących na ich zdolność do produkcji tego typu metabolitów wtórnych. Drożdże *Pseudozyma*, wytwarzają metabolity o aktywności antimikrobiologicznej. *Pseudozyma flocculosa* wytwarza antybiotyki zawierające kwasy tłuszczowe, które działają na przepuszczalność błony komórkowej organizmu docelowego, hamując jego wzrost [8]. Wykazano, że mutanty *Pseudozyma* nie produkujące glikolipidu flokulozyny działały słabiej na mączniaka [71]. Stwierdzono, że niektóre szczepy *P. fusiformata* wydzielają kwas ustilaginowy, glikolipid aktywny wobec różnych gatunków drożdży i grzybów strzępkowych [102]. Grzyb drożdżopodobny *Sporothrix flocculosa* wytwarza dwa antybiotyki – kwas heptadekanoinowy oraz metyloheptadekanoinowy, które skutecznie redukowały kiełkowanie zarodników oraz wzrost *B. cinerea* i *F. oxysporum* [38]. Urquhart i Punja [92] oczyścili ester kwasu tłuszczowego o aktywności przeciwgrzybowej z *Tilletiopsis pallescens*, który skutecznie ograniczał rozwój mączniaka *Podosphaera xanthii*. Był również aktywny wobec patogenów roślinnych pochodzenia glebowego takich jak: *F. oxysporum*, *Phoma* sp., *Pythium aphanidermatum* [92]. Naturalne drożdże winiarskie z rodzaju *Saccharomyces*

i *Zygosaccharomyces* również *in vitro* hamowały wzrost *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* [85]. Natomiast stwierdzono, że *A. pullulans* produkuje aureobazydynę A, przeciwgrzybowy cykliczny depsiptyd, który hamuje kiełkowanie zarodników, wydłużanie strzępek kiełkowych i wzrost grzybni *Monilinia fructicola* [100].

Badania nad zjawiskiem antybiozy obejmują wspólne hodowle kolonii obu drobnoustrojów na płytkach Petriego na podłożach stałych i pomiary stref inhibicji [83, 85, 94], hamujące działanie filtratów pochodzących na wzrost i kiełkowanie zarodników fitopatogenu *in vitro*, wykorzystanie sztucznie zranionych owoców lub liści, zakażonych antagonistą i patogenem [56, 83]. M a s i h i wsp. [56] wykazali bójcze działanie *P. membranefaciens* wobec *B. cinerea* w doświadczeniach płytkowych (strefy zahamowania wzrostu) oraz w probówkach, w bulionie, gdzie stwierdzono utratę zdolności do kiełkowania i następnie tworzenia kolonii. Obserwacje mikroskopowe wykazały koagulację protoplazmy komórek grzyba w obecności *P. membranefaciens* i utratę jej zawartości [56]. Z kolei P a y n e i wsp. [66] zauważyli, że *S. cerevisiae* i *Debaryomyces* sp. znacznie redukowały wzrost wybranych pleśni na skutek działania związków lotnych.

Wykazano, że drożdże z rodzaju *Candida* i *Rhodotorula* wytwarzają siderofory, chelatory żelaza ze środowiska ubogiego w ten pierwiastek. Kwas rodotorulowy wytwarzany przez *Rhodotorula* miał zdolność hamowania kiełkowania zarodników różnych patogenów m.in. *B. cinerea* [11].

Niektóre doniesienia sugerują, że drożdże wytwarzające tzw. toksynę killerową mogą znaleźć zastosowanie w biologicznej kontroli chorób pochodzenia grzybowego. Toksyny killerowe są białkami lub glikoproteinami wiążącymi struktury polisacharydowe ścian komórkowych drożdży np. (1-6)- $\beta$ -D-glukanu [39]. Zjawisko produkowania toksyny przez drożdże jest przedmiotem badań naukowców od wielu lat, szczególnie pod kątem ich wykorzystania w przemyśle spożywczym i fermentacyjnym [75, 76]. W a l k e r i wsp. [94] wskazali na zdolność drożdży killerowych (m.in. *P. anomala* NCYC 435, *S. cerevisiae* 28, *P. membranifaciens* 333) do hamowania grzybów patogennych z gatunków *Heterobasidion annosum*, *R. solani*, *F. equiseti*, *B. cinerea*. Santos i Marquina [76] i Santos i wsp. [77] prowadzili badania nad toksyną killerową *P. membranifaciens* CYC 1106, która posiada aktywność przeciwgrzybową i przeciwdrożdżową, i wykazali właściwości hamujące wzrost *B. cinerea* CYC 20003 *in vitro* i *in vivo* na sztucznie zakażonych grzybem jabłkach podczas przechowywania. Określili również mechanizm działania toksyny killerowej poprzez wywoływanie zakłóceń gradientów elektrochemicznych błony plazmatycznej, co powodowało wyciek jonów przez nieregulowane kanały jonowe w błonie i śmierć komórek [75].

### 4.3. Produkcja enzymów litycznych

Wydzielanie enzymów hydrolitycznych, zwłaszcza chitynaz i glukanaz jest cechą powszechną u wielu efektywnych czynników kontroli biologicznej. Cecha ta została bardzo dobrze poznana u grzybów strzępkowych *Trichoderma* [71, 99], ale stwierdzono ją również u niektórych drożdży. Zdolność do produkcji  $\beta$ -1,3-glukanazy stwierdzono u *Pichia anomala*, *P. membranaefaciens*, *R. glutinis*, *C. laurentii*, *A. pullulans*, *Tilletiopsis albescens* i *T. pallescens*, *Candida guilliermondii* i *C. oleophila*. Drożdże hamowały wzrost takich patogenów jak: *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer*, *A. niger*, *Sphaerotheca fuliginea*, *P. xanthii* na owocach lub liściach [12, 13, 45, 55, 73, 92]. Natomiast zdolność do produkcji chitynazy stwierdzono u drożdży *Candida saitoana*, *C. guilliermondii*, *C. oleophila*, *T. albescens* i *T. pallescens* oraz *A. pullulans* podczas interakcji odpowiednio z *B. cinerea* [24, 73], *P. xanthii* [92] i *P. expansum* [12], a także u drożdży *Metschnikowia* [78]. Jijakli i Lepoivre [45] badali uzdolnienia drożdży *P. anomala* do wydzielania  $\beta$ -1,3-glukanazy w obecności induktorów takich jak laminaryna i fragmenty ściany komórkowej *B. cinerea* i stwierdzili wyższą produkcję enzymu w obecności fragmentów ściany komórkowej grzyba jako substratu. Oczyszczony enzym z filtratów hodowlanych *P. anomala* wykazał *in vitro* silniejszy efekt inhibujący na strzępki kiełkowe niż na kiełkowanie konidiów i powodował wyciek cytoplazmy i pęcznienie komórek. Obecność enzymu była również wykrywana na jabłkach traktowanych drożdżami *P. anomala* hodowanymi w obecności fragmentów grzybni patogenu, co również potwierdzało słuszność hipotezy o roli  $\beta$ -1,3-glukanazy w biokontroli wzrostu fitopatogennych grzybów [45]. Podobne obserwacje poczynili Castoria i wsp. [13] oraz Masih i Paul [55] podczas hodowli drożdży w obecności ścian komórkowych *B. cinerea* i *P. expansum*. Natomiast Saligkari i wsp. [73] w badaniach drożdży *C. guilliermondii* i *C. oleophila* stwierdzili wyższe aktywności dwóch powyższych enzymów w podłożu hodowlanym zawierającym glukozę, zaś niższe, gdy źródłami węgla była laminaryna lub ściany komórkowe grzybni *B. cinerea*. Wielu badaczy obserwowało wraz z produkcją enzymów litycznych silną adhezję i połączenie żywych komórek drożdży do zarodników i strzępek, wskazując na bezpośrednie rozpoznawanie i interakcje pomiędzy antagonistycznymi drożdżami, a patogenami [6, 13, 17, 83, 94]. Arras i wsp. [6] zaobserwowali przyłączanie się komórek *P. guilliermondii* do grzybni *P. italicum*, a następnie degradację ściany komórkowej w bezpośredniej bliskości. Podobnie El Ghaouth i wsp. [24] zauważyli poważne uszkodzenia strzępek *B. cinerea* w miejscach bezpośredniego kontaktu z *C. saitoana*. Enzymy degradujące ścianę komórkową patogenu, umożliwiają inwazję hiperparazytów [27].

### 4.4. Indukcja odporności roślin

Rośliny wyższe zdolne są do samodzielnej obrony przed patogenami i szkodnikami poprzez wydzielanie w tkankach różnorodnych związków chemicznych oraz enzymów np. amoniakolizy fenyloalaniny [18], fitoaleksyn (skoparonu, skopoletyny, umbeliferonu) [7, 18], peroksydaz [29] i etylenu [18]. Wojtkowska-Gębarowska [99] opisała rolę grzybów z rodzaju *Trichoderma* w uruchamianiu mechanizmów odporności roślin w odpowiedzi na atak grzybów patogennych. Droby i wsp. [18] stwierdzili, że takie właściwości posiadają drożdże *Candida oleophila*, a Ippolito i wsp. [40] wskazali na drożdżaka *A. pullulans*. Natomiast Ghaouth i wsp. [35] zaobserwowali po traktowaniu jabłek drożdżami *C. saitoana* pojawienie się specyficznych struktur obronnych, takich jak brodawki i zgrubienia w miejscu zranionej tkanki owoców i stwierdzili zbieżność tego zjawiska z produkcją chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy. Zaobserwowano również wzrost aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy w owocach głożyny (judyby) po aplikacji drożdży *C. laurentii* i indukcję ekspresji genu *Glu-1* w tkance owoców, którego produkt może odgrywać rolę w odpowiedzi rośliny na atak *A. alternata* (Fr.) Keissler i *P. expansum* Link [88, 89]. Owoce pomidora inokulowane *P. guilliermondii* CNM 2.1801 wykazały zachowanie obronne poprzez produkcję peroksydazy, polifenolooksydazy, dysmutazy nadtlenkowej, katalazy, amoniakolizy fenyloalaniny, chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy [103]. Analiza proteomiczna owoców brzoskwini i czereśni wykazała z kolei, że *P. membranaefaciens* Hansen wzmacniała ich odporność przeciwko *P. expansum* Link poprzez indukcję produkcji enzymów antyoksydacyjnych i białek związanych z patogenezą [14, 15]. Badania Nantwana i wsp. [63] na owocach chili inokulowanych drożdżami *P. guilliermondii* R13 i patogenem *Colletotrichum capsici* również potwierdziły indukcję mechanizmów obronnych owoców poprzez wydzielanie fitoaleksyny, kapsidiolu oraz enzymów: amoniakolizy fenyloalaniny, chitynazy i glukanazy przez zranione tkanki. Badacze zaobserwowali również zmiany morfologiczne grzyba [63]. Aktywacja odpowiedzi gospodarza roślinnego na atak patogenów na liściach i owocach jest podobna do aktywacji zachodzącej podczas ataku patogenów infekujących korzenie roślin. Zjawisko to wciąż jest badane, a rola drożdży jest słabo poznana.

### 5. Poprawa skuteczności czynników biokontroli

Czynniki biologiczne posiadają wiele ograniczeń i nie jest zadaniem prostym znaleźć, rozwinąć i wprowadzić w życie praktyczne w zastosowaniu preparaty ochrony biologicznej. Niemniej jednak jest wiele możliwości łączenia różnych czynników biokontroli ze sobą, bądź

z metodami agronomicznymi, fizycznymi lub chemicznymi, co daje efekt synergistyczny [82]. W przypadku stosowania drożdży glebowych, z ryzosfery, skuteczne może być wzbogacanie gleby w składniki odżywcze lub stosowanie specjalnych powłok na nasiona, które powinny pomóc czynnikom biokontroli w przeżyciu i rozmnażaniu w spermosferze i ryzosferze oraz w ich aktywności biologicznej [27]. Już F o k k e m a i wsp. [27] zaobserwowali, że sacharoza i ekstrakt drożdżowy zwiększały gęstość występujących naturalnie lub sztucznie wprowadzanych drożdży na liściach pszenicy przedłużając supresję chorób liści. E l - T a r a b i l y [28] zastosował w swojej pracy otręby sojowe jako bazę odżywczą, zapewniającą dobry wzrost wegetatywny, namnażanie i przeżywalność wprowadzonych drożdży. Natomiast M e d i n a i wsp. [58] wzbogacili glebę w dwa rodzaje odpadów rolniczych zawierających *Yarrowia lipolytica*: suche wytloki z oliwek i wytloki buraczane, i stwierdzili znacznie wyższą efektywność inokulum drożdżowego tylko w glebie wzbogaconej składnikami odżywczymi. Szeroko stosowanym w badaniach adiuwantem jest chlorek wapnia działający pozytywnie na *Candida* sp. i *P. guilliermondii* w kontroli wzrostu *B. cinerea* [57], a także na *P. guilliermondii* i *P. membranefaciens* przeciwko *R. stolonifer* [90]. Działanie chlorku wapnia i dwuwęglanu sodu łącznie z *A. pullulans* na ograniczenie wzrostu *B. cinerea* na czereśniach badali I p p o l i t o i wsp. [42] i stwierdzili ograniczenie zgnilizny owoców o 62–75% podczas stosowania po zbiorze. Dwuwęglan sodu był stosowany również w badaniach S p a d a r o i wsp. [81] nad użyciem *M. pulcherrima* przeciwko niebieskiej zgniliznie na jabłkach oraz *C. oleophila* przeciwko antraknozie papai wywołanej przez *Colletotrichum gloeosporioides* [34]. E l - G h a o u t h i wsp. [23] stosowali drożdże *C. saitoana* z 0,2% roztworem 2-deoksy-D-glukozy o udowodnionych właściwościach przeciwgrzybowych i stwierdzili wyższą skuteczność użytej mieszaniny niż samych drożdży na zgniliznę *B. cinerea* i *P. expansum* podczas stosowania na jabłkach i owocach cytrusowych w przechowalni. Poziom zgnilizny na jabłkach był niższy o 85–95% w porównaniu z kontrolą, zaś użycie samych drożdży ograniczało zgniliznę o 45–85%. Natomiast na owocach cytrusowych obserwowano ograniczenie zgnilizny o 63–75%. Efekt działania mieszaniny drożdży z analogiem glukozy był zbliżony do stosowanych komercyjnie fungicydów [23]. Y u i wsp. [101] zastosowali mieszaninę drożdży *C. laurentii* i chitozanu w stężeniu 0,1% i uzyskali efekt synergistyczny w hamowaniu niebieskiej zgnilizny jabłek. Redukcja wystąpienia zmian chorobowych sięgała ok. 63–86% w zależności od lepkości roztworów chitozanu, natomiast same drożdże ograniczały rozwój pleśni o 52%. Stwierdzono, że chitozan w powyższym stężeniu skutecznie hamował lub spowalniał kiełkowanie zarodników grzyba *P. expansum* i tym samym wspomagał hamujące działanie drożdży [101].

Podjęto również próbę zastosowania liofilizowanego filtratu grzyba *Lentinula edodes* w mieszaninie z *C. laurentii* LS28 do hamowania wzrostu *P. expansum* na jabłkach i wydzielania patuliny. Stwierdzono, że filtrat *L. edodes* hamował kiełkowanie konidiów pleśni i stymulował rozwój drożdży w miejscach zranień jabłek. Podczas użycia 2% w/v roztworu filtratu z zawiesiną drożdży o gęstości  $10^6$  komórek/ml uzyskano całkowitą inhibicję wzrostu *Penicillium* na zranionych jabłkach w warunkach laboratoryjnych oraz nie stwierdzono obecności patuliny [91].

Inną metodą poprawy skuteczności drożdży antagonistycznych jest stosowanie mieszaniny gatunków, które może rozszerzyć spektrum aktywności, może wzmocnić efektywność pozwalając na redukcję częstości aplikacji oraz może pozwolić na kombinację różnych sposobów biokontroli bez uciekania się do inżynierii genetycznej, co potwierdzili L e i b i n g e r i wsp. [49] komponując mieszaninę z 2 szczepów *A. pullulans* i 1 szczepu *R. glutinis*. Z kolei mieszanina saprofitycznych drożdży *C. laurentii* i *C. infimo-miniatus* izolowanych z owoców gruszy skutecznie ograniczała wzrost *P. expansum* Link na gruszkach i jabłkach (odpowiednio o 91 i 84%) w przechowalni [16].

Niektóre drożdże wykazują oporność na stosowane w uprawach pestycydy i takie szczepy mogłyby być włączone w zintegrowane programy kontroli chorób roślin prowadzące do supresji patogenu przy stosowaniu mniejszej ilości fungicydów zarówno podczas uprawy jak i po zbiorze. Zredukowane ilości fungicydów mogą stresować i osłabiać patogen, czyniąc go bardziej podatnym na atak antagonistów. Integracja czynników biologicznych z fungicydami oferuje możliwość redukcji ilości wprowadzanych na produkty roślinne, w tym owoce i warzywa substancji chemicznych [41, 82]. Takie właściwości wykryto u *A. pullulans* i *C. oleophila* [52]. Drożdże *C. infimo-miniatus* w połączeniu z dwukrotnie niższą niż komercyjna, dawką tiabendazolu hamowały w 91% wzrost niebieskiej zgnilizny na jabłkach w przechowalni [16]. Również *A. pullulans* LS30, *C. laurentii* LS28 i *R. glutinis* LS11 mogły być stosowane w połączeniu z niską dawką benomylu dając dobry efekt ochronny jabłek (redukcja zmian o 25–59%) przed *B. cinerea* i *P. expansum* [51].

Badano również możliwość łączenia drożdży ochronnych z warunkami przechowalniczymi owoców np. temperaturą lub kontrolowaną atmosferą. W swoich badaniach Q i n i wsp. [72] zaobserwowali, że kombinacja kontrolowanej atmosfery zawierającej 10% O<sub>2</sub> i 10% CO<sub>2</sub> i drożdży z gatunków *C. laurentii* i *R. glutinis* była bardziej efektywna od działania samych drożdży antagonistycznych w hamowaniu *P. expansum* i *A. alternata* na owocach czereśni. Mechanizm aktywności antagonistycznych drożdży w warunkach kontrolowanej atmosfery nie został dokładnie poznany. Zwiększony poziom CO<sub>2</sub> ma nie tylko wpływ na aktywność patogenu, działa też na tkanki roślinne, utrzymując naturalną odporność



na organizmy chorobotwórcze. Niektóre drożdże również wykazują zdolność do utrzymania normalnego wzrostu w warunkach podwyższonego stężenia CO<sub>2</sub>, np. *C. laurentii* lub *R. glutinis* i one mogą być stosowane w połączeniu z kontrolowaną atmosferą. Rola drożdży jest również bardzo istotna przy zmianie warunków przechowywania owoców [72].

## 6. Preparaty ochronne oparte o drożdże

Krytycznym czynnikiem rozważanym podczas selekcji antagonistów do zastosowania komercyjnego jest możliwość technologii produkcji i stabilizacji komórek, dająca optymalnie skuteczną formę preparatu. Wciąż istnieje potrzeba licznych badań dotyczących praktycznych aspektów produkcji biomasy i odpowiedniej formuły, aby otrzymać produkt stabilny, skuteczny i bezpieczny. Główne wymagania rynku biofungicydów są następujące: opłacalna i wydajna produkcja biomasy mikroorganizmów, ich zdolność do przeżycia procesów dalszej obróbki, stabilność w trakcie przechowywania i odpowiedni okres trwałości produktu końcowego nawet w podwyższonych temperaturach, tolerancja na różne czynniki środowiskowe i stała skuteczność w warunkach aplikacji w komercyjnie ustalonych dawkach [59, 82]. Istotne jest, aby preparat pomimo produkcji biomasy na dużą skalę, zachowywał właściwości kultur laboratoryjnych, odpowiednią czystość, stabilność genetyczną, żywotność, zdolność kolonizacji powierzchni roślinnych oraz mechanizmy działania [22]. Procesy produkcji biomasy drożdży są dobrze poznane i szeroko opisywane w literaturze. Aby były one opłacalne należy wykorzystywać surowce odpadowe jako składniki podłoża hodowlanych, a czas trwania hodowli bioreaktorowych nie powinien przekraczać 24–30 godz. [22]. Natomiast przygotowanie odpowiedniej formuły preparatu handlowego wciąż stanowi problem. Wybór metody utrwalenia komórek, dodatek materiałów objętościowych, emulgatorów, adiuwantów i innych niezbędnych substancji są

wciąż przedmiotem badań. Rozważa się wykorzystanie płynnej zawiesiny komórek, jak i ich utrwalenie różnymi metodami zamrażania bądź suszenia w obecności substancji ochronnych. Melini i wsp. [59] stwierdzili, że skutecznymi metodami przygotowania komórek *P. anomala* jest liofilizacja i suszenie próżniowe, gdyż płynna formuła preparatu drożdżowego niesie ze sobą ograniczenia praktyczne związane z transportem i przechowywaniem, zaś suszenie fluidyzacyjne prowadzi do niszczenia zbyt dużej liczby komórek. Przeżywalność *P. anomala* bezpośrednio po procesie liofilizacji wynosiła ok. 60–75% bez względu na stężenie protektantów (trehalozy, sacharozy) i spadała nieznacznie przez 6 miesięcy przechowywania w temperaturze pokojowej, a po roku drożdże liofilizowane w medium z dodatkiem trehalozy utrzymywały przeżywalność na poziomie ok. 50%. Drobnoustroje zachowały również swoje właściwości antagonistyczne wobec pleśni na ziarnie zbóż. Autorzy także dość wysoko ocenili przydatność suszenia próżniowego do sporządzenia formuły wysuszonych drożdży [59]. Z kolei Abadi i wsp. [1] prowadzili zamrażanie drożdży *C. sake* w różnych temperaturach i ich liofilizację oraz określali przydatność substancji ochronnych takich jak cukry, poliole, związki azotowe i mleko odtłuszczone. Wysokie przeżywalności komórek (85–89%) uzyskali podczas zamrażania drożdży w mleku w temperaturach –12°C i –20°C. Natomiast po liofilizacji w mleku jako substancji ochronnej przeżywalność komórek wyniosła ok. 29%, a w mieszaninie mleka i laktozy oraz mleka i sacharozy (po 10% w/v) wzrosła do 36–40%. Spośród badanych protektantów najskuteczniejsze działanie oprócz mleka wywierały dwucukry podnosząc przeżywalność o ok. 12% [1]. Natomiast Liu i wsp. [53] dowodzili, że płynna formuła preparatów drożdżowych może być alternatywą dla form mrożonych lub suszonych ze względu na niższe koszty produkcji. Stwierdzili oni, że drożdże *C. laurentii* wykazywały przeżywalność sięgającą powyżej 50% w zawiesinie z dodatkiem trehalozy wzbogaconej kwasem L-askorbinowym, zaś komórki *P. membranefaciens* przeżywały na

Tabela II

Wykaz preparatów drożdżowych do stosowania w ochronie owoców i warzyw

Preparat	Drożdże	Fitopatogen	Producent	Piśmiennictwo
Aspire™	<i>Candida oleophila</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Geotrichum</i>	Ecogen Inc. (USA)	[18, 20, 95]
YieldPlus	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i>	Anchor Yeast (Afryka Pd.)	[18, 20, 95]
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i>	AgroGreen (Izrael)	[22, 95]
Nex0101	<i>Candida oleophila</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Botrytis</i>	Bionext (Belgia) [22]	
Inovacoat, Inovacure	<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis</i>	Nova Technologies (Kanada)	[22]
Candifruit	<i>Candida sake</i>	Różne grzyby patogenne	Sipcam-Inagra S.A. (Hiszpania)	[22, 86]
BoniProtect	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Pezizula</i> , <i>Nectria</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Monilinia</i>	BioProtect (Niemcy)	[95]



poziomie 75–82% w zawieszynie zawierającej galaktozę i dodatek kwasu askorbinowego podczas trzymiesięcznego przechowywania w temperaturze 4°C. Niestety przechowywanie w temperaturze pokojowej prowadziło do szybszego wymierania komórek. Drożdże zachowały swoje właściwości antagonistyczne wobec *P. expansum* i w miarę szybko kolonizowały miejsca zranień owoców [53]. Utrzymanie żywotności komórek na wysokim poziomie i ich zdolności do rozmnażania po rehydratacji jest jednym z najważniejszych wymagań podczas tworzenia formuł preparatów komercyjnych [22].

Ze względu na liczne ograniczenia i trudności związane z opracowaniem nowego preparatu i jego komercjalizacją, można podać niewiele przykładów dostępnych na rynku środków biokontroli pozbiorowej owoców i warzyw, opartych o drożdże, co prezentuje Tab. II. Pierwszymi takimi produktami były: *Aspire*<sup>TM</sup> wytwarzany w USA i *YieldPlus* produkowany w Afryce Południowej. *Aspire*<sup>TM</sup> zawierający *C. oleophila* był przeznaczony do pozbiorowej ochrony owoców cytrusowych przed zgnilizną powodowaną przez *Penicillium* oraz *Geotrichum*. Po dokładnym przebadaniu preparatu stwierdzono, że drożdże aplikowane w dawce ok. 10<sup>8</sup> komórek/ml samodzielnie dawały efekt ochronny, ale niewystarczający w porównaniu z komercyjnie stosowanymi fungicydami. Skuteczne działanie, szczególnie wobec *Geotrichum candidum*, zaobserwowano natomiast podczas łączenia *Aspire*<sup>TM</sup> z fungicydem tiabendazolem w 10-krotnie niższym stężeniu niż używane komercyjnie. Uzyskiwane wyniki były zachęcające do stosowania preparatu na skalę przemysłową [20]. Obecnie powyższe preparaty zostały wycofane, zaś dostępny na rynku jest preparat „Shemer” oparty o działanie *Metschnikowia fructicola* i stosowany do kontroli chorób przechowalniczych słodkich ziemniaków, marchwi, truskawek, winogron i cytrusów, aplikowany w warunkach polowych. Z kolei firmy BioNext (Belgia) i Leasaffre International (Francja) opracowują nowy preparat oparty na *C. oleophila*, natomiast Nova Technologies (Kanada) wdraża produkt oparty o *C. saitoana* zawierający dodatek chitozanu („InovaCoat”) lub lizozymu („InovaCure”). W Hiszpanii został zarejestrowany komercyjny preparat o nazwie „Candifruit” bazujący na drożdżach *C. sake* do użycia w ochronie owoców granatu przed różnymi patogenami [22, 86], zaś w Niemczech dostępny jest „BoniProtect” oparty o aktywność *A. pullulans* [95] (Tab. II).

## 7. Perspektywy stosowania drożdży antagonistycznych

Pomimo wielu trudności we wprowadzeniu na rynek i szerszym stosowaniu biopreparatów opartych o działanie drożdży antagonistycznych istnieje duża szansa upowszechnienia się tego typu środków ochrony roślin. Podczas procedury rejestracyjnej nowego preparatu

istotną zaletą jest jego bezpieczeństwo dla człowieka oraz środowiska. Większość drobnoustrojów była pierwotnie izolowana z produktów rolniczych, spożywanych w codziennej diecie ludzi. Wprowadzenie antagonistów na powierzchnię organów roślinnych nawet w dużej liczbie nie powinno być szkodliwe, gdyż mikroorganizmy te zwykle rozwijają się w specyficznych miejscach (zranieniach), a na nienaruszonej powierzchni ich populacja spada do poziomu naturalnej mikroflory [22]. Z tego samego względu brak doniesień o próbach modyfikacji genetycznych potencjalnych czynników antagonistycznych.

Inną ważną kwestią jest skuteczność biopreparatów, która musi być potwierdzona w testach półhandlowych i handlowych, ewentualnie polowych, na dużej ilości roślin lub produktów rolnych, która do tej pory nie zawsze była stabilna w trakcie przechowywania preparatu. Może to wynikać z wciąż jeszcze słabo poznanych interakcji pomiędzy mikroorganizmem antagonistycznym, patogenem i rośliną. Potrzebna jest szersza wiedza o fizjologii, genetyce i molekularnych podstawach kolonizacji, przeżywalności i różnicowaniu czynników biokontroli na tkance roślinnej, a także o wpływie fizjologii gospodarza na aktywność drożdży antagonistycznych. Słabo poznana jest problematyka adhezji drobnoustrojów do powierzchni i tworzenia biofilmów na zranionych tkankach roślinnych, które mogą mieć znaczenie w skutecznej biokontroli wzrostu patogenów grzybowych i na ten temat zaczynają pojawiać się doniesienia w literaturze [22].

Kolejną kwestią jest poszukiwanie odpowiedniej formuły preparatu, która spełniałaby wszystkie stawiane przed nią wymagania, poprawiłaby kolonizację mikroorganizmów na skórcie, przeżywalność w warunkach praktycznych i wzmacniała mechanizmy działania. Biopreparat o wysokiej skuteczności miałby szanse konkurować z komercyjnymi fungicydami dostępnymi na rynku.

## 8. Podsumowanie

Wśród stosowanych metod biologicznej kontroli rozwoju chorób pochodzenia grzybowego na uwagę zasługuje wykorzystanie drożdży. Prowadzone badania dotyczą poszukiwania skutecznych antagonistycznych szczepów, pochodzących z roślinnych nisz ekologicznych. Określono kilka mechanizmów działania antagonistów m.in. konkurencję o składniki pokarmowe i przestrzeń, wydzielanie związków antybiotycznych, produkcję enzymów litycznych lub indukowanie odporności w tkankach rośliny zaatakowanej przez fitopatogeny. Badano wpływ drożdży na hamowanie chorób przechowalniczych owoców i warzyw, a także ich działanie polowe w ochronie roślin uprawnych. Wyselekcjonowano efektywne szczepy drożdży m.in. *C. laurentii*, *C. sake*, *C. oleophila*, *Metschni-*

*kowia* spp. lub drożdżopodobnych grzybów – *A. pullulans*, które wciąż są przedmiotem intensywnych badań nad ochroną przechowalniczą jabłek, winogron i innych owoców przed takimi patogenami jak m.in. *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, powodującymi duże straty ekonomiczne w czasie ich przechowywania. Trwają intensywne badania nad opracowaniem odpowiedniej formuły skutecznego biopreparatu drożdżowego, który spełniałby wszystkie wymagania stawiane tego typu produktom. Sposobem poprawy efektywności wyselekcjonowanych drożdży jest łączenie gatunków ze sobą, ze składnikami naturalnymi np. chitozanem lub z chemicznymi fungicydami niskiego ryzyka, ale w zmniejszonych dawkach, bezpieczniejszych dla potencjalnych konsumentów lub z czynnikami fizycznymi. Rozwój wiedzy biotechnologicznej i metod molekularnych z pewnością pozwolą na skuteczną identyfikację wyselekcjonowanych organizmów antagonistycznych, wyjaśnienie mechanizmów ich działania, monitorowania rozwoju i efektywności po aplikacji, co z kolei może przyczynić się do przyspieszenia procedur rejestracyjnych biopreparatów. Przy odpowiedniej akceptacji konsumentów oraz uwarunkowaniach prawnych istnieją szanse na zastosowanie w przyszłości organizmów modyfikowanych genetycznie jako czynników biokontroli udoskonalonych pod względem skuteczności lub spektrum aktywności [22].

## Piśmiennictwo

- Abadias M., Benabarre A., Teixido N., Usall J., Vinas I.: Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* **65**, 173–182 (2001)
- Abd El-Hafez A.E., Shehata S.F.: Field evaluation of yeasts as a biofertilizer for some vegetable crops. *Arab. Univ. J. Agric. Sci.* **9**, 169–182 (2001)
- Ahmad J.S., Baker R.: Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* **77**, 182–189 (1987)
- Anderson J.A., Filonow A.B., Vishniac H.S.: *Cryptococcus humicola* inhibits development of lesions in “Golden Delicious” apples. *Hort. Sci.* **32**, 1235–1236 (1997)
- Andrews J.H.: Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 603–635 (1992)
- Arras G., De Cicco V., Arru S., Lima G.: Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **73**, 413–418 (1998)
- Arras G.: Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharv. Biol. Technol.* **8**, 191–198 (1996)
- Avis T.J., Belanger R.R.: Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Res.* **2**, 5–8 (2002)
- Benbow J.M., Sugar D.: Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Dis.* **83**, 839–844 (1999)
- Brown G.E., Davis C., Chambers M.: Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. *Postharv. Biol. Technol.* **18**, 57–65 (2000)
- Calvente V., de Orellano M.E., Sansone G., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M.I.: Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **26**, 226–229 (2001)
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., De Cicco V.: *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharv. Biol. Technol.* **22**, 7–17 (2001)
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., De Cicco V.:  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharv. Biol. Technol.* **12**, 293–300 (1997)
- Chan Z., Qin G., Xu X., Li B., Tian S.: Proteome approach to characterize protein induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. *J. Prot. Res.* **6**, 1677–1688 (2007)
- Chan Z., Tian S.: Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvest sweet cherry fruit. *Postharv. Biol. Technol.* **39**, 314–320 (2006)
- Chand-Goyal T., Spotts R.A.: Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control*, **10**, 199–206 (1997)
- Cook D.W.M., Long P.G., Ganesh S., Cheah L.H.: Attachment microbes antagonistic against *Botrytis cinerea*: biological control and scanning electron microscope studies in vivo. *Ann. Appl. Biol.* **131**, 503–518 (1997)
- Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., Porat R.: Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathol.* **92**, 393–399 (2002)
- Droby S., Chalutz E., Wilson C.L., Wiśniewski M.: Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* **35**, 794–800 (1989)
- Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren-Tzur M., Shachnai A.: Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control*, **12**, 97–101 (1998)
- Droby S., Wilson Ch.L., Wisniewski M., Ghaouth A.E.: Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables (w) Microbial Food Contamination, red. Ch.L. Wilson, S. Droby, CRC Press LLC, Washington, 2001, s. 187–205
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C.: Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharv. Biol. Technol.* **52**, 137–145 (2009)
- El Ghaouth A., Smilanick J.L., Brown G.E., Ippolito A., Wilson C.L.: Control of decay of apple and citrus fruits in semi-commercial tests with *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Biolog. Control*, **20**, 96–101 (2001)
- El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M.: Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathol.* **88**, 282–291 (1998)
- El-Mehalawy A.A., Hassainen N.M., Khater H.M., Karam El-Din E.A., Youssef Y.A.: Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int. J. Agric. Biol.* **6**, 599–605 (2004)
- El-Mehalawy A.A.: The rizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. *Int. J. Agric. Biol.* **6**, 310–316 (2004)
- El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K.: Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycosci.* **47**, 25–35 (2006)

28. El-Tarabily K.A.: Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 69–75 (2004)
29. Fajardo J.E., McCollum T.G., McDonald R.E., Mayer R.T.: Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biol. Control*, **13**, 143–151 (1998)
30. Ferrari A., Sicher C., Prodorutti D., Pertot I.: Potential new applications of Shemer, a *Metschnikowia fructicola* based product, in post-harvest soft fruit rots control. *Bull. OILB/SROP*, **30**, 43–46 (2007)
31. Filonow A.B., Vishniac H.S., Anderson J.A., Janisiewicz W.J.: Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control*, **7**, 212–220 (1996)
32. Filonow A.B.: Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**, 243–256 (1998)
33. Galston A.W., Kaur-Sawhney R.: Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **94**, 406–410 (1990)
34. Gamagae S.U., Sivakumar D., Wijesundera R.L.C.: Evaluation of post-harvest application of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of anthracnose of papaya. *Crop Prot.* **23**, 575–579 (2004)
35. Ghaouth E.I.A., Wilson L.C., Wisniewski M.: Control of post-harvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathol.* **93**, 344–348 (2003)
36. Grebenisan I., Cornea P., Mateescu R., Cimpeanu C., Olteanu V., Campenu G.H., Stefan L.A., Oancea F., Lupu C.: *Metschnikowia pulcherrima*, a new yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Acta Hort.* **767**, 355–360 (2008)
37. Hajlaoui M.R., Belanger R.R.: Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var *tritici*. *Biocontrol Sci. Technol.* **3**, 427–434 (1993)
38. Hajlaoui M.R., Traquair J.A., Jarvis W.R., Belanger R.R.: Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**, 229–237 (1994)
39. Hutchins K., Bussey H.: Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)- $\beta$ -D-glucan. *J. Bacteriol.* **154**, 161–169 (1983)
40. Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M.: Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharv. Biol. Technol.* **19**, 265–272 (2000)
41. Ippolito A., Nigro F.: Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Prot.* **19**, 715–723 (2000)
42. Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F.: Control of post-harvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharv. Biol. Technol.* **36**, 245–252 (2005)
43. Janisiewicz W.J., Peterson D.L., Bors R.: Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Dis.* **78**, 466–470 (1994)
44. Janisiewicz W.J., Tworowski T.J., Kurtzman C.P.: Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Biol. Control*, **91**, 1098–1108 (2001)
45. Jijakli M.H., Lepoivre P.: Characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathol.* **88**, 335–343 (1998)
46. Karabulut O.A., Tezcan H., Daus A., Cohen L., Wiess B., Droby S.: Control of pre-harvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Sci. Technol.* **14**, 513–521 (2004)
47. Kornilowicz-Kowalska T.: Oddziaływanie grzybów glebowych (*Micromycetes*) na patogeny oraz szkodniki roślin i jego praktyczny aspekt. *Frag. Agronom.* **2** (66), 135–149 (2000)
48. Kryczyński S.: Podstawy fitopatologii. Fundacja – Rozwój SGGW, Warszawa, 2005.
49. Leibinger W., Breuker B., Hahn M., Mendgen K.: Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathol.* **87**, 1103–1110 (1997)
50. Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V.: Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**, 257–267 (1998)
51. Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V.: Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *Europ. J. Plant Pathol.* **109**, 341–349 (2003)
52. Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M.: Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharv. Biol. Technol.* **10**, 169–178 (1997)
53. Liu J., Tian S.P., Li B.Q., Qin G.Z.: Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *Biocontrol*, **54**, 817–824 (2009)
54. Lynch J.M.: Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil. *Nature*, **240**, 45–46 (1972)
55. Masih E.I., Paul B.: Secretion of beta-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranefaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing mold disease of the grapevine. *Curr. Microbiol.* **44**, 391–395 (2002)
56. Masih E.I., Slezak-Deschaumes S., Marmaras I., Ait Barka E., Vernet G., Charpentier C., Adholeya A., Paul B.: Characterization of the yeast *Pichia membranefaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 227–232 (2001)
57. McLaughlin R.J., Wilson C.L., Droby S., Ben-Arie R., Chalutz E.: Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Dis.* **76**, 470–473 (1992)
58. Medina A., Vassilev N., Alguacil M.M., Roldan A., Azcon R.: Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. *Soil Sci.* **169**, 260–270 (2004)
59. Melin P., Hakanson S., Schnürer J.: Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1008–1016 (2007)
60. Mercier J., Wilson C.L.: Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biol. Control*, **4**, 138–144 (1994)
61. Meyer G., Bigirimana J., Elad Y., Höfte M.: Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T33 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 279–286 (1998)
62. Monte E.: Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* **4**, 1–4 (2001)
63. Nantawanit N., Chanchaichaovivat A., Panijpan B., Ruenwongsa P.: Induction of defence response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biol. Control*, **52**, 145–152 (2010)
64. Nassar A.H., El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K.: Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Wiliopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils*, **42**, 97–108 (2005)



65. Ng K.K., MacDonald L., Punja Z.K.: Biological control of rose powdery mildew with the antagonist yeast *Tilletiopsis pallescens*. *Hort. Sci.* **32**, 262–266 (1997)
66. Payne C., Bruce A., Staines H.: Yeast and bacteria as biological control agents against fungal discolouration of *Pinus sylvestris* blocks in laboratory-based tests and the role of antifungal volatiles. *Holzforchung*, **54**, 563–569 (2000)
67. Perondii N.L., Luz W.C., Thomas R.: Microbiological control of *Gibberella* in wheat. *Fitopatol. Bras.* **21**, 243–249 (1996)
68. Petrini O.: Fungal endophytes of tree leaves (w) Microbial ecology of leaves, red. J.H. Andrews, S.S. Hirano, Springer, New York, 1991, s. 179–197.
69. Piano S., Neyrotti V., Migheli M., Gullino M.L.: Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharv. Biol. Technol.* **11**, 131–140 (1997)
70. Piątkowski J.: Biologiczne preparaty grzybowe w zwalczaniu chorób i szkodników. *Owoce Warzywa Kwiaty*, **17–18**, 22 (2001)
71. Punja Z.K., Utkhede R.S.: Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* **21**, 400–407 (2003)
72. Qin G., Tian S., Xu Y.: Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharv. Biol. Technol.* **31**, 51–58 (2004)
73. Saligkarias I.D., Gravanis F.T., Epton H.A.S.: Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II a study on mode of action. *Biol. Control*, **25**, 151–161 (2002)
74. Sansone G., Rezza I., Calvente V., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M.L.: Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharv. Biol. Technol.* **35**, 245–251 (2005)
75. Santos A., Marquina D.: Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, **21**, 151–162 (2004)
76. Santos A., Marquina D.: Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiol.* **150**, 2527–2534 (2004)
77. Santos A., Sanchez A., Marquina D.: Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol. Res.* **159**, 331–338 (2004)
78. Saravanakumar D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as postharvest biocontrol agent. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**, 183–193 (2009)
79. Schena I., Ippolito A., Zahavi T., Cohen I., Droby S.: Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeasts. *Europ. J. Plant Pathol.* **106**, 681–691 (2000)
80. Sobiczewski P.: Bakterie jako czynniki biologicznej ochrony roślin przed chorobami. *Post. Nauk Roln.* **6**, 19–31 (1994)
81. Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharv. Biol. Technol.* **33**, 141–151 (2004)
82. Spadaro D., Gullino M.L.: Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* **24**, 601–613 (2005)
83. Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M.L.: Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharv. Biol. Technol.* **24**, 123–134 (2002)
84. Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J.: Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 1–30 (2000)
85. Suzzi G., Romano P., Ponti I., Montuschi C.: Natural wine yeasts as biocontrol agents. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 304–308 (1995)
86. Teixidó N., Usall J., Nuñez C., Torres R., Abadias M., Viñas I.: Preharvest strategies to control postharvest diseases in fruits (w) Postharvest Pathology, red. Dov Prusky, M. Lodovica Cullino, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2010, s. 89–106.
87. Teixidó N., Viñas I., Usall J., Magan N.: Control of blue mould of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopatol.* **88**, 960–964 (1998)
88. Tian S., Wan Y.K., Qin G.Z., Xu Y.: Induction of defense responses against *alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 729–734 (2006)
89. Tian S., Yao H.J., Deng X., Xu X.B., Qin G.Z., Chan Z.: Characterization and expression of  $\beta$ -1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathol.* **97**, 260–268 (2007)
90. Tian S.P., Fan Q., Xu Y., Jiang A.L.: Effects of calcium on biocontrol activity of yeasts antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathol.* **51**, 352–358 (2002)
91. Tolaini V., Zjalic S., Reverberi M., Fanelli C., Fabbri A.A., Del Fiore A., De Rossi P., Ricelli A.: *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 243–249 (2010)
92. Urquhart E.J., Punja Z.K.: Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Can. J. Microbiol.* **48**, 219–229 (2002)
93. Wagner A., Kordowska-Wiater M., Hetman B.: Wpływ wybranych szczepów drożdży na rozwój szarej pleśni na owocach jabłoni. *Prog. Plant Prot.* **46**, 625–628 (2006)
94. Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J.: Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 213–222 (1995)
95. Whipps J.M., McQuilken M.P.: Biological control agents in plant disease control (w) Disease Control in Crops. Biological and Environmentally – Friendly Approaches, red. D. Walters, Wiley-Blackwell, Singapore, 2009, s. 27–61.
96. Wisniewski M.E., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C.L., Chalutz E.: Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 245–258 (1991)
97. Wisniewski M.E., Wilson C.L.: Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hort. Sci.* **27**, 94–98 (1992)
98. Witting H.P.P., Johnson K.B., Pscheidt J.W.: Effect of epiphytic fungi on Brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. *Plant Dis.* **81**, 383–387 (1997)
99. Wojtkowiak-Gębarowska E.: Mechanizmy zwalczania fitopatogenów glebowych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*. *Post. Mikrobiol.* **45**, 261–273 (2006)
100. Xiaoping L., Jiye W., Ping G., Cungui M., Zhu Z.R., Hongye L.: *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 223–229 (2007)
101. Yu T., Li H.Y., Zheng X.D.: Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 261–266 (2007)
102. Zhang D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharv. Biol. Technol.* **55**, 174–181 (2010)
103. Zhao Y., Tu K., Shao X., Jing W., Su Z.: Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharv. Biol. Technol.* **49**, 113–120 (2008)





Anna Słońska<sup>1</sup>, Anna Golke<sup>1</sup>, Magdalena Solarska<sup>2</sup>,  
Joanna Cymerys<sup>1\*</sup>, Tomasz Dzieciatkowski<sup>2</sup>, Marcin Bańbura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Ciszewskiego 8, 02-789 Warszawa

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wprowadzenie do budowy cytoszkieletu komórkowego. 2. Rola cytoszkieletu w zakażeniach wirusowych. 3. Oddziaływanie wirusów na mikrofilamenty aktynowe. 4. Relacje pomiędzy zakażeniem wirusowym a strukturą i funkcjonowaniem mikrotubul. 5. Podsumowanie

#### Viral manipulations of cells cytoskeleton

*Abstract:* Viral particles are generally too large to diffuse freely within the crowded environment of the cytoplasm. Viruses depend on mammalian cell transport systems and deliver their genome into host cells, where they subsequently replicate and multiply. They can reorganize the cytoskeleton and restructure the cell transport machinery. Viruses use different cellular motor proteins to move along microtubules toward the cell interior during the entry process; some reverse this transport during egress to move assembling virus particles toward the plasma membrane. The actin cytoskeleton of the host cell does not escape viral infection unscathed, but is often co-opted by the virus at many different stages of its life cycle to facilitate the infection process. Indeed the tactics used by any given virus to achieve its infectious life cycle are certain to involve multiple interactions with cytoskeleton. This review summarizes viral intracellular pathways and manipulations of the cell cytoskeleton.

1. Introduction to cytoskeleton biology. 2. The role of the cytoskeleton during viral infection. 3. Interactions between viruses and actin filaments. 4. Viral effect on cytoskeleton microtubules. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** aktyna, mikrotubule, zakażenie wirusowe  
**Key words:** actin filaments, microtubules, viral infection

### 1. Wprowadzenie do budowy cytoszkieletu komórkowego

Wirusy jako bezwzględne pasożyty komórkowe, nie wykazujące cech organizmu żywego poza komórką gospodarza, wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających im korzystanie ze struktur komórki gospodarza, między innymi cytoszkieletu komórkowego.

Cytoszkielet jest siecią trudno rozpuszczalnych białek, stanowiącą zasadniczą część cytozolu. Jako struktura niezwykle dynamiczna, ulegająca ciągłej przebudowie z monomerów w filamenti i odwrotnie, cytoszkielet bierze udział w ruchu komórki, w transporcie wewnątrzkomórkowym, a także przemieszczaniu się organelli. Pełni funkcję ochronną przed urazami mechanicznymi oraz stanowi rusztowanie dla organelli komórkowych i odpowiada za sprężystość cytoplazmy [1, 47]. Umożliwia także jej rozdział, a co za tym idzie odpowiada za uporządkowane rozmieszczenie enzymów wewnątrzkomórkowych i utrzymanie różnic w lokalnych stężeniach ATP i ADP. Struktura ta ważna jest także podczas podziałów komórkowych – w trakcie wędrówki chromosomów do bieguna wrzeczona kariokinetycznego [1, 47, 58, 62, 68].

Cytoszkielet zbudowany jest z trzech głównych elementów, do których należą mikrotubule (MT), mikrofilamenty (filamenty aktynowe, MF) oraz filamenti pośrednie (IF) [1].

Mikrofilamenty występują w niemal wszystkich komórkach eukariotycznych. Zbudowane są z aktyny, która tworzy gęstą sieć zlokalizowaną tuż pod błoną komórkową, w tak zwanej warstwie korowej cytoplazmy. W komórce aktyna występuje w dwóch postaciach – fibrylarnej F (filamenty) oraz globularnej G. Pojedyncza cząsteczka aktyny jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 43 kDa. Ma ona sferyczny, globularny kształt, stąd też monomery aktyny nazywane są inaczej G-aktyną. Liniowe przyłączanie monomerów (polimeryzacja) prowadzi do powstania długich filamentów aktynowych określanych mianem F-aktyny. W komórkach zwierzęcych obie formy pozostają między sobą w równowadze, co oznacza, że 50% aktyny występuje w formie monomerów, zaś pozostałe 50% stanowią filamenti. Przechodzenie aktyny z formy G do formy F i odwrotnie zależy od siły jonowej, stężenia ADP i ATP oraz pH roztworu [1].

Pojedynczy filament aktyny ma średnicę około 7 nm i podobnie jak mikrotubule, jest strukturą spolaryzowaną.

\* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW; ul. Ciszewskiego 8, 02-789 Warszawa; tel (22) 593 60 26

Przy końcu o ładunku dodatnim dochodzi do przyłączenia monomerów aktyny, podczas gdy na końcu ujemnym następuje proces ich odłączania. W procesie tworzenia filamentów aktynowych niezbędne jest utworzenie tzw. miejsca nukleacji F-aktyny. Jest to kompleks złożony z trzech monomerów G-aktyny, do którego przyłączone jest białko profilina. Jej odłączenie zapoczątkowuje proces polimeryzacji i tym samym pozwala na powstanie długich filamentów aktyny, których długość może dochodzić do kilkudziesięciu  $\mu\text{m}$  [1].

F-aktyna ma zdolność do tworzenia złożonych wiązek filamentów tzw. fibryl naprężeniowych (stress fibers). Wiązki te ułożone są wzdłuż linii naprężeń cytoplazmy i zakotwiczone dodatnimi końcami w błonie komórkowej [1].

Struktura, a tym samym funkcja filamentów aktynowych może być zakłócona przez inhibitory aktyny, do których zaliczane są toksyny wytwarzane przez grzyby i bakterie. Wśród nich są takie, które hamują polimeryzację aktyny (cytochalazyny) oraz takie, które stabilizują filamente aktyny zapobiegając ich depolimeryzacji (faloidyna, latrunkulina) [8, 66].

Kolejnym elementem cytoszkieletu niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórki są mikrotubule. Decydują one o utrzymaniu kształtu komórki, biorą udział w ruchu rozmaitych struktur w jej obrębie, odpowiadając za transport wewnątrzkomórkowy i rozmieszczenie organelli. Odgrywają także istotną rolę podczas podziału komórki, budując wrzeciono kariokinetyczne. Ponadto tworzą szkielet struktur takich jak wici i rzęski [1, 75].

Mikrotubule zbudowane są z cząsteczek globularnego białka tubuliny, występującego w dwóch formach, alfa- i beta-tubuliny, które tworzą dimery w kształcie hantli o długości 8 nm [1]. Cząsteczki tubuliny polimeryzują w obecności GTP (niezbędne do odkształcenia cząsteczek tubuliny) i jonów magnezowych tworząc protofilamenty, będące podstawową jednostką budulcową mikrotubul [1]. Na ogół 13 protofilamentów łączy się wzdłuż osi długiej tworząc ścianę mikrotubuli, która jest rurką o średnicy 18–25 nm, grubości ściany 5 nm i pustym środku o średnicy 20 nm [1, 47].

Tubulina wolna i tworząca mikrotubule pozostają w komórce w stanie dynamicznej równowagi. Co prawda procesy wydłużania i skracania mikrotubul zachodzą na obu ich końcach, lecz z różną intensywnością, dlatego mówimy, że są to struktury polarne. Koniec mikrotubuli, na którym dochodzi do jej wydłużania określane jest jako dodatni, a przeciwny jako ujemny. Mikrotubule zakotwiczone są końcem ujemnym w okolicy jądra komórkowego w centrum organizacji mikrotubul (MTOC – Microtubule Organizing Centre). Umożliwia to ukierunkowany transport w stronę jądra komórkowego (retrograde transport) oraz w kierunku przeciwnym (anterograde transport) [1].

Mikrotubulom towarzyszą białka określane jako MAPs (Microtubule-associated proteins), które mogą kontrolować polimeryzację mikrotubul, oraz decydować o ich stabilności [1]. Należą do nich kinezyzny odpowiedzialne za transport w kierunku błony komórkowej, dyneiny i dynaktyny, biorące udział w transporcie w kierunku jądra komórkowego, oraz białko tau powodujące

#### Wykaz skrótów używanych w pracy:

AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus) – bakulowirus *Autographa californica*,  
 CPV (canine parvovirus) – psi parwowirus,  
 EHV-1 (equine herpesvirus type 1) – koński herpeswirus typu 1; wirus zakaźnego ronienia klaczy,  
 FV3 (frog virus 3) – iridowirus żab typu 3,  
 HBV (hepatitis B virus) – wirus zapalenia wątroby typu B,  
 HHV-1; HSV-1 (human herpesvirus type 1; herpes simplex virus 1) – ludzki herpeswirus typu 1; wirus opryszczki typu 1,  
 HHV-2; HSV-2 (human herpesvirus type 2; herpes simplex virus 2) – ludzki herpeswirus typu 2; wirus opryszczki typu 2,  
 HHV-3; VZV (human herpesvirus type 3; varicella-zoster virus) – ludzki herpeswirus typu 2; wirus ospy wietrznej/półpaśca,  
 HHV-4; EBV (human herpesvirus type 4; Epstein-Barr virus) – ludzki herpeswirus typu 4; wirus Epsteina-Barr,  
 HHV-5; CMV (human herpesvirus type 5; cytomegalovirus) – ludzki herpeswirus typu 5; wirus cytomegalii,  
 HHV-8; KSHV (human herpesvirus type 8; Kaposi sarcoma herpesvirus) – ludzki herpeswirus typu 8; wirus mięsaka Kaposiego,  
 HIV (human immunodeficiency virus) – ludzki wirus niedoboru odporności,  
 HPIV-3 (human parainfluenza virus type 3) – ludzki wirus paragrypy typu 3,  
 HTLV (human T-cell leukaemia virus) – ludzki wirus białaczki T-komórkowej,  
 IF (intermediate filaments) – włókna pośrednie,  
 MAPs (microtubule-associated proteins) – białka związane z mikrotubulami,  
 MF (microfilaments) – mikrofilamenty,  
 MT (microtubules) – mikrotubule,  
 MTOC (microtubule organizing centre) – centrum organizacji mikrotubul,  
 MV (measles virus) – wirus odry,  
 NDV (Newcastle disease virus) – wirus choroby Newcastle,  
 VACV (vaccinia virus) – wirus krowianki,  
 SuHV-1; PRV (suid herpesvirus type 1; pseudorabies virus) – świński herpeswirus typu 1; wirus wścieklizny rzekomej,  
 SV (Sendai virus) – wirus Sendai.

helikalne skręcenie protofilamentów w mikrotubulach [2, 15, 35, 38].

Podobnie, jak w przypadku filamentów aktynowych, struktura mikrotubul może zostać zaburzona przez niektóre alkaloidy roślinne np.: kolchicynę, winblastynę, winkrystynę, czy nokodazol. Wiążą się one z wolną tubuliną, co sprawia, że proces rozpadu mikrotubul dominuje nad ich wydłużaniem. Przeciwnie działanie wykazuje taksol, który stabilizuje mikrotubule [1, 35].

## 2. Rola cytoszkieletu w zakażeniach wirusowych

Badanie uszkodzeń cytoszkieletu w kontekście zakażenia wirusowego jest stosunkowo nowym kierunkiem badawczym, stąd skąpa ilość danych literaturowych na ten temat. Dowiedziono jednak, że odgrywa on szczególną rolę podczas zakażenia biorąc np. udział w wewnątrzkomórkowym transporcie wirionów lub ich części składowych. Ponadto, pod wpływem zakażenia wirusowego może dochodzić do polimeryzacji, bądź odwrotnie, fragmentacji włókien aktynowych. Możliwa jest również ich rearanżacja, uszkodzenie a nawet całkowite zniszczenie [13]. Cytoszkielet odgrywa ważną rolę podczas zakażenia wirusowego. Wiadomo, że jest on wykorzystywany przez wirusy na różnych etapach cyklu replikacyjnego, między innymi do transportu wirionów potomnych lub ich części składowych. W wielu przypadkach w procesie tym uczestniczą mikrotubule, przy czym cząstki wirusowe mogą być transportowane wzdłuż mikrotubul zarówno z obrzeży komórki do jądra komórkowego, po połączeniu z dyneiną lub dynaktyną, jak i w kierunku przeciwnym, prawdopodobnie z wykorzystaniem kinezyny-1 [28, 36, 46, 63, 85]. Stwierdza się, że w komórkach zakażonych niektórymi wirusami mikrotubule wykazują większą stabilność, niż w komórkach niezakażonych, a procesy ich wydłużania dominują nad procesami skracania [86]. Ponadto wiadomo, że wirusy mogą powodować zarówno polimeryzację lub fragmentację włókien aktynowych, jak również rearanżację, uszkodzenie lub całkowite zniszczenie cytoszkieletu aktynowego [3]. W ciągu ostatnich kilku lat wzrosło zainteresowanie tym zagadnieniem i powstało wiele prac, których celem było zbadanie roli cytoszkieletu w kontekście zakażenia wirusowego.

## 3. Oddziaływanie wirusów na mikrofilamenty aktynowe

Najwięcej informacji o interakcji między wirusem a cytoszkieletem aktynowym dostarczyły badania nad wirusem krowianki (VACV; *vaccinia virus*), należącym do rodziny *Poxviridae*. Pierwsze doniesienia o oddziaływaniu wirusa krowianki z cytoszkieletem pochodzą

z 1976 roku. Wykazano wówczas obecność w zakażonej komórce mikrokosmków, znacznie większych niż te normalnie występujące w komórce, które miały na swoich zakończeniach cząsteczki wirusa [67]. Dalsze badania potwierdziły, że mikrokosmki te zawierały aktynę, jak również białka uczestniczące w jej wiązaniu – aktynę, filaminę i fimbrinę [33, 34]. Natomiast zahamowanie procesu składania wirionów zapobiegło tworzeniu mikrokosmków co dowodzi, że powstawanie tych struktur jest indukowane przez wirusa [40].

W wyniku zakażenia wirusem krowianki dochodzi do zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego, który wykorzystywany jest zarówno do transportu wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowego. Wirus powoduje zniszczenie aktynowych włókien naprężeniowych, jak również indukuje tworzenie ogonów aktyny (actin tails) w cytoplazmie zakażonej komórki. Powstawanie ogonów wynika ze zdolności do inicjowania polimeryzacji aktyny tuż za wirionem. Struktury te umożliwiają poruszanie się wirusa wewnątrz cytoplazmy z prędkością 2,8  $\mu\text{m}/\text{min}$  oraz ułatwiają przedostawanie się do sąsiednich komórek [11, 12].

Do wirusów powodujących uszkodzenie cytoszkieletu aktynowego należą także wirusy z rodziny *Herpesviridae* [25, 76]. Przykładem jest wirus zakaźnego ronienia kłaczy (EHV-1; *equine herpesvirus type 1*), który jest ważnym czynnikiem zakaźnym powodującym zakażenie górnych dróg oddechowych, poronienia u kłaczy oraz zaburzenia neurologiczne. Dotychczas prowadzone badania dotyczyły określenia wpływu wirusa na cytoszkielet komórek linii Vero (nerki małpy) i komórek linii ED (skóry konia). Zmiany w cytoszkiecie aktynowym znacznie różnią się w zależności od linii komórkowej. W przypadku komórek linii ED EHV-1 wywołuje depolimeryzację włókien aktynowych, zaś w komórkach linii Vero wirus powoduje ich wzmożoną kondensację. Odmienne wyniki mogą być spowodowane faktem, że linia komórkowa ED to komórki wywodzące się od naturalnego gospodarza, zaś hodowla Vero jest heterologiczną linią komórkową [71]. Zastosowanie inhibitora cytoszkieletu – latrunkuliny, doprowadziło do zahamowania replikacji wirusa, co może sugerować, że cytoszkielet aktynowy jest niezbędny dla prawidłowego namnażania EHV-1 [71, 72, 83].

Cytoszkielet odgrywa znaczącą rolę również dla wirusa wścieklizny rzekomej (SuHV-1; PRV), szczególnie w procesie wnikania do wnętrza komórek [25, 77]. W linii komórkowej nerki świni wykryto, że wirus powoduje tymczasowy zanik aktynowych włókien naprężeniowych. Proces zaniku rozpoczyna się w 4 godzinie po zakażeniu, zaś aktyna kumulowana jest pod błoną komórkową. W 10 godzinie następuje odbudowa struktury włókien aktynowych, za co odpowiedzialne są białka wirusowe [79]. W przypadku innej linii komórkowej – szczurzych neuronów, zaobserwowano



tworzenie długich filamenów aktyny wewnątrz jądra, na zakończeniach których znajdowały się nukleokapsydy. Dodatkowo stwierdzono kolokalizację białka kapsydu wirusa VP26 z białkiem motorycznym aktyny – miozyną V. Dowodzi to, że obecność filamentów aktynowych w jądrze jest niezbędna do uformowania nukleokapsydów, zaś mikrofilamenty wykorzystywane są do ich transportu [26]. W przypadku zakażenia SuHV-1 zaobserwowano również tworzenie się długich włókien komórkowych, rozciągających się na sąsiednie komórki, których powstanie indukuje wirusowe białko US3. Włókna te umożliwiają rozprzestrzenianie się wirusa między komórkami [24, 25].

Odmienne wpływy na cytoskielet ma ludzki herpeswirus typu 5 (HHV-5; CMV). Badania prowadzone na hodowli fibroblastów wykazały, że zakażenie HHV-5 doprowadziło do skrócenia i zniszczenia filamentów aktynowych. Dodatkowo oznaczenia poziomu ekspresji za pomocą techniki RT-PCR wykazały zmniejszenie ilości mRNA kodującego aktynę w fibroblastach zakażonych wirusem, w porównaniu z hodowlą niezakażoną [43].

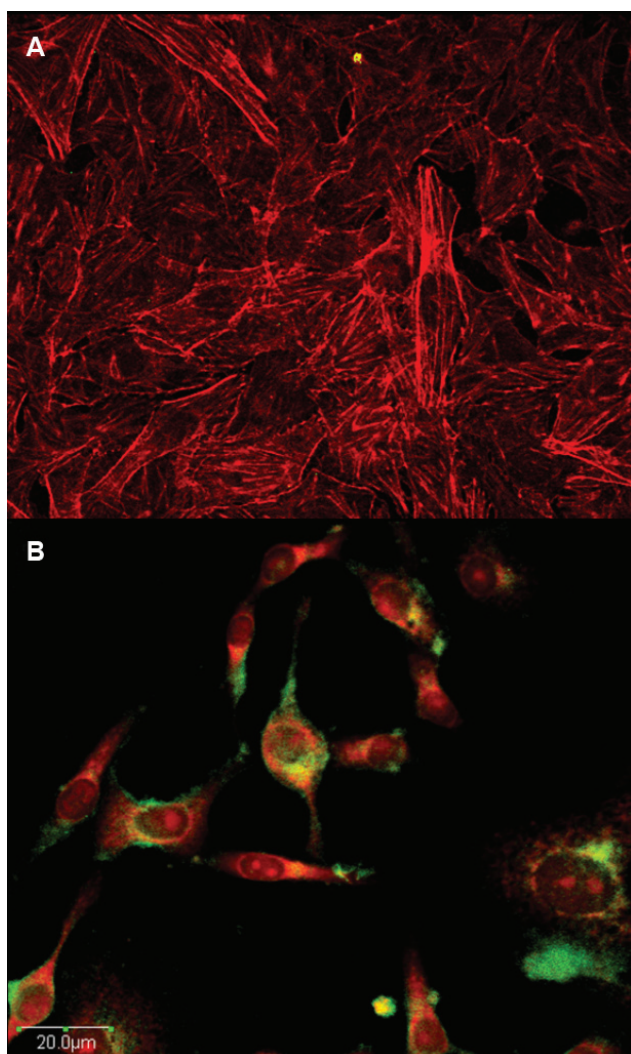
Rearanżację cytoskieletu powodują również ludzkie  $\gamma$ -herpeswirusy, takie jak herpeswirus typu 4 (HHV-4; EBV) oraz herpeswirus typu 8 (HHV-8, KSHV) [31, 61]. Pierwszy z nich ustala stan zakażenia latentnego w limfocytach B. W hodowli *in vitro* limfocyty B szybko giną bez podziałów, natomiast dodanie do ich hodowli HHV-4 powoduje transformację w komórki blastyczne, zdolne do dzielenia się w nieskończoność. Dokładny jej mechanizm nie został dotąd poznany, wiadomo jednak, że szczepy HHV-4 zdolne do transformacji, mają również zdolność do szybkiej konwersji G-aktyny w F-aktynę. Polimeryzacja aktyny jest możliwa dzięki wirusowemu białku p55, które wiąże się z G-aktyną i indukuje tworzenie filamentów aktynowych. Dodanie do hodowli inhibitora aktyny – cytochalazyny powoduje zahamowanie indukowanej przez ludzkiego herpeswirusa typu 4 proliferacji limfocytów B [49, 51].

Kolejną rodziną wirusów wykorzystującą cytoskielet aktynowy są patogeny owadów z rodziny *Baculoviridae*. W wyniku zakażenia AcMNPV (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*) owadziej hodowli komórkowej *Spodoptera frugiperda* dochodzi do reorganizacji cytoskieletu aktynowego [14, 70]. Podczas replikacji wirus wykorzystuje białka komórkowe gospodarza: w pierwszych etapach zakażenia w komórce powstają długie, cienkie włókna aktynowe, łączące błonę komórkową z jądrem. Znajdująca się w cytoplazmie G-aktyna zaczyna polimeryzować zaraz po uwolnieniu do cytoplazmy nukleokapsydów. Powstałe włókna F-aktyny najprawdopodobniej ułatwiają penetrację nukleokapsydów do wnętrza jądra komórki. Proces formowania włókien rozpoczyna się po 30 minutach od momentu zakażenia i jest niezależny od syntezy białek wirusowych [10]. Po 6 godzinach od zakażenia komórka

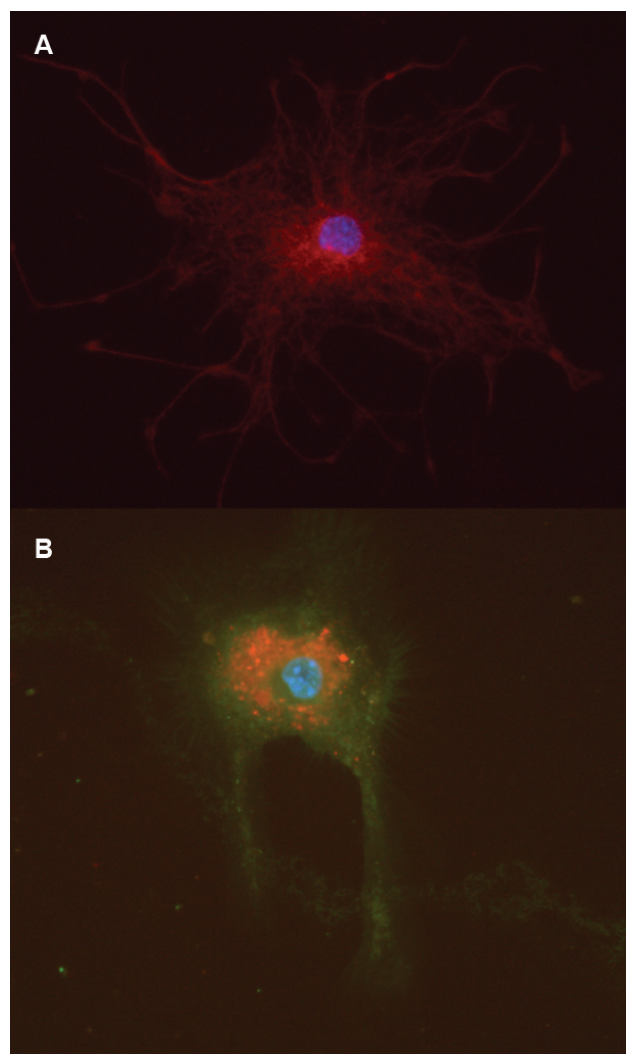
zaczyna się zaokrąglać i następuje synteza wirusowego DNA [10, 57]. Równocześnie w komórce pojawiają się wewnętrzne agregaty F-aktyny. Są to nietrwale struktury, występujące u 10–20% zakażonych komórek [9]. W końcowym etapie dochodzi do gromadzenia się G-aktyny w jądrze. Proces ten indukowany jest przez wczesne geny wirusowe (IE-1, PE38, HE65, Ac004, Ac102, Ac152) [30, 57]. W bezpośrednim wiązaniu aktyny biorą udział dwa wirusowe białka – p39 i p78/83 [42]. Ponadto, p78/83 zawiera regiony homologiczne do białek z rodziny WASP, mające zdolność do wiązania się z monomerami aktyny oraz białkowy kompleks ARP2/3, indukujący proces jej polimeryzacji w jądrze zakażonej komórki. Prowadzi to do powstania nuklearnych włókien F-aktyny, które są niezbędne w składaniu i morfogenezie nukleokapsydów [30, 56, 80]. Oznacza to, że polimeryzacja aktyny zależna jest od nagromadzenia się w jądrze trzech elementów: G-aktyny, białka p78–98 oraz białkowego kompleksu 2/3 (ARP2/3). Do tej pory nie poznano mechanizmu wyjaśniającego w jaki sposób białka te są transportowane do wnętrza jądra w czasie zakażenia bakulowirusem. W badaniach z zastosowaniem inhibitora aktyny – cytochalazyny D, która hamowała formowanie się włókien aktynowych w jądrze potwierdzono, że wirus ten wykorzystuje cytoskielet komórki w trakcie swojej replikacji. Zastosowanie cytochalazyny D spowodowało zahamowanie produkcji cząstek zakaźnych wirusa [80, 81].

Odmienne zmiany w cytoskiecie wywołuje należąca do rodziny *Iridoviridae* żabi wirus 3 (FV3; *frog virus 3*). W początkowej fazie zakażenia FV3 cytoskielet aktynowy zostaje zniszczony, włókna naprężeniowe zanikają, pozostają jedynie cienkie filamenty aktyny [53, 54]. W późniejszych stadiach zakażenia, w komórce pojawiają się struktury (pęcherzyki, mikroosmki) zawierające aktynę pochodzącą ze zniszczonych włókien naprężeniowych. Powstają one *de novo* na powierzchni komórki w odpowiedzi na dojrzewanie wirusa i wykorzystywane są do uwalniania wirionów potomnych [54]. Potwierdziły to badania z zastosowaniem inhibitora polimeryzacji aktyny – cytochalazyny D, w których stwierdzono nagromadzenie się dojrziałych wirionów tuż pod powierzchnią błony komórkowej [53, 54].

Kolejnymi wirusami, które wykorzystują białka cytoskieletu w trakcie swojej replikacji są wirusy paramyksowirusy: odry (MV; *measles virus*) i Sendai (SV; *Sendai virus*). Podczas zakażenia dochodzi do polimeryzacji aktyny, która następnie jest wykorzystywana w procesie transportu białek otoczki na powierzchnię komórki, w komunikacji pomiędzy białkami otoczki a nukleokapsydem, jak również bierze udział w uwalnianiu wirionów z komórki [23, 65, 74]. Ciekawy w przypadku *Paramyxoviridae* jest fakt, że elementy aktynowe pochodzące z komórki znajdują się również wewnątrz uwolnionych wirionów [73, 84]. Badania biochemiczne



Rys. 1. A – włókna F-aktynowe w kontrolnej niezakażonej linii Vero (kolor czerwony). B – komórki linii Vero zakażone izolatami klinicznym HHV-1 w 24 godziny po zakażeniu. Widoczne silne zmiany morfologiczne komórek, które tracą kontakt z sąsiednimi komórkami, za wyjątkiem cienkich tworów aktynowych (kolor czerwony) z obecnymi antygenami HHV-1 (kolor zielony) [Zdjęcie: Magdalena Solarska].



Rys. 2. A – kontrolna niezakażona hodowla pierwotna neuronów mysich z gęstą siecią mikrotubul (kolor czerwony) i jądrami komórkowymi (kolor niebieski). B – hodowla neuronów mysich zakażona szczepem Jan-E EHV-1 w 48 godzin po zakażeniu. Widoczna reorganizacja sieci mikrotubul i ich kondensacja w miejscach nagromadzenia się antygenu wirusowego, najczęściej wokół jądra komórkowego. [Zdjęcie: Anna Słowska].

wirusa Sendai i wirusa choroby Newcastle (NDV; *Newcastle disease virus*;) wykazały, że aktyna specyficznie związana jest z białkiem M [29]. Sugeruje to udział włókien aktyny w transporcie nukleokapsydów z cytoplazmy na powierzchnię komórki, gdzie dochodzi do uwalniania dojrzałych wirionów oraz związania aktyny z nukleokapsydami SV i MV *in vitro* [7, 52, 64, 65]. Depolimeryzacja aktyny w wyniku zastosowania cytochalazyny B doprowadziła do zahamowania procesu uwalniania nowych wirionów, a tym samym do nagromadzenia nukleokapsydów wewnątrz zakażonej komórki. Oznacza to, że nienaruszone elementy cytoszkieletu są niezbędne do prawidłowego namnażania wirusa [64].

Dodatkowo aktyna może wpływać na transkrypcję genomów niektórych paramyksowirusów, w tym ludz-

kiego wirusa paragrypy typu 3 (HPIV-3; *Human Parainfluenza Virus Type 3*). Obie formy aktyny wiążą się z rybonukleoproteinowym (ribonucleoprotein; RNP) kompleksem wirusa i wpływają na syntezę mRNA. Obecność cytochalazyny powoduje zahamowanie syntezy wirusowego RNA, nagromadzenie rybonukleoprotein oraz ograniczenie transkrypcji wirusa [32].

#### 4. Relacje pomiędzy zakażeniem wirusowym a strukturą i funkcjonowaniem mikrotubul

Z badań nad interakcjami pomiędzy wirusami, a cytoszkieletem wynika, że cykle replikacyjne większości wirusów przebiegają prawidłowo tylko w przypadku,

gdy nienaruszona jest struktura mikrotubul. Dowodzi to, iż odgrywają one znaczącą rolę w przebiegu zakażeń wywołanych przez przedstawicieli wielu różnych rodzin, wśród których jako pierwszą można wymienić rodzinę *Herpesviridae*.

W przypadku końskiego herpeswirusa typu 1 (EHV-1) zaobserwowano, że w hodowli komórek ED, powodował on kondensację mikrotubul w miejscach nagromadzenia antygeny wirusowego. Efektu tego nie stwierdzono w zakażonych komórkach linii Vero, natomiast trudno było w nich ustalić lokalizację MTOC, co może sugerować, że jego struktura w przebiegu zakażenia uległa rearanżacji lub zniszczeniu [72]. Wiadomo, że do uszkodzenia MTOC może dochodzić także w przypadku zakażenia innymi herpeswirusami m.in. HHV-1 oraz HHV-5. Niekiedy sytuacja bywa jednak odwrotna i wirus stymuluje powstanie wielu MTOC, czego przykładem może być HBV (*hepatitis B virus*) [27].

Ponadto po zablokowaniu funkcji mikrotubul poprzez zastosowanie nokodazolu zaobserwowano gromadzenie się antygeny wirusowego w okolicy jąder komórkowych. Może to świadczyć o tym, że zarówno transport w kierunku jądra komórkowego jak i replikacja wirusa nie zostały zahamowane, jednak transport wirionów w kierunku błony cytoplazmatycznej został znacznie ograniczony. Ponadto w badaniach ilościowych techniką RT-PCR stwierdzono, że po zastosowaniu nokodazolu ilość wirusa w komórkach spadła [72].

Istnieje również wiele danych świadczących o kluczowej roli mikrotubul w transporcie wewnątrzkomórkowym ludzkiego herpeswirusa typu 1 [60]. Po wnikięciu do komórki, wiriony transportowane są w kierunku jądra komórkowego wzdłuż mikrotubul przy udziale kompleksu białek transportowych w skład którego wchodzi dyneina i dynaktyna. Dotyczy to zarówno komórek nabłonkowych jak i nerwowych [20]. W badaniach potwierdzono, że do przemieszczania wirionów w kierunku jądra komórkowego konieczna jest nienaruszona struktura mikrotubul. Zaobserwowano, że po zastosowaniu nokodazolu efektywność replikacji była zredukowana o ok. 90% [45]. Ponadto w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej stwierdzono kolokalizację kapsydów wirusowych z cytoplazmatyczną dyneiną i dynaktyną. Obecnie wiadomo, że z lekkimi łańcuchami dyneiny łączy się białko kapsydu VP26 [18]. Wykazano jednak, że nawet w przypadku jego braku transport wirionów nie jest zaburzony, co sugeruje występowanie innych receptorów dla dyneiny i dynaktyny [21]. Natomiast zablokowanie funkcji dyneiny powoduje zmniejszenie ilości kapsydów wirusowych transportowanych do jądra komórkowego. Zahamowana zostaje także synteza białek wirusowych [19]. Nie ma to jednak wpływu na przyłączanie wirusa do błony cytoplazmatycznej, ani jego wnikiwanie do komórki. W przypadku HHV-1 również

proces uwalniania wirionów potomnych z komórki nie jest uzależniony od struktury mikrotubul [4].

Podobna sytuacja występuje w przypadku ludzkiego herpeswirusa typu 3 (HHV-3; VZV), który powoduje zmianę architektury mikrotubul, natomiast po zastosowaniu inhibitora wydajność replikacji ulega obniżeniu. Przepuszcza się również, że mikrotubule odgrywają znaczącą rolę w wewnątrzkomórkowym transporcie wirionów [41].

Wciąż jednak niewiele wiadomo na temat mechanizmów transportu neurotropowych  $\alpha$ -herpeswirusów w komórkach nerwowych z ciała komórki, gdzie ustalają stan latencji, do zakończeń aksonów w trakcie reaktywacji. W przypadku HHV-1 zaobserwowano kolokalizację nukleokapsydów z białkiem motorycznym kinezyną [22]. Ustalono, że wiąże się ona z białkiem tegumentu wirusa – US11. U innych neurotropowych herpeswirusów nie występują jednak białka homologiczne do US11. Tym niemniej, w obrębie rodziny *Herpesviridae* znane są przypadki, gdy różne białka, u różnych gatunków pełnią tę samą funkcję [16].

Również inne białka tegumentu mogą brać udział w transporcie łącząc się białkami motorycznymi, na przykład US3, UL36 i UL37 występujące u wirusa wścieklizny rzekomej, VP5 i UL9 u HHV-1, czy UL56 u HHV-2 [39, 44]. Zaobserwowano także, że SuHV-1 podobnie jak wirusy opryszczki, adenowirusy, HIV oraz wirus grypy w trakcie transportu wzdłuż mikrotubul mogą się zatrzymywać, ruszać ponownie, zmieniać kierunek, a nawet przemieszczać się pomiędzy różnymi włóknami mikrotubul. Pozwala to wirusowi na dotarcie w dowolny rejon komórki, jak również na skorygowanie ewentualnych błędów w trakcie transportu [21].

Ponieważ poznanie mechanizmów transportu cząstek wirusowych wewnątrz komórki gospodarza, może prowadzić do stworzenia nowych leków przeciwwirusowych, zainteresowanie badaczy skupiło się na takich rodzinach wirusów jak *Retroviridae*, której przedstawicielem jest HIV-1 (*human immunodeficiency virus*, ludzki wirus niedoboru odporności). Uważa się, że po wnikięciu do komórki wirus ten wykorzystuje mikrofilamenty aktynowe, aby przedostać się do mikrotubul, wzdłuż których transportowany jest w kierunku jądra komórkowego [55]. Natomiast w dalszych etapach cyklu replikacyjnego cząstki wirusowe transportowane są z cytozolu w kierunku błony komórkowej [21]. Ponadto udowodniono, że jednoczesne użycie inhibitorów polimeryzacji aktyny i mikrotubul prowadzi do całkowitego zablokowania transportu wewnątrzkomórkowego wirusa [48]. Wirusy te mogą wykorzystywać mikrotubule również do przemieszczania się z komórki do komórki. Przykładem jest ludzki wirus białaczki z komórek T (HTLV; *human T-cell leukaemia virus*), który stymuluje wytworzenie pomiędzy limfocytami T (zakażonym i niezakażonym) tak zwanej synapsy wirusologicznej. W komórce zakażonej MTOC znajduje się



w pobliżu błony cytoplazmatycznej w miejscu adhezji obu komórek [21].

Mikrotubule wykorzystywane są również przez adenowirusy. Dzięki receptorowi znajdującemu się na kapsydzie wirusy te mają zdolność do łączenia się z dyneiną lub dynaktyną, co z kolei pozwala na transport cząstek wirusowych w kierunku jądra komórkowego (koniec ujemny mikrotubul), jak również ułatwia ich ucieczkę z endosomu. Zaobserwowano, że przy nadekspresji dynamityny (zaburzenie funkcji kompleksu dyneina – dynaktyna) lub po zastosowaniu przeciwciał blokujących funkcje dyneiny, zakres oraz częstotliwość transportu wirionów w kierunku jądra są ograniczone, częściej natomiast występuje transport w kierunku przeciwnym [20, 21]. Ponadto, w komórkach zakażonych adenowirusem powstają charakterystyczne, długie mikrotubule, sięgające od MTOC do peryferii komórki. Dzieje się tak, ponieważ dominują tu procesy wydłużania mikrotubul, które wykazują także większą stabilność [86].

Udowodniono również, że mikrotubule mają istotny wpływ na replikację wirusa odry (*Paramyxoviridae*). Zaobserwowano, że zahamowanie polimeryzacji mikrotubul w komórkach Vero hamowało uwalnianie nowych cząstek wirusowych. Jednak pomimo to, proces replikacji wirusa zachodził na poziomie porównywalnym z kontrolą [5, 6].

Nie zawsze jednak dochodzi do bezpośredniej interakcji pomiędzy mikrotubulami, a cząstkami wirusowymi. W przypadku parwowirusa psiego (CPV; *canine parvovirus*) wykazano, że mikrotubule odpowiadają za transport pęcherzyków endosomalnych zawierających cząstki CPV w kierunku jądra komórkowego [2, 3, 69, 82]. Zablockowanie funkcji mikrotubul za pomocą nokodazolu prowadzi do zaburzeń w przebiegu zakażenia. Zaburzenia te polegają na braku uwalniania cząstek CPV z endosomów oraz na ich eliminacji z jądra komórkowego, które stanowi miejsce replikacji [69].

Interakcje wirusów z cytoszkieletem, nie muszą być związane tylko i wyłącznie z transportem. Przykład może stanowić wirus krowianki, w przypadku którego do prawidłowej ekspresji genów wirusowych niezbędne są nienaruszone mikrotubule [59]. Ponadto wirus krowianki wykorzystuje mikrotubule do transportu cząstek wirusowych z tzw. fabryk wirusowych w kierunku MTOC, gdzie zyskują one otoczkę, a następnie na peryferie komórki z prędkością ok. 1–2  $\mu\text{m/s}$ , prawdopodobnie z wykorzystaniem kinezy-1 [21]. Zaobserwowano również, że wiriony mogą przemieszczać się pomiędzy mikrotubulami [28, 36, 46, 63, 85].

Zupełnie inaczej wygląda sytuacja w przypadku przedstawicieli rodziny *Baculoviridae*. Zahamowanie polimeryzacji mikrotubul, na przykład poprzez podanie nokodazolu, prowadzi tu do wzmożonej ekspresji genów wirusowych. Przepuszczalnie dzieje się tak, ponieważ

bakulowirusy wykorzystują do transportu w kierunku jądra cytoszkielet aktynowy, a mikrotubule, stanowią wówczas jedynie przeszkodę [21, 78].

Udowodniono również, że wirusy mogą wykorzystywać mikrotubule nie tylko do przemieszczania się w obrębie zakażonej komórki. Ostatnie badania ujawniły, że białko P wirusa wścieklizny (*Rhabdoviridae*), wpływa na transport białek STAT (czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez interferon). Przy czym wirusowe białko P może zarówno ułatwiać jak i hamować związany z mikrotubulami transport białek komórkowych. W ten sposób wirus blokuje szlaki sygnałowe interferonu odgrywające kluczową rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [50].

## 5. Podsumowanie

Poznanie współzależności pomiędzy różnorodnymi formami transportu wewnątrzkomórkowego, w których czynny udział biorą białka motoryczne: miozyna, dynaktyna, kinezy, wzmocniło naszą wiedzę o patogenie zakażeń wirusowych [37, 59]. Dane literaturowe, poświęcone zmianom zachodzącym w cytoszkiecie zakażonych komórek, opisują różnorodne zmiany dotyczące, zarówno w układzie mikrotubul, jak i włókien F-aktynowych [17, 25]. W licznych badaniach udowodniono, że podczas zakażenia litycznego wirusy przebudowują poszczególne elementy komórki w zależności od swoich potrzeb. Mechanizmem przemieszczenia i/lub zakażenia sąsiednich komórek, w którym cytoszkielet odgrywa kluczową rolę, jest transport z komórki do komórki [37, 59]. Jest on najbezpieczniejszy z punktu widzenia wirusa, ponieważ odbywa się bez narażenia wirionów potomnych na kontakt z przeciwciałami neutralizującymi znajdującymi się zewnątrzkomórkowo.

Znajomość transportu i zasad, na którym się opiera, może być nowym punktem uchwytu, który zostanie wykorzystany w terapii przeciwwirusowej, gdzie mechanizm działania leków nie będzie opierał się na hamowaniu wirusowych enzymów, lecz na hamowaniu specyficznych interakcji pomiędzy wirusem a gospodarzem. Coraz powszechniejsza oporność wirusów na dotychczas stosowane leki, wymusza opracowanie nowych metod terapeutycznych nieopartych na syntetycznych związkach chemicznych. Być może, zahamowanie cyklu replikacyjnego poprzez inhibicję lub aktywację białka biorącego udział w transporcie wirusa do miejsca jego namnażania czy też proteiny umożliwiającej mu zakażenie sąsiednich zdrowych komórek znajdzie zastosowanie kliniczne. Jest to szczególnie istotne w dobie narastających oporności patogenów na stosowane leki w terapii farmakologicznej, jak i wzrost odsetka populacji charakteryzującej się zaburzeniami ze strony układu immunologicznego jak np. nosiciele HIV, pacjenci po



transplantacji narządów. Cytoszkielec i białka na niego oddziałujące, zarówno pochodzenia komórkowego, jak i wirusowego, potencjalnie stanowią cenne narzędzie umożliwiające dostarczenie genów, kwasów nukleinowych lub białek aktywnych do miejsc ich działania.

#### Podziękowania

Zdjęcia wykorzystane w niniejszej pracy zostały wykonane w trakcie badań finansowanych z grantu MNiSW 5010102340028.

#### Piśmiennictwo

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: The Cytoskeleton (w) Molecular biology of the cell – 4<sup>th</sup> Edition. Red. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Garland Science, New York 2002, s. 907–982
- Aniento F., Emas N., Griffiths G., Gruenberg J.: Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**, 1373–1387 (1993)
- Arduino P.G., Porter S.R.: Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J. Oral Pathol. Med.* **37**, 107–121 (2008)
- Avitabile E., Gaeta S., Torrisi M.R., Ward P., Roizman B., Campadelli-Fiume G.: Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J. Virol.* **69**, 7472–7482 (1995)
- Bedows E., Rao K., Welsh J.: Fate of microfilaments in Vero cells infected with measles virus and herpes simplex virus type 1. *Mol. Cell Biol.* **3**, 712–719 (1983)
- Berghäll H., Wallén C., Hyypiä T., Vainionpää R.: Role of cytoskeleton components in Measles virus replication. *Arch. Virol.* **149**, 891–901 (2004)
- Bohn W., Rutter G., Hohenberg H., Mannweiler K., Nobis P.: Involvement of actin microfilaments in the budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology*, **149**, 91–106 (1986)
- Brett J.G., Goodman G.C.: Cytoskeletal organization affects cellular responses to cytochalasins: comparison of a normal line and its transformant. *Tissue Cell*, **18**, 175–199 (1986)
- Charlton C.A., Volkman L.E.: Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* **65**, 1219–1227 (1991)
- Charlton C.A., Volkman L.E.: Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*, **197**, 245–254 (1993)
- Cudmore S., Cossart P., Griffiths G., Way M.: Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, **378**, 636–638 (1995)
- Cudmore S., Reckmann I., Griffiths G., Way M.: Vaccinia virus: a model system for actin-membrane interactions. *J. Cell Sci.* **109**, 1739–1747 (1996)
- Cudmore S., Reckmann I., Way M.: Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **5**, 142–148 (1997)
- Cunningham J.C.: Field trials with baculoviruses: control of forest insect pests. (w) Microbial and viral insecticides. Red. E. Kurstak, Marcel Dekker, New York 1982, s. 335–386
- Deacon S.W., Serpinskaya A.S., Vaughan P.S., Fanaraga M.L., Vernos I., Vaughan K. T., Gelfand V.I.: Dynactin is required for bi-directional organelle transport. *J. Cell Biol.* **3**, 297–301 (2003)
- Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Diefenbach E., Holland D.J., Boadle R.A., Armati P.J., Cunningham A.L.: Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J. Virol.* **76**, 3282–3291 (2002)
- Diefenbach R.J., Miranda-Saksena M., Douglas M.W., Cunningham A.L.: Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev. Med. Virol.* **18**, 35–51 (2008)
- Douglas M.W., Diefenbach R.J., Homa F.L., Miranda-Saksena M., Rixon F.J., Vittone V., Byth K., Cunningham A.L.: Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J. Biol. Chem.* **279**, 28522–28530 (2004)
- Döhner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Valee R., Sodeik B.: Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2795–2809 (2002)
- Döhner K., Sodeik B.: The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **285**, 67–108 (2004)
- Döhner K., Nagel C.H., Sodeik B.: Viral stop-and-go along microtubules: taking ride with dynein and kinesins. *Trend. Microbiol.* **13**, 320–327 (2005)
- Döhner K., Radtke K., Schmidt S., Sodeik B.: Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26. *J. Virol.* **80**, 8211–8224 (2006)
- Ehrnst A., Sundqvist K.G.: Polar appearance and nonligand induced spreading of measles virus hemagglutinin at the surface of chronically infected cells. *Cell*, **6**, 351–359 (1975)
- Favoreel H.W., Van Minnebruggen G., Adriaensen D., Nauwynck H.J.: Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8990–8995 (2005)
- Favoreel H.W., Van den Broeke C., Desplanques A., Deruelle M., Van Minnebruggen G., Nauwynck H., Glorieux S., Van Opdenbosch N., De Regge N.: Alphaherpesvirus use and misuse of cellular actin and cholesterol. *Vet. Microbiol.* **143**, 2–7 (2010)
- Feierbach B., Piccinotti S., Bisher M., Denk W., Enquist L.W.: Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments. *PLOS Pathog.* **2**, 763–776 (2006)
- Forgues M., Difilippantonio M.J., Linke S.P., Ried T., Nagashima K., Feden J., Valerie K., Fukasawa K., Wang X.W.: Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5288–5292 (2003)
- Geada M.M., Galindo I., Lorenzo M.M., Perdinguero B., Blasco R.: Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *J. Gen. Virol.* **82**, 2747–2760 (2001)
- Giuffrè R.M., Tovell D.R., Kay C.M., Tyrrell D.L.: Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin. *J. Virol.* **42**, 963–968 (1982)
- Goley E.D., Ohkawa T., Mancuso J., Woodruff J.B., D'Alessio J.A., Cande W.Z., Volkman L.E., Welch M.D.: Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, **314**, 464–467 (2006)
- Greene W., Gao S.J.: Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathog.* **5**, 7 (2009)
- Gupta S., De B.P., Drazba J.A., Banerjee A.K.: Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J. Virol.* **72**, 2655–2662 (1998)
- Hiller G., Weber K., Schneider L., Parajsz C., Jungwirth C.: Interaction of assembled progeny pox viruses with the cellular cytoskeleton. *Virology*, **98**, 142–153 (1979)
- Hiller G., Jungwirth C., Weber K.: Fluorescence microscopical analysis of the life cycle of vaccinia virus in the chick embryo fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **132**, 81–87 (1981)

35. Hirokawa N.: Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519–526 (1998)
36. Holinshead M., Rodger G., Van Eijl H., Law M., Holinshead R., Vaux D.J., Smith G.L.: Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J. Cell Biol.* **154**, 389–402 (2001)
37. Hsieh M.J., White P.J., Pouton C.W.: Interaction of viruses with host cell molecular motors. *Curr Opin Biotechnol.* **21**, 633–539 (2010)
38. King S.M.: Dynein motors: structure, mechanochemistry and regulation. (w) *Molecular Motors*. Red. M. Schliwa, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2003, s. 45–78
39. Koshizuka T., Kawaguchi Y., Nishiyama Y.: Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIF1A. *J. Gen. Virol.* **86**, 527–533 (2005)
40. Krempien U., Schneider L., Hiller G., Weber K., Katz E., Jungwirth C.: Conditions for pox virus specific microvilli formation studied during synchronized virus assembly. *Virology*, **113**, 556–564 (1981)
41. Kuhn M., Desloges N., Rahaus M., Wolff M.: Varicella-zoster virus infection influences expression and organization of actin and  $\alpha$ -tubulin but does not affect lamin A and vimentin. *Intervirology*, **48**, 312–320 (2005)
42. Lanier L.M., Volkman L.E.: Actin binding and nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Virology*, **243**, 167–177 (1998)
43. Lin M., Wei G., Huang H., Cai Z.: Human cytomegalovirus induces alteration of  $\beta$ -actin mRNA and microfilaments in human embryo fibroblast cells. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **5**, 733–737 (2004)
44. Luxton G.W., Haverlock S., Collier K.E., Antinone S.E., Pincetic A., Smith G.A. Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5639–5640 (2005)
45. Mabit H., Nakano M., Prank U., Saam B., Döhner K., Sodeik B., Greber U.: Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J. Virol.* **76**, 9962–9971 (2002)
46. Mallardo M., Schleich S., Locker J.K.: Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core – derived mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3875–3891 (2001)
47. Marewicz E.: Wpływ patogennych drobnoustrojów i ich toksyn na organizację cytoszkieletu komórek. *Post. Mikrobiol.* **35**, 79–96 (1996)
48. McDonald D., Vodicka M.A., Lucerno G., Svitkina T.M., Borisy G.G., Emerman M., Hope T.J.: Visualisation of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* **159**, 441–452 (2002)
49. Melamed I., Stein L., Roifman C.M.: Epstein-Barr virus induces actin polymerization in human B cells. *J. Immunol.* **153**, 1998–2003 (1994)
50. Moseley G.W., Lahaye X., Roth D.M., Oksayan S., Filmer R.P., Rowe C.L., Blondel D., Jans D.A.: Dual modes of rabies P-protein association with microtubules: a novel strategy to suppress the antiviral response. *J. Cell Sci.* **122**, 3652–3662 (2009)
51. Mosialos G., Yamashiro S., Baughman R.W., Matsudaira P., Vara L., Matsumura F., Kieff E., Birkenbach M.: Epstein-Barr virus infection induces expression in B lymphocytes of a novel gene encoding an evolutionarily conserved 55-kilodalton actin-bundling protein. *J. Virol.* **68**, 7320–7328 (1994)
52. Moyer S.A., Baker S.C., Horikami S.M.: Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.* **71**, 775–783 (1990).
53. Murti K.G., Chen M., Goorha R.: Interaction of frog virus 3 with the cytomatrix. III. Role of microfilaments in virus release. *Virology*, **30**, 317–325 (1985)
54. Murti K.G., Goorha R.: Interaction of frog virus-3 with the cytoskeleton. I. Altered organization of microtubules, intermediate filaments, and microfilaments. *J. Cell Biol.* **96**, 1248–1257 (1983)
55. Naghavi M.H., Goff S.P.: Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 402–407 (2007)
56. Ohkawa T., Rowe A.R., Volkman L.E.: Identification of six *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus early genes that mediate nuclear localization of G-actin. *J. Virol.* **75**, 12281–12289 (2002)
57. Ohkawa T., Volkman L.E.: Nuclear F-actin is required for *AcMNPV* nucleocapsid morphogenesis. *Virology*, **264**, 1–4 (1999)
58. Papakonstanti E.A., Vardaki E. A., Stournaras C.: Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol. Biochem.* **10**, 257–264 (2000)
59. Radtke K., Döhner K., Sodeik B.: Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* **8**, 387–400 (2006)
60. Radtke K., Kienek D., Wolfstein A., Michael K., Steffen W., Scholz T., Karger A., Sodeik B.: Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog.* **8**, 6 (2010).
61. Raghu H., Sharma-Walia N., Veetil M.V., Sadagopan S., Chandran B.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J. Virol.* **83**, 4895–4911 (2009)
62. Reisler E., Egelman E.H.: Actin structure and function: what we still do not understand. *J. Biol. Chem.* **282**, 36133–36137 (2007)
63. Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmstrom A., Frischknecht F., Zetti M., Zimmermann T., Way M.: Kinesin dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat. Cell Biol.* **3**, 992–1000 (2001)
64. Stallcup K.C., Wechsler S.L., Fields B.N.: Purification of measles virus and characterization of subviral components. *J. Virol.* **30**, 166–176 (1979)
65. Stallcup K.C., Raine C.S., Fields B.N.: Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology*, **124**, 59–74 (1983)
66. Steele-Mortimer O., Knodler L.A., Finlay B.B.: Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic*, **1**, 107–118 (2000)
67. Stokes G.V.: High-voltage electron microscope study of the release of vaccinia virus from whole cells. *J. Virol.* **18**, 636–643 (1976)
68. Stossel T.P.: Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* **99**, 15–21 (1984)
69. Suikkanen S., Aaltonen T., Nevalainen M., Valilehto O., Lindholm L., Vuento M., Vihinen-Ranta M.: Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic towards the nucleus. *J. Virol.* **77**, 10270–10279 (2003)
70. Tjia S.T., Carstens E.B., Doerfler W.: Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. II. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology*, **99**, 391–409 (1979)
71. Turowska A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M.W.: Wpływ zakażenia końskim herpeswirusem typu 1 (EHV-1) na aktywne struktury szkieletu komórkowego. *Medycyna Wet.* **63**, 80–83 (2007)
72. Turowska A., Pająk B., Godlewski M.M., Dzieciatkowski T., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M.: Opposite effects of two different strains of equine herpesvirus 1 infection on cytoskeleton composition in equine dermal ED and African green monkey kidney Vero cell lines: application of scanning

- cytometry and confocal-microscopy-based image analysis in a quantitative study. *Arch. Virol.* **155**, 733–743 (2010)
73. Tyrrell D.L.J., Norrby E.: Structural polypeptides of measles virus. *J. Gen. Virol.* **39**, 219–229 (1978)
74. Tyrrell D.L.J., Erhn A.: Transmembrane communication in cells chronically infected with measles virus. *J. Cell Biol.* **81**, 396–402 (1979)
75. Vallee R.B., Williams J.C., Varma D., Barnhart L.E.: Dynein: an ancient motor protein involved in multiply modes of transport. *J. Neurobiol.* **58**, 189–200 (2004)
76. Van den Broeke C., Radu M., Deruelle M., Nauwynck H., Hofmann C., Jaffer Z.M., Chernoff J., Favoreel H.W.: Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8707–8712 (2009)
77. Van den Broeke C., Deruelle M., Nauwynck H.J., Coller K.E., Smith G.A., Van Doorselaere J., Favoreel H.W.: The kinase activity of pseudorabies virus US3 is required for modulation of the actin cytoskeleton. *Virology*, **385**, 155–160 (2009)
78. Van Loo N.D., Fortunati E., Ehlert E., Rabelink M., Grosveld F., Scholte B.J.: Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* **75**, 961–970 (2001)
79. Van Minnebruggen G., Van de Walle G.R., Favoreel H.W., Nauwynck H.J., Pensaert M.B.: Temporary disturbance of actin stress fibers in swine kidney cells during pseudorabies virus infection. *Vet. Microbiol.* **86**, 89–94 (2002)
80. Volkman L.E., Goldsmith P.A., Hess R.T.: Evidence for microfilament involvement in budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus production. *Virology*, **156**, 32–39 (1987)
81. Volkman L.E.: Autographa californica MNPV nucleocapsid saaembly: inhibition by cytochalasin D. *Virology*, **163**, 547–553 (1988)
82. Vuento M.: Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* **76**, 4401–4411 (2002)
83. Walter I., Nowotny N.: Equine herpes virus type 1 (EHV-1) infection induces alterations in the cytoskeleton of Vero cells but not apoptosis. *Arch. Virol.* **144**, 1827–36 (1999)
84. Wang E., Wolf B.A., Lamb R.A., Choppin P.W., Goldberg A.R.: The presence of actin in enveloped viruses. (w) Cell motility. Red. R. Goldman, T. Pollard, J. Rozenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1976, s. 589–599
85. Ward B.M., Moss B.: Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J. Virol.* **75**, 11651–11663 (2001)
86. Warren J.C., Rutkowski A., Cassimeris L.: Infection with replication – deficient adenovirus induces changes in the dynamic instability of host cell microtubules. *Biol. Mol. Cell*, **17**, 3557–3568 (2006)

Kamila Caraballo Cortés<sup>1\*</sup>, Marek Radkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C. 3. Zastosowanie interferonu alfa (IFN- $\alpha$ ) i rybawiryny w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (pwzw C). 4. Czynniki wpływające na skuteczność leczenia. 4.1. Czynniki osobnicze. 4.2. Czynniki wirusowe. 5. Znaczenie kliniczne analizy regionu E2 HVR1 HCV. 6. Zmienność E2 HVR1 a prognozowanie skuteczności leczenia. 7. Podsumowanie

### The influence of hepatitis C virus (HCV) genetic variability on the outcome of antiviral therapy

**Abstract:** Hepatitis C virus is an important risk factor of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The commonly used treatment strategies, based on pegylated interferon alfa and ribavirin, do not provide a fully satisfactory clinical effect. The reasons for treatment failure are multifactorial and are attributed to both host and viral factors. Some of them are already employed in clinical practice to adjust the treatment strategy (i. e. pretreatment viral load, viral load kinetics, HCV genotype), but the knowledge in this field is still unsatisfactory. The present review summarizes the causes of therapy failure, with emphasis on the high viral genetic variability and assesses the potential of this unique viral feature to be used as a treatment prognostic marker.

1. Introduction. 2. Genetic variability of hepatitis C virus. 3. Use of interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) and ribavirin in treatment of chronic hepatitis C. 4. Factors influencing the outcome of hepatitis C treatment. 4.1. Host factors. 4.2. Viral factors. 5. Clinical relevance of E2 HVR1 HCV analysis. 6. Genetic variability of E2 HVR1 as a treatment prognostic marker. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** HCV, interferon alfa, leczenie przeciwwirusowe, *quasispecies*, rybawiryna

**Key words:** alpha interferon, antiviral treatment, HCV, *quasispecies*, ribavirin

## 1. Wstęp

Ponad 20 lat od odkrycia wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), ważnego czynnika etiologicznego marskości wątroby oraz pierwotnego raka wątroby (HCC), wiele aspektów związanych z patogenezą zakażenia oraz ograniczoną skutecznością leczenia wciąż wymaga wyjaśnienia. Aktualne schematy terapii są skuteczne średnio u ok. 50% zakażonych, ponadto istnieje prawdopodobieństwo reaktywacji zakażenia w późniejszym okresie po zakończeniu leczenia. Zasadniczym celem pracy było przedstawienie danych dotyczących zmienności HCV jako możliwej przyczyny nieskuteczności leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Uwzględniono jednak również inne czynniki prognostyczne skuteczności leczenia, przede wszystkim polimorfizm genu kodującego IL-28.

## 2. Zmienność wirusa zapalenia wątroby typu C

HCV zaliczany jest do rodziny *Flaviviridae*. Genom wirusa składa się z pojedynczej, dodatnio spolaryzowanej nici RNA o długości ok. 9 600 nukleotydów

zawierającej regiony niekodujące na końcach 5' i 3' oraz region kodujący białka strukturalne i niestrukturalne. Białka tworzące wirion (strukturalne) to białka otoczki (E1, E2) oraz białko rdzenia (C), natomiast białka niestrukturalne (NS) biorą udział w namnażaniu wirusa w organizmie gospodarza. Białko NS5b pełni funkcję RNA-zależnej polimerazy RNA – enzymu replikującego wirusowy materiał genetyczny, pozbawionego aktywności „naprawczej” 3'-5' egzonukleazy. Częstość pojawiania się mutacji w genomie HCV wynosi  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  substytucji/zasadę [64]. Biorąc pod uwagę średnią produkcję kopii wirusa w fazie przewlekłej zakażenia (ok.  $10^{12}$  kopii/doba) oraz wielkość genomu HCV (ok.  $10^4$  nukleotydów), można szacować, że liczba nowych mutacji w populacji wirusa u pacjenta wynosi ok.  $10^9$ – $10^{12}$  na dobę [24, 64]. Wysoki potencjał mutacyjny polimerazy RNA HCV jest powodem występowania wirusa w organizmie jako heterogennej genetycznej populacji [46].

Innym mechanizmem zmienności jest rekombinacja, zarówno homologiczna, jak i niehomologiczna. Dodatkowo, rekombinacja może być zależna od replikacji (rekombinacja replikacyjna) lub zachodzić niezależnie od tego procesu. Udowodniono występowanie rekombinacji

<sup>1</sup> Autor korespondencyjny: Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny; ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa; tel. (22) 57 20 709; e-mail: kamila.caraballo@wum.edu.pl



HCV u pacjentów cierpiących na hemofilię, jak również u narkomanów zakażonych HCV, u których dochodzi do nadkażeń innymi genotypami [42, 60]. Średnio rekombinacja obserwowana jest u około 18% zakażonych [78].

Na podstawie analizy filogenetycznej regionu NS5 lub 5'UTR HCV podzielono na 6 głównych genotypów, mogących różnić się między sobą nawet 35% sekwencji. W każdym genotypie wyodrębniono subtypy (różnice genetyczne mogą wynosić do 25%), a subtypie – izolaty (10–15% zmienności). Poszczególne warianty wirusa określa się mianem *quasispecies* lub pseudotypów (do 5% zmienności); [64]. Pseudotypy HCV zostały odkryte w 1992 r. i wkrótce okazało się, że są swoistą cechą HCV, niezależną od rodzaju zakażenia (ostre czy przewlekłe), rodzaju tkanki (surowica, komórki PBMC czy tkanka wątrobowa), itp. [55].

Zmienność genetyczna HCV ma duże znaczenie w patogenezie zakażenia. Każda mutacja jest szansą na nabycie zdolności przetrwania wirusa w warunkach presji środowiska. W następstwie, selekcjonowane są warianty unikające odpowiedzi immunologicznej (tzw. *immune escape mutants*), warianty lekooporne lub warianty o zmodyfikowanej zjadliwości. Z drugiej strony, mutacje warunkujące lekooporność czy też unikanie odpowiedzi immunologicznej mogą równocześnie obniżyć poziom replikacji, zjadliwość lub zakaźność wirusa [19, 44].

### 3. Zastosowanie interferonu alfa (IFN- $\alpha$ ) i rybawiryny w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (pwzw C)

#### 3.1. Interferon alfa w leczeniu pwzw C

Interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) jest cytokiną immunomodulującą, wydzielaną przez komórki w odpowiedzi na zakażenia wirusowe. Produkcja IFN- $\alpha$  jest zależna od obecności w środowisku produktów charakterystycznych dla cząstek wirusów, takich jak np. dwuniciowy oraz jednoniciowy RNA, które łączą się z receptorami (głównie z grupy TLR – Toll-like receptor). W następstwie dochodzi do aktywacji transkrypcji genów dla IFN- $\alpha$ , jego syntezy i sekrecji. Wydzielony IFN łączy się z receptorami powierzchniowymi (Typ I receptora dla IFN- $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  oraz IFN $\omega$ ) komórki zakażonej oraz sąsiadujących komórek, prowadząc do ekspresji wielu genów efektorowych (ISG, interferon-stimulated genes), których produkty mają działanie przeciwwirusowe [23]. Działanie przeciwwirusowe IFN- $\alpha$  polega m.in. na: aktywacji 2'-5' syntetazy oligoadenylowej (2'-5'OAS), białek Mx oraz RNA-zależnej kinazy białkowej R (PKR, protein kinase R) powodujących zahamowanie replikacji patogenu, oraz immunomodulacji (ekspresji cząsteczek MHC kl. I na powierzchni komórek, aktywacji makrofagów, komórek NK oraz

cytotoksycznych limfocytów T) służącej wzmocnieniu odpowiedzi przeciwwirusowej [68].

#### 3.2. Rybawiryna w leczeniu pwzw C

Rybawiryna jest syntetycznym analogiem guanozyny stosowanym początkowo w leczeniu zakażeń syncytialnym wirusem oddechowym (RSV) u dzieci. Wkrótce po odkryciu HCV związek ten został wykorzystany w monoterapii do leczenia pwzw C, jednak bez znaczącego wpływu na poziom wirerii [18]. Rybawiryna hamuje działanie polimeraz wirusowych w warunkach *in vitro*, jednakże mechanizmy dotyczące jej działania *in vivo* są nadal słabo poznane. Sugeruje się, że związek ten może działać jak mutagen, zwiększając poziom wprowadzania mutacji przez RNA-zależną polimerazę RNA, co skutkuje wytworzeniem defektywnych wariantów wirusa, o obniżonych zdolnościach zakaźnych oraz replikacyjnych [15].

Terapia skojarzona IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną znacznie zwiększyła skuteczność leczenia pwzw C (średnio 35–40%) w porównaniu do IFN- $\alpha$  w monoterapii (16–20%), jak również zmniejszyła ryzyko nawrotu replikacji wirusa po leczeniu [10, 67]. Zastosowanie pegylowanego interferonu alfa (PEG-IFN- $\alpha$ ), posiadającego lepsze parametry farmakokinetyczne [31] skojarzonego z rybawiryną pozwala osiągnąć efekt terapeutyczny u ok. 54–56% pacjentów [26, 53].

Parametrem wyznaczającym skuteczność terapii przewlekłego zapalenia wątroby typu C jest trwała odpowiedź wirusologiczna SVR (sustained virological response), definiowana jako brak obecności HCV RNA we krwi pacjenta 6 miesięcy po zakończeniu leczenia przy użyciu testu molekularnego o czułości < 100 kopii wirusa/ml. Osiągnięcie SVR oznacza eliminację zakażenia oraz rokuje poprawę obrazu histologicznego wątroby [57]. Pacjenci nie odpowiadający na leczenie w pierwszej próbie mają mniejszą szansę na osiągnięcie SVR po kolejnym cyklu leczenia [76]. Problem osób „nieodpowiadających” jest obecnie jednym z ważniejszych wyzwań terapii pwzw C.

Ze względu na fakt, że SVR jest stosunkowo późnym parametrem skuteczności wdrożonej terapii, opracowano markery, które pozwoliłyby na wcześniejsze rokowanie co do wyniku leczenia. Udowodniono, że poziom wirerii w pierwszych tygodniach leczenia jest dobrym prognostykiem SVR. RVR (rapid virological response) jest określany brakiem materiału genetycznego wirusa we krwi pacjenta w 4 tygodniu od rozpoczęcia leczenia. RVR jest silnym prognostykiem SVR, o ile leczenie nie zostanie przedwcześnie przerwane [27, 52]. EVR (early virological response) jest definiowany jako brak wirerii bądź spadek wirerii o wartość co najmniej  $2 \log_{10}$  w 12 tygodniu leczenia. Wykazano, że u pacjentów zakażonych genotypem 1 leczonych PEG-IFN- $\alpha$

oraz rybawiryną nie spełniających kryteriów EVR, trwała odpowiedź przeciwwirusowa nie zostanie osiągnięta u 98% tej grupy [16]. Podjęcie decyzji o przerwaniu leczenia w 12 tygodniu pozwala na oszczędności oraz uniknięcie obciążającego skutkami ubocznymi nieskutecznego leczenia.

#### 4. Czynniki wpływające na skuteczność leczenia

Za brak skuteczności leczenia odpowiedzialne są m.in. czynniki osobnicze oraz czynniki wirusowe.

##### 4.1. Czynniki osobnicze

Zaawansowany wiek, płeć męska, rasa mają wpływ na skuteczność leczenia pzw C. I tak, wykazano że przedstawiciele rasy kaukaskiej lub azjatyckiej lepiej odpowiadają na leczenie, aniżeli osoby pochodzenia afrykańskiego lub latynoskiego [50]. Nadmierna masa ciała może obniżyć efekt leczenia poprzez zmniejszenie stężenia leku w organizmie oraz jego dostępności dla receptorów [43]. Gorszy efekt leczenia uzyskano również u chorych nadużywających alkoholu, osób insulinoopornych, narkomanów oraz niestosujących się do zalecanego schematu leczenia [17, 77]. Również zaawansowane postaci choroby wątroby, takie jak znaczne zwłóknienie lub marskość oraz tzw. pozawątrobowe manifestacje zakażenia, takie jak krioglobulinemia mieszana lub błoniasto-rozplamowe zapalenie kłębuszków nerkowych wiążą się z niższą skutecznością leczenia [6, 49].

Sekwencjonowanie ludzkiego genomu, wraz z badaniem jego funkcji, stworzyły nowe możliwości dla określania czynników skuteczności leczenia. Badania mające na celu identyfikację wariantów genetycznych, wiążących się z czynnikami ryzyka dla wielu chorób (GWAS, genome-wide association study) zyskują coraz większą popularność. Polegają one na poszukiwaniu alleli w genomie, które wykazują jednonukleotydowy polimorfizm (single nucleotide polymorphism, SNP) a efekt fenotypowy tego polimorfizmu statystycznie różni się w grupie kontrolnej i grupie badanej. Podjęto próby wykorzystania tego narzędzia w określeniu czynników osobniczych związanych ze skutecznością leczenia zakażeń HCV.

Wyniki tych badań dowiodły, że czynniki nawet w obrębie tej samej populacji mogą wystąpić polimorfizmy w genach efektorowych dla IFN (np. *ADAR*, *CASP5*, *ISCBP1*, *IFI44*, *PIK3CG* oraz *TAP2*), powodujące znaczne różnice w poziomie odpowiedzi na IFN [47]. Również poziom ekspresji ISG (interferon-stimulated genes) ma znaczenie w odpowiedzi na leczenie pzw C. Osoby zakażone przewlekłe wykazują wysoki poziom ISG w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej [38]. Podobnie, pacjenci zidentyfikowani jako nieodpowiadający na leczenie PEG-IFN oraz rybawiryną wykazywali

wyższy poziom ekspresji ISG w wątrobie przed jego rozpoczęciem, niż odpowiadający na leczenie. Wykazano również, że SVR może być prognozowany na podstawie stopnia ekspresji genu czynnika transkrypcyjnego STAT6 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej wyizolowanych przed leczeniem lub nawet 24 godziny od jego rozpoczęcia [88]. Dane te wskazują, że osoby niewrażliwe na leczenie mogą wykazywać zaburzoną odpowiedź na endogenny oraz podawany w trakcie leczenia IFN- $\alpha$  [13].

W genie kodującym IFN także dowiedziono istnienia polimorfizmów, których występowanie badano w kontekście odpowiedzi na leczenie. Wykazano, że mutacja punktowa 764C>G, występująca w pobliżu genu kodującego IFN- $\gamma$  była istotnie związana z SVR. Analiza dowiodła, że substytucja ta determinuje wyższą siłę wiązania czynnika transkrypcyjnego HSF1 do genu kodującego IFN- $\gamma$  [37].

Interferony  $\lambda$ -1, 2 oraz 3 (znane również jako IL-29, IL-28A oraz IL-28B) są stosunkowo niedawno odkrytą grupą cytokin o działaniu przeciwwirusowym i cechach podobnych do interferonów typu I (m.in. IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ), aczkolwiek o niższej aktywności *in vitro* [79]. Udowodniono znaczenie interferonów  $\lambda$  w kontroli zakażeń wirusowych, włączając zakażenia HIV, HBV oraz HCV [36, 54]. Wstępne badania kliniczne potwierdziły ich skuteczność w eliminacji zakażenia HCV przy niskiej toksyczności leku [62].

W 2009 roku, kilka niezależnych grup badawczych doniosło o występowaniu jednonukleotydowych polimorfizmów w pobliżu genu kodującego IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) w chromosomie 19, które korelowały z efektem leczenia PEG-IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną [30, 81, 82, 85]. Pacjenci włączeni do badania byli przedstawicielami różnych grup etnicznych (Europejczycy, Afro-Amerykanie, Australijczycy oraz Japończycy), zakażeni genotypem 1. Co najmniej 3 *loci* determinujące efekt leczenia zostały zidentyfikowane. Były to pozycje rs12979860, rs8099917 oraz rs12980275, których genotypy C/C, T/T oraz A/A odpowiednio, były związane z dużym prawdopodobieństwem eliminacji wirusa w trakcie leczenia [81, 82, 85]. Występowanie określonych rodzajów polimorfizmów w tych pozycjach u różnych populacji etnicznych może tłumaczyć obserwowaną u nich różną efektywność leczenia. Choć wszystkie zidentyfikowane warianty genetyczne w tych badaniach znajdują się w pobliżu lub obrębie genu *IL-28B*, żaden z nich nie był bezpośrednio związany z jego funkcją [5].

Po odkryciu znaczenia polimorfizmu genu *IL-28B* w odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe dla genotypu 1, pojawiły się badania dotyczące innych genotypów, w szczególności 2 oraz 3 [40, 59, 75]. Badano w nich znaczenie polimorfizmów pozycji rs12979860, rs8099917 oraz rs12980275 w osiągnięciu SVR. Wykazano, że genotyp C/C w pozycji rs12979860 wiąże się z wysokim

prawdopodobieństwem uzyskania SVR (84,7%) u pacjentów zakażonych genotypem 2 lub 3 leczonych PEG-IFN- $\alpha$  i rybawiryną, podczas gdy dla polimorfizmów pozycji rs8099917 oraz rs12980275 nie wykazano żadnej korelacji [75]. Inne badanie wykazało związek między polimorfizmem rs8099917 a SVR u zakażonych genotypem 2b (ale nie 2a) leczonych PEG IFN oraz rybawiryną [40].

Powyższe dane wskazują, że zmienność genetyczna genu *IL-28B* jest jak dotychczas najsilniejszym zidentyfikowanym czynnikiem determinującym kontrolę zakażenia HCV [71]. Prawdopodobnym jest, że zostanie on wykorzystany w praktyce klinicznej w celu indywidualizacji leczenia. Na przykład, osoby zakażone genotypem 1 niosące allel ryzyka nieskutecznego leczenia będą miały bardzo małą szansę na uzyskanie odpowiedzi wirusologicznej po terapii standardowej, stąd powinny w pierwszej kolejności mieć dostęp do nowych strategii leczenia.

## 4.2. Czynniki wirusowe

Ważną rolę w kształtowaniu się odpowiedzi na leczenie przypisuje się czynnikom wirusowym. I tak, genotyp HCV jest silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym skuteczności leczenia, zarówno prowadzonego w monoterapii, jak i w skojarzeniu z rybawiryną. Wykazano, że zakażenie genotypem 1 lub 4 wiąże się z gorszą skutecznością terapii, aniżeli zakażenie genotypem 2 i 3 [51, 56]. Dlatego też genotyp HCV jest głównym parametrem brany pod uwagę przy ustalaniu czasu trwania leczenia. Standardowo, w przypadku zakażenia genotypem 1 lub 4 leczenie trwa 48 tygodni. W przypadku zakażenia genotypem 2 lub 3–24 tygodnie.

Udowodniono, że niektóre regiony genomu HCV mogą determinować wrażliwość wirusa na IFN. Region HVR1 HCV (hypervariable region 1) jest zlokalizowany na końcu 5' genu kodującego białko otoczki E2. Białko E2 zawiera antygeny dla przeciwciał neutralizujących, jak również dla cytotoksycznych limfocytów T (CTL); [12, 32, 39]. Wysoka zmienność genetyczna HVR1 wpływa na dużą zmienność antygenową wirusa, co sprzyja unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza a tym samym przetrwaniu wirusa oraz niewrażliwości na leczenie [19]. U dużego odsetka pacjentów, którzy nie osiągnęli SVR, zastosowanie leków oraz ich odstawienie powodowało zmiany jakościowe w kompozycji *quasispecies* w obrębie HVR1 [69, 80].

Region PePHD (PKR/eIF2 $\alpha$  phosphorylation homology domain) jest również zlokalizowany w obrębie białka E2. Zawiera sekwencję homologiczną do sekwencji omylenia fosforylacji czynnika translacyjnego eIF-2 $\alpha$  PKR [45]. Wykazano, że przyłączanie PePHD do PKR hamuje jej aktywność fosforylacyjną *in vitro*, a w efekcie powoduje niewrażliwość na IFN- $\alpha$ . Zjawisko to dotyczy

jednak tylko subtypów 1a i 1b wirusa, prawdopodobnie z powodu największej homologii sekwencji aminokwasowej PePHD u tych subtypów do sekwencji domeny wiążącej eIF-2 $\alpha$  białka PKR. Uważa się, że zdolność hamowania aktywności PKR przez genotyp 1 HCV przyczynia się do jego wysokiej lekooporności [84]. Mimo znaczenia PePHD w unikaniu odpowiedzi przeciwwirusowej, związek między zmiennością sekwencji kodującej PePHD a opornością na leczenie w przypadku badanych genotypów (1, 2 i 3) HCV pozostaje niejasny [29, 33].

W pobliżu karboksylowego końca białka NS5a znajduje się region złożony z 40 aminokwasów uznawany za region determinujący wrażliwość HCV na IFN- $\alpha$  (ISDR, interferon sensitivity determining region). W badaniu grupy japońskiej mutacje w obrębie ISDR korelowały z wynikiem leczenia dla genotypu 1b. Wykrycie co najmniej 4 mutacji w obrębie ISDR w porównaniu z sekwencją referencyjną HCV wiązało się ze skutecznym leczeniem [20, 65]. Analogiczną zależność wykryto dla genotypów 2a, ale nie 2b i 3a [8, 63]. Molekularną rolę NS5a odkrył Gale i wsp. Białko to pełni funkcję inhibitora PKR inaktywując enzym *in vitro* a tym samym hamując działanie IFN- $\alpha$ . Co więcej, hamowanie aktywności PKR można znieść poprzez wprowadzenie mutacji w obrębie ISDR [28]. Są również badania dowodzące, że NS5a może indukować syntezę prozapalnej IL-8, działającej antagonistycznie do IFN- $\alpha$  [70]. U pacjentów zakażonych przewlekłe wykazano wyższe stężenie tej chemokiny w surowicy, niż u zdrowych kontroli [70]. Podobnie, wyższy poziom IL-8 w surowicy był notowany u pacjentów nieodpowiadających na leczenie zakażonych genotypem 1, niż u pacjentów wyleczonych [58].

Najnowsze badania wskazują, że białko NS5a może inaktywować 2'-5'OAS. W efekcie, 2'-5'OAS nie może pośredniczyć w trawieniu wirusowego RNA przez RNazę L, co wpływa na kontynuację translacji białek (również wirusowych) w komórce. Różnice w częstości występowania dwunukleotydów UU oraz UA (rozpoznawanych przez RNazę L jako miejsca cięcia) między genotypami 1 a 2 i 3 HCV mogą tłumaczyć ich różną wrażliwość na IFN- $\alpha$  [34].

Niedawno, w obrębie genu *NS5a* zidentyfikowano region V3 (variable region 3), wykazujący znaczną zmienność mutacyjną [11]. Poziom zmienności tego regionu u subtypów 1a/1b miał wpływ na skuteczność leczenia IFN- $\alpha$  (szczepy odporne przed leczeniem wykazywały niską a wrażliwe – wysoką zmienność); [87].

NS3/4a jest wirusowym białkiem niestrukturalnym posiadającym aktywność proteazy. Fooy i wsp. wykazali, że NS3/4a interferuje ze szlakiem aktywacji syntezy IFN *in vitro* blokując IRF-3, kluczowy czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję IFN. Aktywność IRF-3 była przywrócona poprzez dodatek inhibitora proteazy serynowej wskazując, że wirusowa proteaza trawi



aktywne domeny IRF-3 [25]. Analiza sekwencji IRF-3 dla subtypu 1a w kontekście skuteczności leczenia nie wykazała korelacji [74].

Przedstawione obserwacje mogą wskazywać na znaczenie polimorfizmu regionów HVR1 E2 oraz NS5a we wrażliwości na IFN- $\alpha$  a zatem skuteczności leczenia. Poziom zmienności innych badanych regionów wirusowych (5'UTR, HVR2, gen kodujący białko rdzenia C) nie był związany ze skutecznością leczenia [4, 35].

Choć udowodniono, że liczne czynniki (osobnicze i wirusowe) są odpowiedzialne za skuteczność leczenia u chorych zakażonych genotypem 1, ich wpływ najczęściej nie był oceniany u chorych zakażonych innymi genotypami. Niewiele wiadomo na temat mechanizmów odpowiadających za wysoką lekowrażliwość genotypów 2 i 3, głównie ze względu na ich szybką eliminację w trakcie leczenia. Niemniej jednak, wykazano istnienie lekoopornych wariantów genotypu 2a [3].

Uważa się, że populacja HCV przed leczeniem zawiera lekooporne warianty genetyczne, które następnie ulegają selekcji w warunkach presji narzuconej przez leczenie. Przemawiają za tym następujące obserwacje:

- 1) w pierwszych godzinach od zastosowania leków dokonuje się gwałtowny spadek poziomu replikacji HCV [89].
- 2) terapia interferonem jest w dużej mierze terapią immunomodulującą potęgującą odpowiedź przeciwwirusową, która wywiera presję selekcyjną na niektóre regiony genomu wirusa, białka oraz epitopy. Oznacza to, że wirus prawdopodobnie unika odpowiedzi immunologicznej stymulowanej przez interferon.
- 3) u leczonych, u których nie zanotowano trwałej odpowiedzi wirusologicznej, genom wirusa zawierał liczne mutacje, szczególnie w regionach determinujących wrażliwość na leczenie [66].

## 5. Znaczenie kliniczne analizy regionu E2 HVR1 HCV

Ze względu na negatywny wynik leczenia u ok. 50% pacjentów, podjęto próby określenia bardzo wczesnych czynników prognostycznych efektywności leczenia przeciwwirusowego, pozwalających wytypować osoby z największym ryzykiem nieskutecznej terapii. Mogą to być czynniki o charakterze osobniczym (np. wrażliwość na IFN- $\alpha$ ) lub wirusowym (np. genotyp, poziom wirerii, zjawisko *quasispecies*).

Identyfikacja wczesnego markera z wysokim prawdopodobieństwem przewidującego SVR miałoby dużą wartość kliniczną. Dysponowanie takim narzędziem umożliwiłoby uniknięcie skutków ubocznych oraz kosztów leczenia u pacjentów, którzy na nie nie odpowiedzą oraz dodatkowo motywowałoby pacjentów z pozytywną prognozą do ukończenia leczenia.

Postępy w biologii molekularnej umożliwiły dokładną analizę *quasispecies*. Wśród potencjalnych markerów prognostycznych dużą uwagę zwraca się na zmienność genetyczną regionu HVR1 E2. Uważa się, że analiza molekularna tego regionu może mieć zastosowanie prognostyczne, ponieważ:

- 1) region ten jest wysoko zmienny, w dużej mierze z powodu tolerancji na substytucje; jego analiza pozwala na wykrycie licznych wariantów genetycznych;
- 2) region ten koduje epitopy dla przeciwciał neutralizujących oraz dla komórek cytotoksycznych, podlegając silnej presji selekcyjnej układu immunologicznego [14, 32];
- 3) uważa się, że w czasie zakażenia stymulowana jest silna, lecz nieskuteczna odpowiedź humoralna skierowana przeciwko epitopom kodowanym przez E2, co skutkuje brakiem kontroli wirusa [72].

Jak dotąd, analizę zmienności HVR1 wykorzystano w celu rokowania przebiegu zakażenia HCV. Wykazano, że ewolucja genetyczna tego regionu w fazie ostrej zakażenia prowadzi zwykle do rozwoju zakażenia przewlekłego [41, 83]. Zjawisko to jest związane z pojawianiem się nowych wariantów wirusa niewrażliwych na działanie przeciwciał neutralizujących oraz cytotoksycznych limfocytów T [21]. Zgodnie z tą hipotezą, stabilność genetyczna *quasispecies* w regionie HVR1 zdaje się być warunkiem eliminacji wirusa w fazie ostrej [72]. Zaobserwowano również, że duże zróżnicowanie składu *quasispecies* było obecne u pacjentów zakażonych przewlekłe lecz bezobjawowo, wykazujących normalne wartości aktywności ALAT oraz znikome uszkodzenie wątroby [9].

## 6. Zmienność E2 HVR1 a prognozowanie skuteczności leczenia

Nieskuteczne leczenie związane jest z pojawianiem się zmian w populacji *quasispecies* [69, 80]. Zmiany te mogą mieć charakter ewolucji genetycznej (pojawianie się zupełnie nowych wariantów), bądź różnic w złożoności (liczba wariantów genetycznych określonego regionu). Wydaje się, że zmiany o charakterze ewolucji są konsekwencją niemożności eliminacji wirusa przez układ immunologiczny.

Szczególne znaczenie dla skuteczności leczenia mają zmiany mutacyjne występujące w genach wirusa, których produkty białkowe determinują wrażliwość na IFN lub uczestniczą w unikaniu odpowiedzi immunologicznej [23]. Wykazano, że zmiany o charakterze ewolucji w obrębie sekwencji HVR1 dotyczą ok. 70% pacjentów leczonych IFN- $\alpha$ , zakażonych genotypami 1a, 1b, 2a, 2c, 3a oraz 4a [66]. Podobny efekt wywiera terapia skojarzona IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną [7]. Brak zmian genetycznych



w obrębie regionu HVR1 wykazuje populacja wirusa u co czwartego pacjenta, co oznacza, że warianty obecne u tych chorych przed leczeniem przechodzą selekcję pozytywną w czasie leczenia [66]. Pacjenci wykazujący niską złożoność genetyczną regionu HVR1 HCV przed rozpoczęciem terapii IFN- $\alpha$  zwykle należą do grupy odpowiadających na leczenie [66]. Na tej podstawie można wnioskować, że złożoność populacji HCV w regionie HVR1 E2 jest niezależnym prognostykiem skuteczności leczenia [66].

Wykazano, że wśród pacjentów leczonych IFN- $\alpha$  lub PEG-IFN- $\alpha$  oraz rybawiryną, złożoność populacji wirusa przed leczeniem była niższa u osiągających wczesną (12 tygodni od rozpoczęcia leczenia), ale nie trwałą odpowiedź wirusologiczną [1, 2]. W pracy Torres-Puente i wsp., gdzie analizie poddanych zostało 67 pacjentów stwierdzono, że u osób nieodpowiadających na leczenie różnorodność genetyczna regionu HVR1 E2 była wyższa, niż u pacjentów odpowiadających. Co ciekawe, różnorodność składu aminokwasowego tego regionu nie była jednak znamiennej wyższa w grupie pacjentów nieodpowiadających [86]. Analogiczną zależność między wysoką złożonością początkowego składu *quasispecies* przed leczeniem a negatywnym wynikiem terapii zaobserwowano u pacjentów po wcześniejszym nieudanym kursie leczenia oraz wykazujących zaawansowane zwłóknienie wątroby [61].

W grupie pacjentów zakażonych różnymi genotypami HCV, leczonych IFN- $\alpha$ , wysoka złożoność regionu HVR1 nie korelowała z osiągnięciem trwałej odpowiedzi wirusologicznej wskazując, że czynniki osobnicze a nie wirusowe mają znaczenie dla wyniku leczenia [22]. Inne badania nie wykazały żadnej korelacji między złożonością populacji HCV a wynikiem leczenia [48, 73].

Nowsze analizy, przeprowadzone na dużej grupie pacjentów, potwierdziły korelację między niską złożonością populacji przed i we wczesnej fazie terapii a pozytywnym skutkiem leczenia [52]. Niższa złożoność *quasispecies* może świadczyć o skutecznej kontroli wirusa przez układ immunologiczny przed i w trakcie leczenia.

Jak można zauważyć, dostępne w literaturze badania podają niejednokrotnie sprzeczne wyniki analiz zmienności wariantów molekularnych HCV w kontekście efektu leczenia. Rozbieżności te można wytłumaczyć:

1. różną liczbą pacjentów badanych w poszczególnych próbach (często poniżej 10) oraz odmiennościami etnicznymi grup badanych;
2. różnicami genotypów HCV w badanych grupach;
3. zastosowaniem różnych technik badawczych i metod oceny *quasispecies*;
4. artefaktami będącymi skutkiem zastosowania polimeraz o niskiej wierności kopiowania materiału genetycznego oraz zbyt wysokiej liczby cykli amplifikacji, która zwiększa ryzyko powielania „fałszywych” mutacji;

5. w przypadku analizy dokonanej za pomocą klonowania oraz sekwencjonowania, wiarygodne wyniki można otrzymać tylko wówczas, gdy przeanalizowana jest duża liczba klonów pochodzących z populacji wirusa (co najmniej 10, optymalnie powyżej 20), co da odzwierciedlenie jej rzeczywistego składu [46].

## 7. Podsumowanie

Wysoka zmienność genetyczna HCV stwarza warunki unikania odpowiedzi immunologicznej a w następstwie sprzyja rozwojowi przewlekłego zakażenia. Jest także odpowiedzialna za występowanie zjawiska lekooporności, które jest przyczyną nieskutecznego leczenia u znacznego odsetka pacjentów. Jak dotąd, trudności w zdefiniowaniu markerów molekularnych nieskutecznej terapii uniemożliwiają opracowanie testów diagnostycznych, które pozwoliłyby na stwierdzenie lekooporności (tak jak ma to miejsce w przypadku oznaczeń na lekooporność HIV). Aktualny stan wiedzy o czynnikach wirusowych wpływających na skuteczność leczenia (genotyp, wiremia przed leczeniem), pozwalających na dobór odpowiedniego schematu terapeutycznego, jest niewystarczający. Dlatego badania wyjaśniające związek między złożonością populacji *quasispecies* a efektem leczenia jako potencjalnego parametru skuteczności terapii są intensywnie prowadzone.

## Piśmiennictwo

1. Abbate I., M.R. Capobianchi i wsp.: Heterogeneity of HVR-1 quasispecies is predictive of early but not sustained virological response in genotype 1b-infected patients undergoing combined treatment with PEG- or STD-IFN plus RBV. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **17**, 162–165 (2003) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
2. Abbate I., M.R. Capobianchi i wsp.: HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated or standard-interferon and ribavirin. *J. Hepatol.* **40**, 831–836 (2004) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
3. Akuta N., H. Kumada i wsp.: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 2a high viral load and virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*, **52**, 301–309 (2009) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
4. Araujo F.M., Sonoda I.V., Rodrigues N.B., Teixeira R., Redondo R.A., Oliveira G. C.: Genetic variability in the 5' UTR and NS5A regions of hepatitis C virus RNA isolated from non-responding and responding patients with chronic HCV genotype 1 infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **103**, 611–614 (2008)
5. Asselah T., Bieche I., Sabbagh A., Bedossa P., Moreau R., Valla D., Vidaud M., Marcellin P.: Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut*, **58**, 846–858 (2009)
6. Asselah T., Estrabaud E., Bieche I., Lapalus M., De Muynck S., Vidaud M., Saadoun D., Soumelis V., Marcellin P.: Hepatitis C:

- viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int.* **9**, 1259–1269 (2010)
7. Aurora R., Donlin M.J., Cannon N.A., Tavis J.E.: Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 225–236 (2009)
  8. Bagaglio S., Bruno R., Lodrini S., De Mitri M. S., Andreone P., Loggi E., Galli L., Lazzarin A., Morsica G.: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) in clinical strains of HIV positive and HIV negative patients chronically infected with HCV genotype 3a. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **17**, 153–161 (2003)
  9. Brambilla S., E.M. Silini i wsp.: Dynamics of hypervariable region 1 variation in hepatitis C virus infection and correlation with clinical and virological features of liver disease. *Hepatology*, **27**, 1678–1686 (1998) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
  10. Brillanti S., Garson J., Foli M., Whitby K., Deaville R., Masci C., Miglioli M., Barbara L.: A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **107**, 812–817 (1994)
  11. Castelain S., Khorsi H., Roussel J., Francois C., Jaillon O., Capron D., Penin F., Wychowski C., Meurs E., Duverlie G.: Variability of the nonstructural 5A protein of hepatitis C virus type 3a isolates and relation to interferon sensitivity. *J. Infect. Dis.* **185**, 573–583 (2002)
  12. Chambers T.J., Fan X., Droll D.A., Hembrador E., Slater T., Nickells M.W., Dustin L.B., Di Bisceglie A.M.: Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **79**, 3071–3083 (2005)
  13. Chen L., Borozan I., Feld J., Sun J., Tannis L.L., Coltescu C., Heathcote J., Edwards A. M., McGilvray I. D.: Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*, **128**, 1437–1444 (2005)
  14. Cristina J., del Pilar Moreno M., Moratorio G.: Hepatitis C virus genetic variability in patients undergoing antiviral therapy. *Virus Res.* **127**, 185–194 (2007)
  15. Crotty S., Maag D., Arnold J.J., Zhong W., Lau J.Y., Hong Z., Andino R., Cameron C.E.: The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* **6**, 1375–1379 (2000)
  16. Davis G.L.: Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology*, **36**, 145–151 (2002)
  17. Degos F.: Hepatitis C and alcohol. *J. Hepatol.* **31**, 113–118 (2002)
  18. Di Bisceglie A.M., Conjeevaram H.S., Fried M.W., Sallie R., Park Y., Yurdaydin C., Swain M., Kleiner D.E., Mahaney K., Hoofnagle J.H.: Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **123**, 897–903 (1995)
  19. Domingo E., Gomez J.: Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res.* **127**, 131–150 (2007)
  20. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C., Izumi N., Marumo F., Sato C.: Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* **96**, 224–230 (1995)
  21. Farci P., H.J. Alter i wsp.: The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, **288**, 339–344 (2000) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
  22. Farci P., R.H. Purcell i wsp.: Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3081–3086 (2002) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
  23. Feld J.J., Hoofnagle J.H.: Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, **436**, 967–972 (2005)
  24. Figlerowicz M., Alejska M., Kurzyńska-Kokorniak A., Figlerowicz M.: Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med. Res. Rev.* **23**, 488–518 (2003)
  25. Foy E., Li K., Wang C., Sumpter R., Jr., Ikeda M., Lemon S.M., Gale M. Jr.: Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, **300**, 1145–1148 (2003)
  26. Fried M.W., J. Yu i wsp.: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982 (2002) (praca stanowi dzieło 14 autorów)
  27. Fried M.W., D.R. Nelson i wsp.: Improved outcomes in patients with hepatitis C with difficult-to-treat characteristics: randomized study of higher doses of peginterferon alpha-2a and ribavirin. *Hepatology*, **48**, 1033–1043 (2008) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
  28. Gale M.J. Jr, Korth M.J., Tang N.M., Tan S.L., Hopkins D.A., Dever T.E., Polyak S.J., Gretch D.R., Katze M.G.: Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, **230**, 217–227 (1997)
  29. Gaudy C., Lambele M., Moreau A., Veillon P., Lunel F., Goudeau A.: Mutations within the hepatitis C virus genotype 1b E2-PePHD domain do not correlate with treatment outcome. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 750–754 (2005)
  30. Ge D., D.B. Goldstein i wsp.: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, **461**, 399–401 (2009) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
  31. Glue P., Fang J.W., Rouzier-Panis R., Raffanel C., Sabo R., Gupta S.K., Salfi M., Jacobs S.: Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 556–567 (2000)
  32. Guglietta S., P. Del Porto i wsp.: Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2627–2637 (2005) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
  33. Gupta R., Subramani M., Khaja M.N., Madhavi C., Roy S., Habibullah C.M., Das S.: Analysis of mutations within the 5' untranslated region, interferon sensitivity region, and PePHD region as a function of response to interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients in India. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 709–715 (2006)
  34. Han J.Q., Barton D.J.: Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA*, **8**, 512–525 (2002)
  35. Hofmann W.P., Sarrazin C., Kronenberger B., Schonberger B., Bruch K., Zeuzem S.: Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* **187**, 982–987 (2003)
  36. Hou W., Wang X., Ye L., Zhou L., Yang Z. Q., Riedel E., Ho W.Z.: Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J. Virol.* **83**, 3834–3842 (2009)
  37. Huang Y., Liang T.J. i wsp.: A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 985–990 (2007) (praca stanowi dzieło 15 autorów)
  38. Ji X., Cheung R., Cooper S., Li Q., Greenberg H. B., He X. S.: Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*, **37**, 610–621 (2003)

39. Kato N., Sekiya H., Ootsuyama Y., Nakazawa T., Hijikata M., Ohkoshi S., Shimotohno K.: Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J. Virol.* **67**, 3923–3930 (1993)
40. Kawaoka T., K. Chayama i wsp.: Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2010.07.032 (2010) (wersja elektroniczna czasopisma) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
41. Koizumi K., Enomoto N., Kurosaki M., Murakami T., Izumi N., Marumo F., Sato C.: Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology*, **22**, 30–35 (1995)
42. Kurbanov F., Tanaka Y., Avazova D., Khan A., Sugauchi F., Kan N., Kurbanova-Khudayberganova D., Khikmatullaeva A., Musabaev E., Mizokami M.: Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1\_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. *Hepatol. Res.* **38**, 457–464 (2008)
43. Lam N.P., Pitrak D., Sperlakis R., Lau A.H., Wiley T.E., Layden T.J.: Effect of obesity on pharmacokinetics and biologic effect of interferon-alpha in hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* **42**, 178–185 (1997)
44. Lauring A.S., Andino R.: Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* **6**, 1001005 (2010) (wersja elektroniczna czasopisma)
45. Le Guillou-Guillemette H., Vallet S., Gaudy-Graffin C., Payan C., Pivert A., Goudeau A., Lunel-Fabiani E.: Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**, 2416–2426 (2007)
46. Lee C.M., Hung C.H., Lu S.N., Changchien C.S.: Hepatitis C virus genotypes: clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med. J.* **31**, 16–25 (2008)
47. Lin E., Hwang Y., Wang S.C., Gu Z.J., Chen E.Y.: An artificial neural network approach to the drug efficacy of interferon treatments. *Pharmacogenomics*, **7**, 1017–1024 (2006)
48. López-Labrador F.X., Ampurdanès S., Giménez-Barcons M., Guilera M., Costa J., Jiménez de Anta M.T., Sánchez-Tapias J.M., Rodés J., Sáiz J.C.: Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology*, **29**, 897–903 (1999)
49. Lunel F., Cacoub P.: Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **31**, 210–216 (1999)
50. McHutchison J.G., Poynard T., Pianko S., Gordon S.C., Reid A.E., Dienstag J., Morgan T., Yao R., Albrecht J.: The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology*, **119**, 1317–1323 (2000)
51. Mahaney K., Tedeschi V., Maertens G., Di Bisceglie A.M., Vergalla J., Hoofnagle J.H., Saille R.: Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology*, **20**, 1405–1411 (1994)
52. Mangia A., Andriulli A.: Tailoring the length of antiviral treatment for hepatitis C. *Gut*, **59**, 1–5 (2010)
53. Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., Rustgi V.K., Shiffman M., Reindollar R., Goodman Z.D., Koury K., Ling M., Albrecht J.K.: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, **358**, 958–965 (2001)
54. Marcello T, Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., Rice C. M.: Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*, **131**, 1887–1898 (2006)
55. Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gómez J.: Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**, 3225–3229 (1992)
56. Martinot-Peignoux M., P. Marcellin i wsp.: Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **29**, 214–223 (1998) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
57. Maylin S., P. Marcellin i wsp.: Sustained virological response is associated with clearance of hepatitis C virus RNA and a decrease in hepatitis C virus antibody. *Liver Int.* **29**, 511–517 (2009) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
58. Mihm U., Herrmann E., Sarrazin U., von Wagner M., Kronenberger B., Zeuzem S., Sarrazin C.: Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **40**, 845–852 (2004)
59. Montes-Cano M.A., Garcia-Lozano J.R., Abad-Molina C., Romero-Gomez M., Barroso N., Aguilar-Reina J., Nunez-Roldan A., Gonzalez-Escribano M.F.: Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*, **52**, 33–37 (2010)
60. Moreno P., Alvarez M., López L., Moratorio G., Casane D., Castells M., Castro S., Cristina J., Colina R.: Evidence of recombination in hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virol. J.* **6**, 203 (2009) (wersja elektroniczna czasopisma)
61. Morishima C., Lindsay K.L.: Hepatitis C virus-specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C. *J. Infect. Dis.* **193**, 931–940 (2006)
62. Muir, A. J., Lawitz, E. i wsp.: Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **52**, 822–832 (2010) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
63. Murakami T., Enomoto N., Kurosaki M., Izumi N., Marumo F., Sato C.: Mutations in nonstructural protein 5A gene and response to interferon in hepatitis C virus genotype 2 infection. *Hepatology*, **30**, 1045–1053 (1999)
64. Myrmet H., Ulvestad E., Åsjø B.: The hepatitis C virus enigma. *APMIS*, **117**, 427–439 (2009)
65. Pawlitsky J.M., Germanidis G., Neumann A.U., Pellerin M., Frainais P.O., Dhumeaux D.: Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* **72**, 2795–2805 (1998)
66. Pawlitsky J.M., Germanidis G., Frainais P.O., Bouvier M., Soulier A., Pellerin M., Dhumeaux D.: Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J. Virol.* **73**, 6490–6499 (1999)
67. Pawlitsky J.M., Dahari H., Neumann A.U., Hezode C., Germanidis G., Lonjon I., Castera L., Dhumeaux D.: Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **126**, 703–714 (2004)
68. Peters M.: Action of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology*, **23**, 909–916 (1996)
69. Polyak S.J., D.R. Gretch i wsp.: Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J. Virol.* **72**, 4288–4296 (1998) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
70. Polyak S.J., Khabar K.S., Paschal D.M., Ezelle H.J., Duverlie G., Barber G.N., Levy D.E., Mukaida N., Gretch D.R.: Hepatitis C



- virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* **75**, 6095–6106 (2001)
71. Rauch A., P.Y. Bochud i wsp.: Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*, **138**, 1338–1345 (2010) (praca stanowi dzieło 26 autorów)
  72. Ray S.C., Wang Y.M., Laeyendecker O., Ticehurst J.R., Villano S.A., Thomas D.L.: Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J. Virol.* **73**, 2938–2946 (1999)
  73. Sandres K., Dubois M., Pasquier C., Payen J.L., Alric L., Duffaut M., Vinel J.P., Pascal J.P., Puel J., Izopet J.: Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J. Virol.* **74**, 661–668 (2000)
  74. Sarrazin C., Mihm U., Herrmann E., Welsch C., Albrecht M., Sarrazin U., Traver S., Lengauer T., Zeuzem S.: Clinical significance of in vitro replication-enhancing mutations of the hepatitis C virus (HCV) replicon in patients with chronic HCV infection. *J. Infect. Dis.* **192**, 1710–1719 (2005)
  75. Sarrazin C., Susser S., Doehring A., Lange C.M., Müller T., Schlecker C., Herrmann E., Lötsch J., Berg T.: Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J. Hepatol.* doi:10.1016/j.jhep.2010.07.041 (2010) (wersja elektroniczna czasopisma)
  76. Schalm S.W., Brouwer J.T., Bekkering F.C., van Rossum T.G.: New treatment strategies in non-responder patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **31**, 184–188 (1999)
  77. Schiff E.R.: The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am. J. Med.* **107**, 95–99 (1999)
  78. Sentandreu V., Jiménez-Hernández N., Torres-Puente M., Bracho M.A., Valero A., Gosalbes M.J., Ortega E., Moya A., González-Candelas F.: Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS One*, **3**, 3239 (2008) (wersja elektroniczna czasopisma)
  79. Sheppard P., K.M. Klucher i wsp.: IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* **1**, 63–68 (2003) (praca stanowi dzieło 26 autorów)
  80. Shindo M., Hamada K., Koya S., Arai K., Sokawa Y., Okuno T.: The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology*, **24**, 1018–1023 (1996)
  81. Suppiah V., J. George i wsp.: IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* **41**, 1100–1104 (2009) (praca stanowi dzieło 19 autorów)
  82. Tanaka Y., M. Mizokami i wsp.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* **41**, 1105–1109 (2009) (praca stanowi dzieło 29 autorów)
  83. Tanoguchi S., Okamoto H., Sakamoto M., Kojami M., Truda F., Tanaka T., Munekata E., Mochmore E.E., Peterson D.A., Mishiro S.: A structurally flexible and antigenetically variable N-terminal domain of hepatitis C virus E2/NS1 protein: Implication for an escape from antibody. *Virology*, **195**, 297–301 (1993)
  84. Taylor D.R., Shi S.T., Romano P.R., Barber G.N., Lai M.M.: Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, **285**, 107–110 (1999)
  85. Thomas D.L., M. Carrington i wsp.: Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, **461**, 798–801 (2009) (praca stanowi dzieło 19 autorów)
  86. Torres-Puente M., F. González-Candelas i wsp.: Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J. Viral. Hepat.* **15**, 188–199 (2008) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
  87. Veillon P., Payan C., Le Guillou-Guillemette H., Gaudy C., Lunel F.: Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**, 1195–1203 (2007)
  88. Younossi Z.M., S.Y. Chang i wsp.: Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin. *Hepatology*, **49**, 763–774 (2009) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
  89. Zeuzem S., Schmidt J.M., Lee J.H., Ruster B., Roth W.K.: Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover *in vivo*. *Hepatology*, **23**, 366–371 (1996)
- Praca została sfinansowana z grantu MNiSW nr NN 401337433 oraz Projektu Młodego Badacza nr 1M24/WB1/10.





## UDZIAŁ RECEPTORÓW TLR ROZPOZNAJĄCYCH WZORCE MOLEKULARNE ORGANIZMÓW PATOGENNYCH W MODULOWANIU AKTYWNOŚCI REGULATORYWYCH LIMFOCYTÓW T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>

Monika Anna Grygorowicz<sup>1</sup>, Ewa Kozłowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 00-096 Warszawa

Wpłynęło w maju 2010 r.

1. Wstęp. 2. Regulatorowe limfocyty T. 2.1. Charakterystyka fenotypowa. 2.2. Aktywacja. 2.3. Mechanizmy supresji. 2.4. Regulacja aktywności Treg. 3. Receptory TLR. 3.1. Odkrycie receptorów TLR. 3.2. Szlaki przekazywania sygnału. 3.3. Rola TLR w odporności wrodzonej i nabytej. 4. Regulacja aktywności limfocytów regulatorowych przez receptory TLR. 4.1. Wpływ egzogennych ligandów lipidowych. 4.1.1. TLR2. 4.1.2. TLR4. 4.2. Wpływ egzogennych ligandów białkowych. 4.2.1. TLR5. 4.2.2. TLR10. 4.3. Wpływ egzogennych kwasów nukleinowych. 4.3.1. TLR8. 4.3.2. TLR9. 4.4. Wpływ ligandów endogennych. 5. Podsumowanie

### Involvement of receptors recognizing pathogen-associated molecular patterns – TLRs in modulation of regulatory T cell CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> activity

**Abstract:** Immune response is controlled by a complex system of direct cell-to-cell contact and interactions with secreted factors known as cytokines. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells are the best known population of cells with suppressive functions and act to control the immune responses. The Toll-like receptor (TLR) family is capable of recognizing many different microbes by detecting a variety of conserved pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Each class of microbe and ligand is recognized by a different type of TLR to influence the character and course of the developing immune response.

TLRs are expressed on the surface of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells (Treg). Triggering of TLR2, TLR8 and TLR9 abrogates Treg suppressive activity. Flagellin, a ligand of TLR 5 alternates Treg activity depending on the activation status of the immune system in a local environment. Without the presence of inflammation, activation of TLR 5 with flagellin, present also in commensal bacteria, aides the development of tolerance, whereas during inflammation it leads to the suppression of immunity. However, TLR7 triggering increases suppressive functions of Tregs both in vitro and in vivo. While the impact of the ligand for TLR4 – lipopolysaccharide (LPS) – on Tregs is controversial, further experiments are needed to elucidate this effect. This is crucial because of the common appearance of LPS in both commensal and pathogenic microorganisms. Similarly, the impact of TLR10 triggering on Treg activation requires further studies.

1. Introduction. 2. Regulatory T cells. 2.1. Phenotypic characteristics. 2.2. Activation. 2.3. Mechanisms of suppression. 2.4. Regulation of Treg activity. 3. TLR receptors. 3.1. Discovery of TLR. 3.2. Signaling. 3.3. Role of TLR in innate and adaptive immune responses. 4. Regulation of Treg activity by TLR. 4.1. Role of exogenous lipid ligands. 4.1.1. TLR2. 4.1.2. TLR4. 4.2. Role of exogenous protein ligands. 4.2.1. TLR5. 4.2.2. TLR10. 4.3. Role of exogenous nucleic acids ligands. 4.3.1. TLR7. 4.3.2. TLR8. 4.3.3. TLR9. 4.4. Role of endogenous ligands. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** regulatorowe limfocyty T, Treg, receptory TLR, PRR, wzorce molekularne patogenów  
**Key words:** regulatory lymphocytes T, TLR receptors, PRR, pathogen associated molecular patterns

### 1. Wstęp

Układ odpornościowy ssaków chroni organizm przed patogenami, takimi jak wirusy, bakterie i pasożyty. Posiada przy tym zdolność do zahamowania nadmiernej odpowiedzi immunologicznej zanim spowoduje ona uszkodzenia tkanek własnego organizmu. Wykazuje tolerancję na antygeny własne oraz antygeny mikroorganizmów komensalnych np. naturalnej flory przewodu pokarmowego. Nadmierna supresja odpowiedzi immunologicznej może zwiększać wrażliwość na infekcje mikroorganizmami i ułatwiać rozwój chorób nowotworowych, niewystarczająca może być przyczyną chorób autoimmunizacyjnych i alergii. Przebieg reakcji immunologicznych jest kontrolowany przez złożony

układ oddziaływań, zarówno w drodze bezpośredniego kontaktu komórek jak i za pośrednictwem cytokin. W utrzymaniu tolerancji zaangażowanych jest wiele różnych komórek układu odpornościowego: regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, limfocyty T $\gamma\delta$ , limfocyty T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> oraz limfocyty NKT. Jak dotąd najlepiej poznano regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Treg). Wśród regulatorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> można wyróżnić powstające w grasicy naturalne regulatorowe limfocyty T (nTreg) oraz powstające w obwodowych narządach limfatycznych z naiwnych limfocytów T pod wpływem aktywacji antygenowej – indukowane regulatorowe limfocyty T (iTreg). Jak dotąd nie odkryto specyficznych markerów umożliwiających odróżnienie, w obwodowych narządach limfatycznych,

\* Autor korespondencyjny: Zakład Immunologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. Miecznikowa 1, 00-096 Warszawa; ekozłowska@biol.uw.edu.pl

limfocytów nTreg od iTreg. Do badań Treg *in vitro* najczęściej używane są izolowane z krwi lub obwodowych narządów limfatycznych limfocyty T CD4+CD25+, ponieważ czynnik transkrypcyjny FoxP3 nie może być wyznakowany przyżyciowo. Większość badań których wyniki cytowane są w tym opracowaniu uzyskano pracując na limfocytach T CD4+CD25+ z obwodowych narządów limfatycznych, a więc populacji zawierającej zarówno nTreg jak i iTreg [27].

Układ odpornościowy rozpoznaje antygeny mikroorganizmów za pośrednictwem receptorów w tym receptorów z rodziny TLR. Receptory TLR należą do grupy receptorów rozpoznających wzorce molekularne (PRR). Rozpoznają one cząsteczki mikroorganizmów patogennych o konserwowanej ewolucyjnie budowie (PAMPs). Podczas infekcji u kręgowców odpowiadają za indukcję wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej [19]. Rodzaj receptorów TLR zaangażowanych w rozpoznanie mikroorganizmu, a także ligandu wiążącego się z TLR decyduje o rodzaju i przebiegu rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej. Receptory TLR ulegają ekspresji przede wszystkim na powierzchni komórek prezentujących antygen (APC) – głównie komórek dendrytycznych, makrofagów i limfocytów B, ale także na powierzchni regulatorowych limfocytów T CD4+CD25+FoxP3+. Rola receptorów TLR w modulacji odpowiedzi immunologicznej, w tym aktywności Treg jest przedmiotem intensywnych badań, których

wyniki mogą dostarczyć informacji potrzebnych do powstania bardziej skutecznych szczepionek i nowych rodzajów terapii chorób związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu odpornościowego.

## 2. Regulatorowe limfocyty T

Naturalne regulatorowe limfocyty T stanowią 5–10% limfocytów CD4<sup>+</sup> w krwi obwodowej myszy [2] i około 6% w krwi obwodowej człowieka [27]. Ich podstawową funkcją jest utrzymanie stanu tolerancji na własne antygeny, ponadto utrzymują homeostazę w układzie odpornościowym hamując zarówno fizjologiczną jak i patologiczną odpowiedź immunologiczną. Są zaangażowane w regulację odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym, alergenom, patogennym i komensalnym mikroorganizmom oraz przeszczepom, a także biorą udział w utrzymaniu tolerancji na antygeny płodu. Udział nTreg w rozwoju tolerancji na antygeny własne wykazano w badaniach, w których tymekotomii poddano 2–4 dniowe myszy. Zaobserwowano u nich brak limfocytów CD4+CD25+ oraz rozwój wielonarządowych chorób autoimmunizacyjnych, którym można było zapobiec poprzez adoptywny transfer limfocytów T CD4+CD25+ z myszy zdrowej [27].

Uważa się, że indukowane regulatorowe limfocyty T pełnią podobne funkcje jak nTreg, z tym że utrzymanie

### Wykaz skrótów

AP-1	– activation protein 1 – białko aktywacji 1,
APC	– antigen presenting cell – komórka prezentująca antygen,
cAMP	– cykliczny adenosynomonofosforan,
CpG DNA	– fragmenty DNA zawierające dużą liczbę dinukleotydów zbudowanych z niemetylowanych cytozyn oraz guanin,
CpG-ODN	– CpG single stranded oligodeoxynucleotides – jednoniciowe oligonukleotydy zawierające wyspy CpG,
CTLA-4	– cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4 – antygen 4 związany z limfocytami T cytotoksycznymi,
DC	– dendritic cell – komórka dendrytyczna,
FoxP3	– forkhead/winged-helix family transcriptional repressor p3 – represor transkrypcji 3 z rodziny forkhead/winged-helix,
GDF5	– growth differentiation factor 5 – czynnik wzrostu i różnicowania 5,
GITR	– glucocorticoid-induced TNF-family receptor – receptor z rodziny TNF indukowany przez glukokortykoidy,
gp96	– glikoproteina o masie cząsteczkowej 96 kDa,
Hsp60, Hsp70	– heat shock protein – białko szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 60, 70 kDa,
IFN	– interferon – interferon,
IκB	– inhibitor of κB – inhibitor czynnika κB,
IKK	– IκB kinase – kinaza IκB,
IPEX	– immune dysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy X-linked syndrome – zespół upośledzenia odporności, poliendokrynopatii i enteropatii związany z chromosomem X,
IRAK	– interleukin-1 receptor-associated kinase – kinaza związana z receptorem dla interleukiny 1,
IRF3	– interferon regulatory factor 3,
LAG3	– lymphocyte activation gene 3 – 3 gen aktywacji limfocytów,
LBP	– LPS binding protein – białko wiążące LPS,
LPS	– lipopolysaccharide – lipopolisacharyd,
LRR	– leucine rich region – region bogaty w leucyny,
LTA-SA	– lipoteichoic acid from <i>Staphylococcus aureus</i> kwas lipoteichowy <i>Staphylococcus aureus</i> ,
MAP lub MAPK	– mitogen activated protein kinase – kinaza aktywowana przez mitogen,
MD-2	– myeloid differentiation 2,
MHC	– major histocompatibility complex – główny układ zgodności tkankowej,



tolerancji na antygeny własnego organizmu przypisywane jest jedynie nTreg.

W utrzymanie tolerancji obwodowej zaangażowane są także inne komórki układu odpornościowego: limfocyty T $\gamma\delta$ , limfocyty T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> oraz limfocyty NKT [27].

### 2.1. Charakterystyka fenotypowa

Jak dotąd nie udało się znaleźć unikalnych markerów powierzchniowych charakterystycznych dla Treg. Częściczki CD4, CD25, CD28, cząsteczki adhezyjne CD62L i CD103 oraz CTLA-4, GITR, LAG3 i mTGF- $\beta$  obecne na powierzchni Treg są także obecne na innych komórkach układu odpornościowego [23, 27].

Powszechnie uważa się, że jedynym charakterystycznym markerem regulatorowych limfocytów T (zarówno iTreg jak i nTreg) jest czynnik transkrypcyjny FoxP3. Odgrywa on znaczącą rolę w rozwoju Treg. Myszy z mutacją w genie *FOXP3* rozwijają wielonarządowe choroby autoimmunizacyjne i mają zmniejszoną liczebność Treg. Ludzie ze zmutowanym genem *FOXP3* cierpią na zespół IPEX i mają zmniejszoną liczbę regulatorowych limfocytów T. Białko FoxP3 jest represorem transkrypcji IL-2, IL-4 i IFN- $\gamma$  działającym poprzez bezpośrednie oddziaływanie z NF- $\kappa$ B i NF-AT. Kompleks NF-AT/FoxP3 wzmacnia natomiast ekspresję CD25 i CTLA-4 [2, 27, 48].

### 2.3. Mechanizmy supresji

Regulatorowe limfocyty T działają w węzłach chłonnych oraz w miejscu gdzie rozwija się stan zapalny. Treg mają niższe powinowactwo do chemokiny niż efektorowe limfocyty T (Tef), dlatego ich chemotaksja do miejsca rozwijającego się stanu zapalnego przebiega wolniej. Postuluje się kilka hipotetycznych mechanizmów działania regulatorowych limfocytów T, większość z nich wymaga fizycznego zbliżenia limfocytów regulatorowych i komórek docelowych (limfocytów CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B, NK, NKT) najczęściej przy udziale komórek APC *in vivo* regulatorowe limfocyty T są zdolne do hamowania aktywności limfocytów efektorowych [2, 27].

*In vitro* Treg są zdolne do hamowania aktywacji i proliferacji oraz produkcji cytokin przez limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, nawet przy braku obecności komórek prezentujących antygen. Wykazują także zdolność hamowania proliferacji limfocytów B oraz produkcji i przełączania klas immunoglobulin. Ponadto hamują cytotoxicność komórek NK i NKT oraz funkcje i dojrzewanie komórek dendrytycznych (DC). W mniejszym stopniu hamują także czynności aktywowanych wcześniej limfocytów CD4<sup>+</sup> oraz limfocytów pamięci [2, 27].

Pierwszy postulowany mechanizm (rys. 1a) oparty jest na działaniu cząsteczek CTLA-4 i LAG3. Treg wykazują konstytutywną ekspresję CTLA-4. Stymulacja limfocytów Treg przy udziale receptorów CTLA-4

#### Wykaz skrótów c.d.

mTGF- $\beta$	- membrane-bound transforming growth factor $\beta$ - transformujący czynnik wzrostu $\beta$ związany z błoną,
MALP2	- macrophage-activating lipopeptide-2, - lipopeptyd 2 aktywujący makrofagi,
MyD88	- myeloid differentiation primary response gene 88 - gen 88 pierwotnej odpowiedzi różnicowania szpiku,
NF- $\kappa$ B	- nuclear factor $\kappa$ B - jądrowy czynnik $\kappa$ B,
NK	- natural killer cell - limfocyt NK,
NKT	- natural killer T cell - limfocyt NKT,
nTreg	- naturalne regulatorowe limfocyty T,
Pam3CysSK4	- triacylated synthetic lipoprotein - syntetyczna triacylowana lipoproteina,
PAMPs	- pathogen-associated molecular patterns - wzorce molekularne związane z patogenami,
PRR	- pattern recognition receptors - receptory rozpoznające wzorce molekularne,
SARM	- Sterile-alpha and TIR motif-containing protein - białko zawierające motyw $\alpha$ i TIR,
TAK	- TGF- $\beta$ -activated kinase 1 - kinaza 1 aktywowana przez TGF- $\beta$ ,
TAB	- TAK-binding protein - białko wiążące TAK,
TCR	- T cell receptor - receptor limfocytów T,
Tef	- limfocyt T efektorowy,
Th1	- T helper 1 cell - limfocyt T pomocniczy typu 1,
Th2	- T helper 2 cell - limfocyt T pomocniczy typu 2,
Treg	- CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> regulatory T cell - regulatorowy limfocyt T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ,
iTreg	- induced regulatory T cell - indukowany regulatorowy limfocyt T,
TGF- $\beta$	- transforming growth factor $\beta$ - transformujący czynnik wzrostu $\beta$ ,
TIR	- Toll/interleukin-1 receptor - motyw związany z Toll i receptorem dla interleukiny 1,
TIRAP	- TIR domain-containing adaptor protein - białko adaptorowe zawierające domenę TIR,
TLR	- Toll-like receptor - receptor podobny do białka Toll,
TNF- $\alpha$	- tumor necrosis factor $\alpha$ - czynnik martwicy nowotworów $\alpha$ ,
TRAF6	- TNF receptor-associated factor 6 - czynnik 6 związany z receptorem dla TNF,
TRAM	- TRIF-related adaptor molecule - białko adaptorowe związane z TRIF,
TRIF	- TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ - białko adaptorowe zawierające domenę TIR i indukujące ekspresję interferonu $\beta$ .

i TCR prowadzi do indukcji funkcji supresyjnych. Eksperymentalne zablokowanie CTLA-4 u myszy prowadzi do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Mechanizm działania cząsteczki LAG3 nie jest znany, wiadomo jednak że komórki Treg pochodzące z myszy z wyciszonym genem *LAG3* wykazują obniżoną zdolność do hamowania proliferacji Tef, oraz że nadekspresja LAG3 w błonie naiwnych limfocytów CD4<sup>+</sup> zmienia je w komórki o właściwościach supresyjnych [27].

Drugi mechanizm działania (rys. 1b) polega na zmianie środowiska cytokinowego w miejscu stanu zapalnego. Treg produkują cytokiny supresyjne: TGF- $\beta$  i IL-10. TGF- $\beta$  zmniejsza sekrecję cytokin przez limfocyty CD4<sup>+</sup>, choć równocześnie nie hamuje ich proliferacji i nie indukuje apoptozy. Pobudza limfocyty Th1 do produkcji IL-10, która indukuje w limfocytach efektorowych ekspresję receptora dla TGF- $\beta$ , co zwiększa ich podatność na supresję. Ponadto, IL-10 zmniejsza produkcję IL-12 przez komórki APC. Hamuje to auto+ krynowe pobudzenie aktywności APC przez IL-12 oraz różnicowanie limfocytów naiwnych w kierunku limfocytów Th1 [2]. TGF- $\beta$ , zwiększa w docelowych komórkach stężenie cAMP, co powoduje zmniejszenie ekspresji IL-2 i zahamowanie ich proliferacji [38].

Uważa się, że cząsteczka CTLA-4 obecna na powierzchni Treg może powodować indukcję ekspresji 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO) w komórkach dendrytycznych (rys. 1c). IDO to enzym w szlaku katabolizmu tryptofanu. Zwiększenie stężenia IDO powoduje, że lokalnie powstaje środowisko immunosupresyjne [12].

Wydzielanie perforyn i grzymów przez Treg powoduje śmierć komórki docelowej (rys. 1d) [2, 12].

Kolejnym mechanizmem działania Treg jest inhibicja proliferacji i/lub produkcji cytokin przez efektorowe limfocyty T (rys. 1f). Treg hamują produkcję IL-2 na poziomie mRNA we wczesnych fazach aktywacji efektorowych limfocytów T (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>), co prowadzi do ich anergii. Ponadto Treg mogą zmniejszyć stężenie IL-2, poprzez zużycie tej cytokiny w miejscu swojego działania, co skutkuje osłabioną proliferacją i produkcją cytokin przez aktywowane efektorowe limfocyty T [2, 12, 27].

Jak dotąd, mimo licznych badań *in vivo* i *in vitro* nie ustalono jednoznacznie w jaki sposób działają regulatorowe limfocyty T.

#### 2.4. Regulacja aktywności Treg

Aktywność Treg podlega ścisłej kontroli, jest modulowana między innymi przez hormony i cytokiny. Wśród hormonów najlepiej poznano wpływ glukokortykoidów. Określono także wpływ niektórych cytokin na aktywność regulatorowych limfocytów T. Wysokie stężenia IL-2, z jednoczesną stymulacją antygenową

powodują proliferację antygenowo specyficznych Treg, które wykazują później silniejsze właściwości supresyjne. IL-15 w pewnym stopniu zastępuje działanie IL-2. IL-4 działa jako czynnik wzrostowy dla Treg i wzmacnia ich właściwości supresyjne, natomiast IL-7 jest czynnikiem podtrzymującym przeżycie Treg w obwodowych narządach limfatycznych [27, 40]. Od szeregu lat badany jest efekt jaki na aktywność Treg wywierają cząsteczki kostymulacyjne, ostatnio w kręgu zainteresowań wielu grup badawczych na świecie pozostaje rola modulacyjna receptorów TLR.

Efekt supresyjny jaki wywierają Treg zależy nie tylko od ich stanu funkcjonalnego, ale także od wrażliwości docelowych limfocytów efektorowych oraz wpływu komórek APC na limfocyty regulatorowe. I tak, zwiększona ekspresja cząsteczek CD80 i CD86 na komórkach APC powoduje, że efektorowe limfocyty T stają się niewrażliwe na supresję. W tych warunkach Treg proliferują i tracą właściwości supresyjne. Zwiększenie ekspresji CD134 (OX40) i receptora dla TNF- $\alpha$  na APC oraz stymulacja GITR na komórkach regulatorowych powoduje częściowe zablokowanie supresji. Ponadto silna aktywacja limfocytów efektorowych wywołana przez stymulację TCR i GITR powoduje, że wykazują one brak wrażliwości na działanie Treg. Podobne efekty dają wysokie stężenia IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12. TGF- $\beta$  aktywuje Treg, co prowadzi do ich ekspansji oraz zwiększenia ekspresji FoxP3, to z kolei wzmacnia aktywność supresyjną Treg. W wielu przypadkach nie udało się jednoznacznie stwierdzić czy dany czynnik działa na limfocyty efektorowe, blokuje funkcje Treg czy działa na oba rodzaje komórek jednocześnie [12, 27, 38, 40].

W regulację aktywności Treg zaangażowane są także receptory TLR. Receptory te występują przede wszystkim na APC. Zaobserwowano także obecność TLR w Treg oraz Tef, przy czym poziom ekspresji TLR (na poziomie mRNA) był znacznie wyższy w Treg niż w Tef, co sugeruje że TLR mogą wpływać na funkcjonowanie limfocytów regulatorowych zarówno bezpośrednio jak i w sposób pośredni [40].

### 3. Receptory TLR

U ssaków receptory TLR występują głównie na komórkach prezentujących antygen. Ich aktywacja indukuje produkcję cytokin prozapalnych, chemokin, interferonów (IFN) i zwiększenie ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych (CD28, CTLA-4) na komórkach APC [15, 19].

TLR należą do białek transbłonowych typu I. Zewnętrzna część receptora, która wiąże PAMPs zawiera motywy bogate w leucyny. Za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki odpowiada część cytoplazmatyczna, w której znajduje się domena TIR (rys. 2) [15].

U ssaków receptory TLR (Toll-like) to najlepiej poznana grupa receptorów z rodziny PRR. Pomiedzy poszczególnymi gatunkami występują różnice w liczbie genów dla TLR. Większość ssaków posiada ich od dziesięciu do piętnastu [14]. U ludzi zidentyfikowano jedenaście receptorów TLR, a u myszy trzynaście [15]. Człowiek posiada funkcjonalny TLR10, natomiast u myszy gen ten zawiera mutację powodującą, że produkt jest niefunkcjonalny. Podobnie, mysi TLR11 jest funkcjonalny, a u ludzi produkt genu TLR11 nie powstaje [41].

### 3.1. Odkrycie receptorów TLR

Pierwsze białko z rodziny Toll (Toll1) zostało zidentyfikowane w 1985 roku jako czynnik odpowiedzialny za ustalenie grzbietobrzusznej polarności wczesnego zarodka *Drosophila melanogaster*. Następne badania wykazały, że Toll1 i Toll2 odgrywają rolę w embriogenezie i późniejszym rozwoju np. podczas powstawania mięśni i motoneuronów. W dalszej kolejności odkryto, że białko Toll1 u *D. melanogaster* bierze udział w zapoczątkowaniu reakcji odpornościowych przeciwko grzybom i bakteriom Gram-dodatnim. W procesie tym pośredniczą czynniki transkrypcyjne z rodziny NF- $\kappa$ B. Białko Toll1 nie rozpoznaje wzorców molekularnych bezpośrednio, a jest aktywowane przez endogenne ligandy – białko Spätzle. Udział receptorów TLR w procesach rozwoju i obrony organizmu jest różny zarówno na poziomie białek aktywujących TLR jak i odmiennego udziału czynników z rodziny NF- $\kappa$ B [19]. Fakt iż tylko białko Toll1 u *D. melanogaster* pośredniczy w odpowiedzi immunologicznej, a białka od Toll2 do Toll9 nie pełnią takiej roli wskazuje, że pierwotną ich funkcją nie była regulacja odporności [19, 41].

W roku 1998 odkryto, że za brak wrażliwości myszy szczepów C3H/HeJ i C57BL/10ScCr na składnik ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych – lipopolisacharyd (LPS) odpowiada mutacja unieczynnająca ssaczy homolog białka Toll1 – TLR4. Ponadto okazało się, że u myszy, TLR4 wpływa na indukcję ekspresji genów stanu zapalnego. [43] Dalsze badania wykazały, że białka z tej rodziny nie odgrywają żadnej roli we wczesnym rozwoju ssaków. Biorąc natomiast udział w bezpośrednim rozpoznawaniu cząsteczek patogenów i indukowaniu, poprzez czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, wrodzonej i nabytej odpowiedzi odpornościowej. Co ciekawe, niedawno wykazano, że u myszy receptory TLR obecne są w neuronach i komórkach progenitorowych neuronów i prawdopodobnie biorą udział w regulacji wzrostu aksonów i tworzeniu połączeń nerwowych [19].

### 3.2. Szlaki przekazywania sygnału

Motyw LRR znajdujący się w zewnątrzkomórkowej części receptora TLR posiada strukturę umożliwiającą oddziaływanie białko-białko. Domena ta może także

wiązać lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe [19]. Rozpoznanie PAMPs prowadzi do dimeryzacji lub nawet oligomeryzacji receptorów TLR oraz rekrutacji wewnątrzkomórkowych cząsteczek pośredniczących także posiadających domenę TIR, w tym MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM i SARM [47]. Białka te łączą się z TLR dzięki oddziaływaniom pomiędzy dwiema domenami TIR, z których jedna jest częścią receptora TLR, a druga białka pośredniczącego.

Szlak transdukcji sygnału prowadzący od receptorów TLR jest przedstawiony na rysunku 3. MyD88 jest uniwersalną cząsteczką adaptorową szlaków aktywujących stan zapalny prowadzących od wszystkich TLR z wyjątkiem TLR3. Połączenie MyD88 z TLR prowadzi do aktywacji kinazy MAP i czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, który kontroluje ekspresję genów dla cytokin prozapalnych, takich jak TNF- $\alpha$  i IL-2 [15, 41].

TIRAP pośredniczy w przekazywaniu sygnału z TLR2 oraz TLR4 i aktywuje drogę zależną od MyD88. TRIF natomiast przyłącza się do TLR3 i TLR4 aktywując alternatywną ścieżkę (TRIF-zależną), która prowadzi do aktywacji NF- $\kappa$ B, kinazy MAP i czynnika transkrypcyjnego IRF3 (interferon regulatory factor 3), który reguluje ekspresję interferonów typu I (I IFN), głównie IFN- $\beta$  [15].

Oddziaływanie TLR i MyD88 poprzez domeny TIR stymuluje rekrutację białek z rodziny IRAK. IRAK-4 łączy się z MyD88 dzięki oddziaływaniom domen śmierci, co umożliwia pojedynczą fosforylację cząsteczki IRAK-1, która oddysocjowuje od MyD88 i oddziałuje z TRAF6. Prowadzi to do uruchomienia dwóch ścieżek sygnałowych. Jedną z nich skutkuje aktywacją czynnika transkrypcyjnego AP-1. Drugą ścieżką aktywuje kompleks TAK z TAB, który aktywuje kompleks kinazy I $\kappa$ B (IKK). Po aktywacji IKK fosforyluje ona inhibitor czynnika NF- $\kappa$ B i kieruje tę cząsteczkę na drogę degradacji, co prowadzi do przemieszczenia NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego [41]. Zarówno NF- $\kappa$ B i AP-1 odpowiadają za ekspresję cytokin prozapalnych [15].

W ścieżce niezależnej od MyD88 czynnik TRIF powoduje aktywację nietypowych IKK – IKK $\epsilon$ /IKK $\delta$  i TBK1. Prowadzi to do fosforylacji i przemieszczenia czynnika IRF-3 do jądra komórkowego, który aktywuje produkcję IFN- $\beta$  oraz aktywuje czynnik NF- $\kappa$ B. TRAM natomiast jest cząsteczką pośredniczącą w wiązaniu się TRIF do TLR4 [41].

Istnieje wiele mechanizmów negatywnej regulacji szlaków sygnałowych z TLR, co zapobiega nadmiernej odpowiedzi immunologicznej na patogeny. Na przykład stymulacja TLR4 przez LPS powoduje zmniejszenie ekspresji TLR4 na powierzchni komórki, a ligandy TLR2, TLR4 i TLR7 powodują zmniejszenie ekspresji IRAK-1 [41]. Negatywnym regulatorem jest także cząsteczka SARM, która oddziałuje z TRIF i blokuje aktywację NF- $\kappa$ B [47].



### 3.3. Ligandy receptorów TLR

Receptory TLR można podzielić na dwie grupy ze względu na ich lokalizację w komórce. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6 znajdują się na powierzchni błony komórkowej, natomiast TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 występują wewnątrzkomórkowo w endosomach. Receptory TLR wiążą ligandy egzogenne (tab. I) i endogenne [14, 15].

TLR4 w kompleksie z MD-2 i CD14 rozpoznaje LPS bakterii Gram-ujemnych [15], a także białka szoku cieplnego Hsp60 i Hsp70. W przeciwieństwie do LPS inne ligandy TLR4 muszą osiągnąć stosunkowo wysokie stężenie, aby aktywować odpowiedź immunologiczną [41]. TLR2 tworzy heterodimery z TLR1 i TLR6 lub z cząsteczkami innymi niż TLR np. z CD36 rozpoznając peptydoglikan, lipopeptydy i lipoproteiny bakterii Gram-dodatnich, lipopeptydy *Mycoplasma* sp. oraz zymozan grzybów. Kompleks TLR1/2 rozpoznaje triacylolipopeptydy, a heterodimer TLR2/6 diacylolipopeptydy [15]. TLR2 może także rozpoznawać LPS (bakterii innych szczepów niż enteropatogennych), który różni się od lipopolisacharydu rozpoznawanego przez TLR4 liczbą łańcuchów kwasów tłuszczowych w cząsteczce lipidu A [41]. U ludzi, TLR10 tworzy heterodimery z TLR1 lub TLR2, ligandy tych kompleksów nie są znane. Ligandami TLR5 jest 11 białek [15], z których największe znaczenie ma flagellina. TLR5 jako jedyny rozpoznaje wyłącznie ligandy białkowe i wydaje się pełnić ważną rolę w rozpoznaniu patogenów w błonach śluzowych [41]. Mysi TLR11 rozpoznaje nieznaną ligand pochodzący z bakterii wywołujących infekcje układu moczowego i cząsteczkę podobną do profiliny pochodzącą z organizmu pasożytniczego *Toxoplasma gondii* [15, 21].

Receptory TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 występują w przedziałach wewnątrzkomórkowych i swoje ligandy wiążą w dojrzałym endosomie połączonym z lizosomem, gdzie w normalnych warunkach nie występują kwasy nukleinowe gospodarza. Rozpoznają kwasy nukleinowe patogenów (wirusów i w mniejszym stopniu bakterii), dzięki różnicom w ich budowie w porównaniu do kwasów nukleinowych gospodarza a także odmiennym miejscu występowania [14]. Jako adaptorów używają MyD88 lub TRIF. TLR3 rozpoznaje dwuniciowe RNA, które jest produkowane podczas replikacji wielu wirusów. Ludzkie TLR7 i TLR8 są bardzo podobne strukturalnie i rozpoznają wirusowe, jednoniciowe RNA bogate w guaniny lub uracyl, małe interferujące RNA oraz syntetyczne pochodne imidazochinolonów i analogi guanozyny. TLR9 jest receptorem dla CpG DNA obecnego w genomach bakterii i wirusów. Receptor ten wiąże także inne ligandy, np. hemozoinę produkowaną przez pasożyty *Plasmodium* sp. z hemoglobiny pochodzącej z erytrocytów gospodarza [15] (tab. I).

### 3.4. Rola w generowaniu odporności nabytej

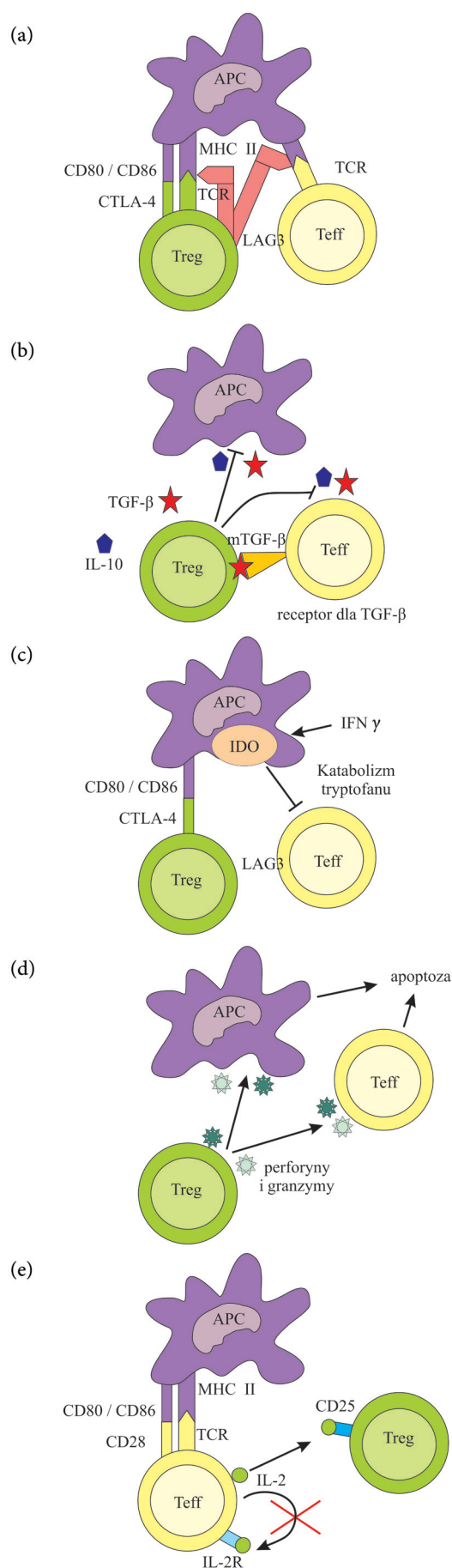
Rozpoznanie wzorców molekularnych patogenów przez receptory TLR inicjuje migrację i gromadzenie się leukocytów w miejscu inwazji mikroorganizmów, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego. Migracja zachodzi dzięki zwiększeniu ekspresji cząsteczek (selektyn, chemokin i receptorów dla chemokin), które odpowiadają za adhezję leukocytów do ścian nabłonka naczyń włosowatych, wynaczynienie oraz przemieszczanie się komórek do miejsca stanu zapalnego [14].

Tabela I

Ligandy receptorów TLR

TLR	Ligandy endogenne	Ligandy egzogenne
TLR1	Nieznany	Bakteryjne triacylowane lipopeptydy, białka pasożytów (TLR1/2)
TLR2	Hsp70, gp96, komórki nekrotyczne	Kwas lipotejchowy bakterii Gram-dodatnich, zymozan ściany komórkowej drożdży
TLR3	mRNA	Dwuniciowe RNA wirusów
TLR4	Hsp60, Hsp70, hialuronian, fibronektyna, fibrynogen, heparan, $\beta$ -defensyna 2	LPS bakterii Gram-ujemnych
TLR5	Nieznany	Flagellina
TLR6	Nieznany	Bakteryjne diacylowane lipopeptydy (TLR2/6)
TLR7	Nieznany	Jednoniciowe RNA wirusów
TLR8	Nieznany	Jednoniciowe RNA wirusów
TLR9	Kompleksy przeciwciała-chromatyna	CpG DNA wirusów i bakterii
TLR10	Nieznany	Nieznany
TLR11	Nieznany	Profilina pierwotniaka <i>Toxoplasma gondii</i> , komponenty bakterii powodujących infekcje dróg moczowych
TLR12	Nieznany	Nieznany
TLR13	Nieznany	Nieznany





Rys. 1. Mechanizmy supresji – objaśnienia w tekście

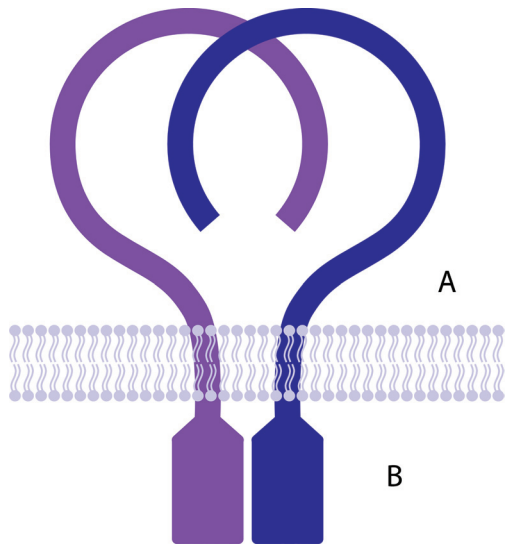
Stymulacja receptorów TLR występujących na komórkach dendrytycznych prowadzi do przesunięcia odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi typu Th1, Th2 lub supresji (rys. 4). Indukcja odpowiedzi nabytej rozpoczyna się wraz z wchłonięciem antygeny przez niedojrzałą komórkę dendrytyczną, wykazującą niską ekspresję MHC II i cząsteczek kostymulacyjnych (z rodziny B7). Jednocześnie, po rozpoznaniu patogenu przez receptory PRR, w tym TLR, komórki dendrytyczne dojrzewają – zwiększają ekspresję cząsteczek MHC oraz cząsteczek z rodziny B7 (CD80/86) [31]. Następnie komórki DC migrują do najbliższego węzła chłonnego [14, 24]. W węzle chłonnym DC prezentują antygeny naiwnym limfocytom Th. Kierunek różnicowania naiwnych limfocytów Th (Th1, Th2 lub Treg) zależy od stanu funkcjonalnego komórek APC, a ten jest determinowany przez rodzaj PAMPs, które związały się z PRR (rys. 4c). I tak, związanie ligandu z receptorem TLR prowadzi do indukcji dojrzewania DC, produkcji IL-12 oraz IL-2 i różnicowania naiwnych limfocytów Th w kierunku Th1 (rys. 4a). Powstawanie Th2 i Treg jest związane z aktywacją innych PRR występujących na APC. Jednym z takich PRR jest CD11b/CD18, który wiąże np. toksyny cholery (CT) lub cząsteczki występujące u pasożytów (rys. 4b, 4c). Kolejne badania wykazały, że za indukcję Treg odpowiadają także filamentarna hemaglutynina (FHA), toksyna cyklazy adenylowej *Bordetella pertussis* (CyaA) oraz niestrukturalne białko 4 (NS4) wirusa zapalenia wątroby typu C. Być może na ten kierunek różnicowania ma również wpływ jednoczesne rozpoznanie ligandów różnych receptorów TLR [24].

Dojrzałe DC, wykazujące wysoką ekspresję MHC II, CD80, CD86, CD40, ICAM-1 oraz produkujące IL-12 indukują powstanie limfocytów Th1. Różnicowanie Treg jest indukowane przez niedojrzałe DC, które wykazują ekspresję MHC II, CD80 oraz CD86 na średnim, a CD40 i ICAM-1 na niskim poziomie oraz wydzielają duże ilości IL-10. Podobny fenotyp, połączony dodatkowo z wysoką ekspresją OX40 charakteryzuje DC indukujące różnicowanie limfocytów T w kierunku Th2 [24].

Aktywacja receptorów PRR, w tym TLR, na makrofagach i komórkach dendrytycznych odgrywa znaczącą rolę w kierowaniu limfocytów Th na różne ścieżki różnicowania. Obecność ligandów receptorów TLR indukuje powstawanie głównie odpowiedzi typu Th1, ale może też prowadzić do pojawienia się indukowanych regulatorowych limfocytów T, które hamują działanie limfocytów Th1.

#### 4. Modulacja aktywności Treg przez stymulację TLR

Regulatorowe limfocyty T wykazują ekspresję szerokiego wachlarza receptorów TLR, co sugeruje udział receptorów TLR w regulacji aktywności Treg [31].



Rys. 2. Dimer receptorów TLR. (A) część zewnątrzkomórkowa zawierająca motywy LRR, (B) część wewnątrzkomórkowa zawierająca domeny TIR

4.1. Wpływ egzogennych ligandów lipidowych

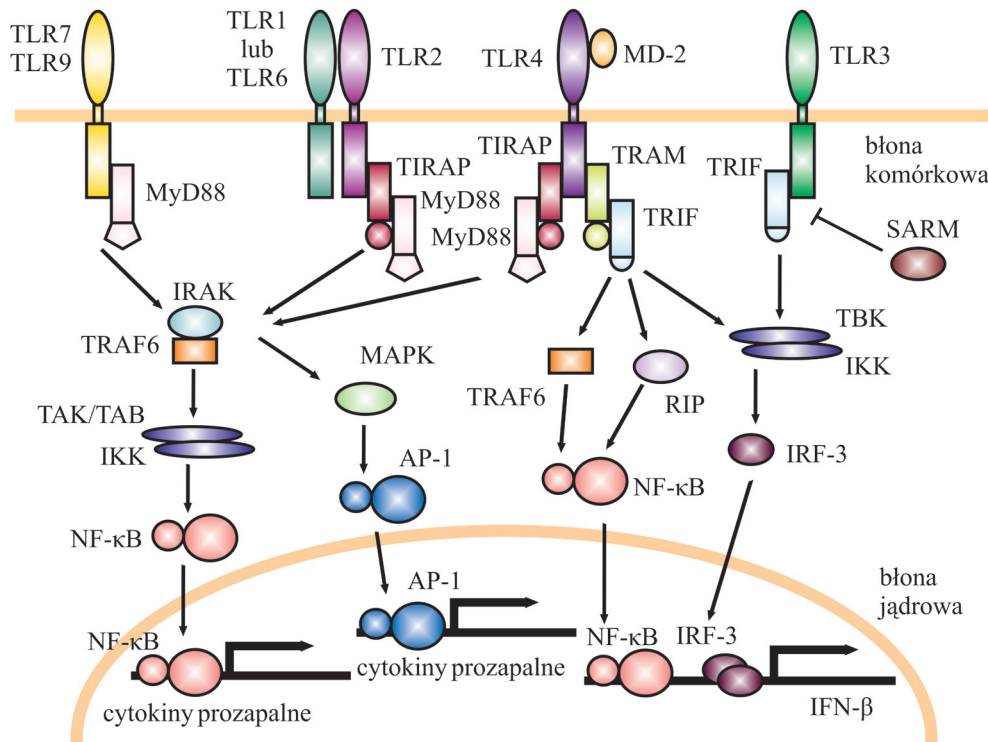
4.1.1. TLR2

TLR2 jest obecny w cytoplazmie spoczynkowych limfocytów efektorowych CD4+ i Treg, po aktywacji zależnej od TCR pojawia się na powierzchni błony komórkowej. Zapobiega to nadmiernej aktywacji limfocytów przez występujące powszechnie u mikroorganizmów cząsteczki będące ligandami TLR2 [22].

Wydaje się, że TLR2 odpowiada za utrzymanie odpowiedniej liczby Treg u myszy. Dowodzą tego doświad-

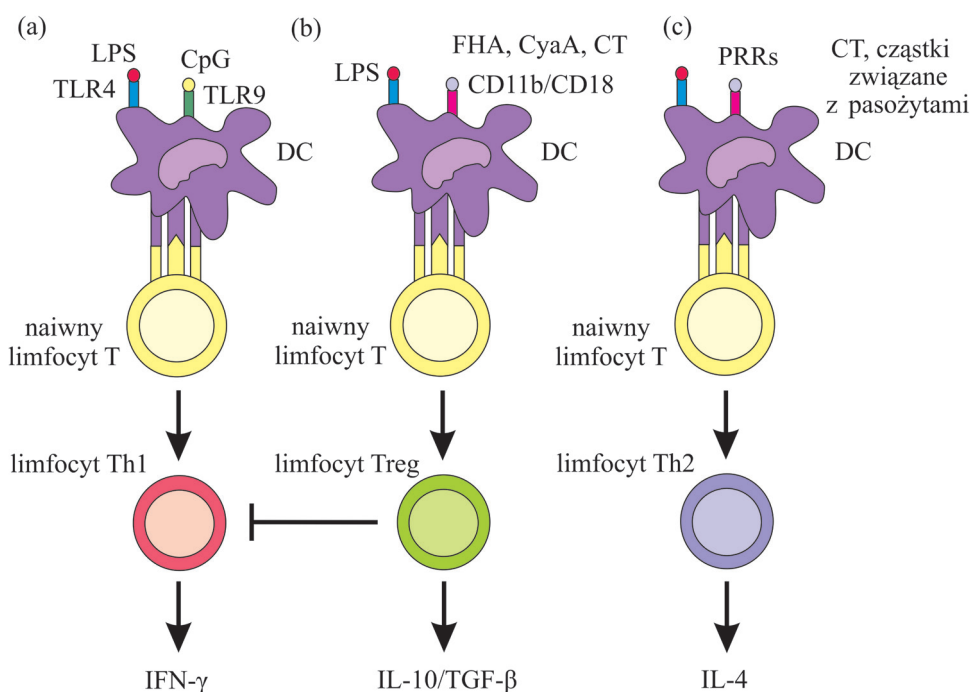
czenia, w których po podaniu antygeny u myszy knock-out TLR2<sup>-/-</sup> obserwowano znacznie niższą liczbę limfocytów CD4+CD25+FoxP3+ niż u myszy szczepu dzikiego (WT). Takich różnic nie zaobserwowano przy braku stymulacji antygenem [18]. Inni badacze zaobserwowali jednak zmniejszoną liczbę Treg także u myszy knock-out TLR2<sup>-/-</sup>, które nie miały kontaktu z antygenem. Zauważono także mniejszą podatność myszy TLR2<sup>-/-</sup> na ogólnoustrojową infekcję *Candida albicans* (składniki ściany komórkowej tych grzybów są ligandami dla TLR2 i TLR4). Jednocześnie u tych samych myszy obserwowano znacznie cięższy przebieg infekcji pasożytem *Schistosoma mansoni* (fosfatydyloseryna jaj *S. mansoni* jest ligandem dla TLR2). Przebieg obu infekcji może być związany z obniżoną zdolnością do supresji rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej, co może być związane ze zmniejszoną liczbą Treg. Przy czym w przypadku *C. albicans* dochodzi w tych warunkach do szybszej eliminacji patogenu, podczas gdy infekcja *S. mansoni* wywołuje, przy braku supresji, długotrwałą i nadmierną odpowiedź immunologiczną, która uszkadza tkanki gospodarza. Podobnie reagowały myszy knockout MyD88<sup>-/-</sup> (MyD88 jest cząsteczką adaptorową dla wielu TLR, w tym TLR2). Podobny efekt zaobserwowano u myszy po usunięciu Treg za pomocą przeciwciał anti-CD25 [18, 28, 39].

Odmienne efekty obserwowano, gdy do aktywacji TLR2 użyto innych ligandów, np. syntetycznej bakteryjnej lipoproteiny, Pam3CysSK4 (ligand heterodimeru TLR1/2). Działanie Pam3CysSK4 bezpośrednio na aktywowane Treg w warunkach *in vitro* powoduje ich pro-



Rys. 3. Szlaki przekazywania sygnału z receptorów TLR

Rys. 4. Kierunek różnicowania limfocytów Th w zależności od cząsteczek aktywujących makrofagi i komórki dendrytyczne (wyjaśnienia w tekście)



liferację, podwyższa poziom ekspresji CD25 oraz obniża ich właściwości supresyjne [22, 39]. Obserwowany w tych warunkach u Treg zanik zdolności do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych wynikał zarówno z utraty właściwości supresyjnych Treg, jak i z wzmożonej produkcji IL-2 przez Tef. Wysokie stężenie IL-2 skutkuje utratą wrażliwości Tef na działanie Treg oraz proliferacją limfocytów Treg, podczas której tracą one właściwości supresyjne [22]. Po usunięciu ligandu TLR2 aktywność supresyjna Treg zostaje przywrócona [22, 39]. U podłoża zahamowania właściwości supresyjnych obserwowanego w tym eksperymencie leżał spadek poziomu ekspresji FoxP3. Podobnie, w hodowlach *in vitro* Treg z APC, obecność Pam3CysSK4 powoduje proliferację Treg. Podobny efekt obserwowano w obecności MALP2 – syntetycznego ligandu heterodimeru TLR2/6 oraz naturalnych ligandów tego heterodimeru – peptydoglikanu, zanieczyszczonego LPS i termicznie zabitych *C. albicans* [28, 39].

Limfocyty Treg pobrane od transgenicznym myszy FoxP3-GFP stymulowane w hodowlach *in vitro* przeciwciałami anti-CD3, IL-2 oraz Pam3CysSK4 proliferują zarówno w obecności jak i braku APC, ekspresja FoxP3 i aktywność supresyjna Treg pozostały nie zmienione. W tych warunkach obecność Pam3CysSK4 przedłuża żywotność Treg poprzez indukcję czynnika antyapoptotycznego Bcl-xL oraz wzmacnia proliferację swoistych antygenowo Treg. Komórki Treg hodowane w obecności Pam3CysSK4 nie tracą zdolności do hamowania rozwoju chorób autoimmunizacyjnych *in vivo* [5].

Odmienne wyniki uzyskała grupa badaczy pracująca na szczurzych Treg. Ustalili oni, że ligandy dla heterodimeru TLR2/6 (peptydoglikan) oraz TLR2 – HKLM

(zabite termicznie komórki *Listeria monocytogenes*) nie powodują wzmożonej proliferacji Treg i nie obniżają ich aktywności supresyjnej [6]. Przyczyną może być także bark aktywności receptora TLR2 w Treg szczurów lub rodzaj użytego ligandu. Proliferację Treg najsilniej indukuje aktywacja heretodimeru TLR1/TLR2 (ligandem Pam3CysSK4), słabiej aktywacja homodimeru TLR2/TLR2 (ligandem LTA-SA) oraz heterodimeru TLR2/TLR6 (ligandem Pam2CysSK4) [5].

#### 4.1.2. TLR4

U myszy wykazano obecność mRNA dla TLR4 w limfocytach Treg. *In vitro* ligand TLR4 - LPS indukował proliferację Treg oraz wzmacniał ich właściwości supresyjne. Efekt ten nie był widoczny gdy użyto komórek Treg izolowanych od myszy C3H/HeJ lub C57BL/10ScCr [4].

W późniejszych badaniach nie udało się potwierdzić obecności TLR4 na powierzchni mysich Treg, ponadto LPS działając bezpośrednio na Treg nie indukował ich proliferacji ani wydzielania cytokin [22]. W warunkach *in vitro* nie miał także wpływu na ich aktywność supresyjną oraz nie powodował wzrostu ekspresji CD25 na powierzchni Treg [9].

*In vitro*, Treg traktowane LPS i hodowane z APC izolowanymi ze śledziony oraz Tef, proliferowały i wykazywały wzrost ekspresji CD25 [39]. Obserwowano także zależny od IL-6 brak wrażliwości Tef na działanie Treg traktowanych LPS [30]. Inne doświadczenia pokazały jednak, iż zablokowanie aktywności supresyjnej Treg przez mieloidalne DC różnicowane *in vitro* (z komórek szpiku kostnego) i stymulowane LPS nie jest zależne od IL-6 i IL-1, polega na zwiększeniu wrażliwość Treg na IL-2 [16].



Izolowane z ludzkiej krwi obwodowej Treg poddane działaniu LPS hamują wydzielanie cytokin i reaktywnych związków tlenu przez neutrofile oraz stymulują ich apoptozę, działanie to zależy częściowo od wydzielania przez Treg IL-10 i TGF- $\beta$ . Do badań użyto limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> izolowanych z krwi obwodowej, wśród których oprócz Treg mogą znajdować się mające podobny fenotyp aktywowane efektorowe limfocyty T. [19, 20].

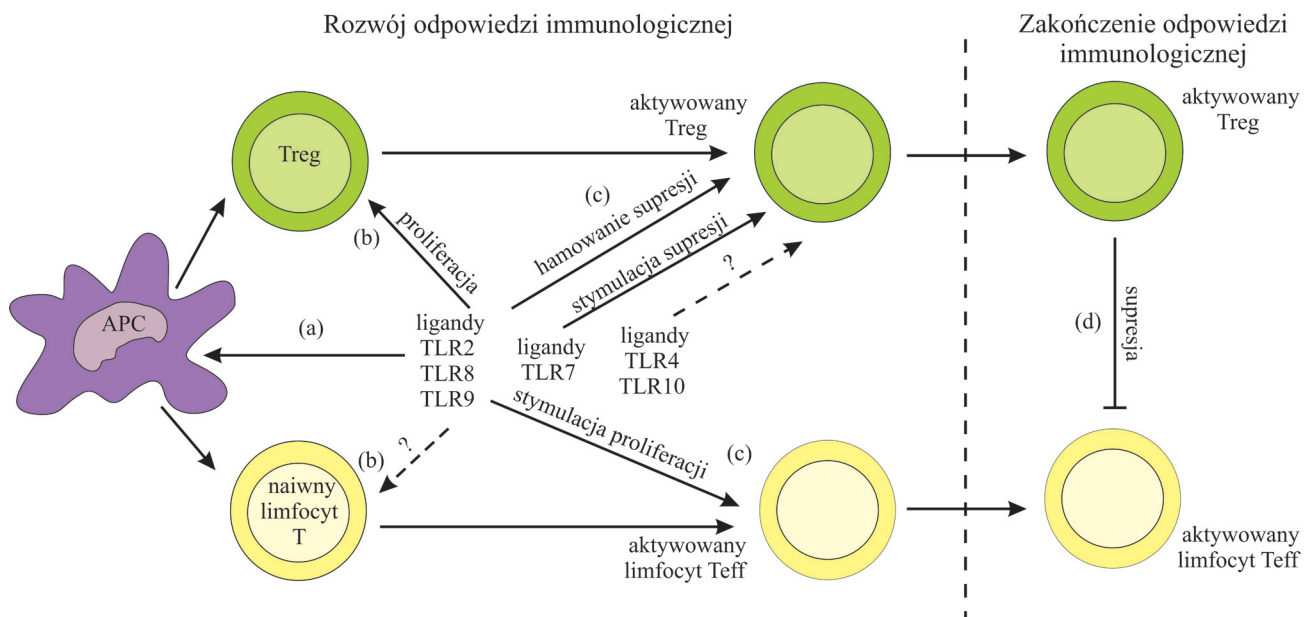
Jednocześnie LPS nie powoduje proliferacji i nie ma wpływu na aktywność supresyjną Treg szczurów [6]. Nie powoduje także proliferacji ludzkich Treg i nie wpływa na ekspresję FoxP3, natomiast nieznacznie hamuje proliferację Tef. Po aktywacji ludzkich Treg obserwowano niewielkie ilości mRNA w cytoplazmie i białka TLR4 na powierzchni Treg [7]. Jednak nie potwierdzono wpływu LPS na aktywność ludzkich Treg, ani w obecności komórek APC, ani Tef [32, 49].

Występujący na komórkach odpowiedzi wrodzonej (makrofagach i DCs) kompleks receptorowy rozpoznający LPS składa się z dwóch łańcuchów TLR4 z których każdy jest związany z białkiem MD-2. Obecność MD-2 związanego z zewnątrzkomórkową częścią TLR4 jest niezbędna do agregacji TLR4, związania ligandu i przekazania sygnału do wnętrza komórki. Białko MD-2 jest także wydzielane w formie rozpuszczalnej, w tym także przez komórki dendrytyczne podczas rozwijającego się stanu zapalnego. Kolejne cząsteczki istotne dla rozpoznania LPS to glikoproteina CD14 – wiążąca LPS i przekazująca go kompleksowi TLR4/MD-2 oraz białko LBP znajdu-

jące się w osoczu krwi bądź na powierzchni komórek, które ułatwia wiązanie LPS z CD14. Wykazano, że wiązanie LPS do kompleksu TLR4/MD-2 bez udziału białek pomocniczych powoduje uruchomienie jedynie ścieżki zależnej od MyD88 skutkującej aktywacją NF- $\kappa$ B i produkcją TNF- $\alpha$ . Natomiast udział tych białek uruchamia także ścieżkę zależną od TRAM prowadzącą do aktywacji czynnika IRF3 i produkcji IFN- $\beta$  [25, 26]. Brak LBP czy CD14 skutkuje zatem znacznie obniżonym siłą wiązania LPS do kompleksu TLR4/MD-2 [26]. Sugeruje się, że w skład kompleksu rozpoznającego LPS może wchodzić więcej białek m.in. Hsp70, Hsp90, CXCR4 (receptor dla chemokin) i GDF5 [44]. Jak dotąd nie udało się potwierdzić ekspresji cząsteczek wchodzących w skład kompleksu wiążącego LPS takich jak CD14, MD-2 i innych na powierzchni Treg.

Obserwowane zmiany w aktywności Treg zachodzące pod wpływem LPS mogą być pochodną wielu czynników w tym składzie podłoża hodowlanego (z surowicą lub bez) w jakim prowadzono eksperymenty *in vitro*, a w szczególności rodzaju surowicy (inaktywowana termicznie lub nie), która jest źródłem LPB i innych białek [4, 6, 9, 22, 49]. Obecność innych białek w tym cytokin może zmieniać odpowiedź komórek na LPS np. makrofagi w obecności IFN- $\gamma$  wykazują zwiększoną ekspresję TLR4 pod wpływem LPS [13].

Myszy transgeniczne 96-tmT (z nadekspresją gp96-czaperonem TLR1, 2 i 4) wykazują zależną od TLR4 nadwrażliwość na LPS i rozwijają objawy podobne do



Rys. 5. Wpływ ligandów TLR na aktywność regulatorowych limfocytów T

Przed infekcją komórki APC znajdują się w tkankach a naiwne limfocyty T i Treg w węzłach chłonnych, (a) napotkanie patogenu przez APC powoduje ich migrację do węzłów chłonnych, prezentację antygenów limfocytom T i pobudzenie ich proliferacji, (b) ligandy TLR mogą także dostać się do węzłów chłonnych, gdzie razem z stymulacją poprzez TCR pochodzącą od APC stymulują proliferację Treg i zablokowanie ich funkcji supresyjnych, nie jest znany wpływ ligandów TLR na naiwne limfocyty T. (c) TLR wspomagają proliferację Tef i niewrażliwość na hamowanie przez Treg, dzięki wzrostowi produkcji IL-2, dalej wstrzymują funkcje supresyjne Treg. (d) po eliminacji patogenów i usunięciu ligandów TLR zwiększona pula Treg odzyskuje zdolność hamowania Tef, co zapobiega uszkodzeniu tkanek i przywraca równowagę w układzie immunologicznym.



tocznia rumieniowatego. U myszy 96mT aktywność Treg w obecności APC jest zwiększona w porównaniu do myszy dzikich w badaniach prowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Stwierdzono także, że aktywność ta zależy od obecności TLR4 [8].

## 4.2. Wpływ egzogennych ligandów białkowych

### 4.2.1. TLR5

Ludzkie Treg wykazują ekspresję mRNA dla TLR5 na wyższym poziomie niż Tef (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), ale na powierzchni komórek białko TLR5 występuje w podobnej ilości w obu tych populacjach [3, 7]. *In vitro* w hodowlach Treg z Tef i APC równoczesna stymulacja TCR oraz TLR5 (flageliną) nie powoduje przełamania anergii Treg, natomiast limfocyty efektorowe produkują IL-2 i proliferują. Przy braku APC pod wpływem flageliny zwiększa się ekspresja FoxP3 i właściwości supresyjne Treg. Natomiast w sytuacji, gdy APC są obecne w hodowli, właściwości supresyjne Treg zostają zahamowane [7].

Podanie myszom flageliny jednocześnie z przeszczepieniem komórek immunogenego nowotworu powoduje szybszy wzrost guza oraz zwiększenie liczebności populacji limfocytów Treg. Natomiast podanie flageliny po 8–10 dniach od wszczepienia komórek nowotworowych skutkuje zahamowaniem wzrostu guza i zmniejszeniem liczebności populacji Treg na obwodzie. Sugeruje to, że Treg w obecności aktywowanych, dojrzałych APC pod wpływem flageliny tracą właściwości supresyjne, a w obecności niedojrzałych APC indukują tolerancję [36]. Inna grupa zaobserwowała natomiast, że traktowanie flageliną aktywowanych szczurzych Treg nie powoduje ich proliferacji i nie zmienia ich właściwości supresyjnych [6].

### 4.2.2. TLR10

U ludzi, potwierdzono obecność mRNA w cytoplazmie oraz białka TLR10 na powierzchni błony komórkowej Treg. Wydaje się, że w regulację ekspresji genu *TLR10* zaangażowany jest czynnik transkrypcyjny FoxP3. Jak dotąd nie opisano wpływu TLR10 na funkcjonowanie Treg [3].

## 4.3. Wpływ egzogennych kwasów nukleinowych

### 4.3.1. TLR7

W porównaniu do limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, mysie regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> wykazują wyższą ekspresję mRNA dla TLR7 [4]. Inne badania nie potwierdziły takich różnic w poziomie mRNA, choć wykazały, że poziom białka TLR7 jest trzykrotnie wyższy w endosomach mysich limfocytów T regulatorowych w porównaniu do naiwnych limfocytów T

efektorowych. W badaniach *in vitro*, ligand receptora TLR7 – imikwimod, zwiększał właściwości supresyjne Treg równocześnie nie indukując proliferacji ani Treg ani Tef. Podobne wyniki uzyskano przy użyciu innych ligandów TLR7 – gardikwimodu i jednoniciowego RNA poli(U). Komórki Treg pochodzące z myszy knockout MyD88<sup>-/-</sup> stymulowane *in vitro* ligandami TLR7 zachowywały niezmienną właściwość supresyjną, co potwierdza, że obserwowane zmiany właściwości supresyjnych były zależne od stymulacji TLR. W warunkach *in vitro*, Treg stymulowane ligandami TLR7 hamują wydzielanie IL-2 i IFN- $\gamma$  przez Tef, wykazują podwyższoną ekspresję CD25 i większą wrażliwość na IL-2 oraz wyższą ekspresję FoxP3 w obecności IL-2. W eksperymentach *in vivo*, Treg izolowane z myszy, którym podano gardikwimod wykazywały zwiększoną aktywność supresyjną wobec Tef. Działanie liganów TLR7 może mieć modulujący wpływ na przebieg infekcji wirusami RNA, zapewniając równowagę między rozwojem odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciw zakażonym komórkom, a jej wyciszeniem przez Treg. [10]

### 4.3.2. TLR8

TLR 8 został wykryty w ludzkich Treg zarówno na poziomie mRNA jak i w postaci białka powierzchniowego [3]. *In vitro*, ligandy TLR8 takie jak oligonukleotydy kwasów nukleinowych, dwuniciowe DNA oraz jednoniciowe RNA zawierające fragment poliguaninowy powodują zahamowanie właściwości supresyjnych ludzkich Treg zarówno w obecności jak i przy braku DC. Proces ten zależy od cząsteczek MyD88 i IRAK4. Podanie myszom z przeszczepionym nowotworem stymulowanych ligandem TLR8 limfocytów Treg intensyfikuje odpowiedź przeciwnowotworową, efekt ten nie był obserwowany po transferze niestymulowanych Treg [32]. Świadczy to o obniżeniu tolerogenicznej aktywności Treg wywołanej stymulacją TLR8.

### 4.3.3. TLR9

U szczurów wykazano obecność mRNA dla TLR9 zarówno w regulatorowych limfocytach T jak i limfocytach efektorowych CD4<sup>+</sup>. Podanie ligandu dla tego receptora – CpG-ODN z jednoczesną stymulacją TCR powoduje wzmożoną proliferację obu tych populacji. CpG-ODN hamuje supresyjne działanie nTreg w stosunku do Tef. Przyczyną obserwowanych zmian było zniesienie wrażliwości Tef na supresję oraz proliferacja Treg, podczas której ich aktywność supresyjna jest zahamowana [17]. Nie potwierdzono wpływu stymulacji TLR9 na ekspresję czynnika FoxP3 w Treg [6].

Zmiana aktywności Treg w wyniku bezpośredniej stymulacji ligandem TLR9 jest dyskusyjna, w innych badaniach wykazano, że proliferacja Treg oraz wzrost ekspresji CD25 mogą być indukowane przez ligand TLR9 tylko w obecności APC [30, 39].

#### 4.4. Wpływ ligandów endogennych

W ostatnich latach wykazano, że receptory z rodziny TLR oprócz ligandów egzogennych rozpoznają ligandy endogenne. Skutki aktywacji receptorów TLR ligandami endogennymi są często odmienne niż w przypadku ligandów egzogennych.

Odmienne wpływy na aktywność Treg niż ligandy bakteryjne ma endogenny ligand TLR2 – ludzkie białko Hsp60, nie ustalono składu kompleksu receptorowego z którym się ono łączy [45]. Niezależnie od obecności APC, Treg podane działaniu Hsp60 zmniejszają produkcję cytokin pozapalnych (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) oraz zwiększają wydzielanie IL-10 przez limfocyty efektorowe. Treg aktywowane w obecności Hsp60 mają także hamujący wpływ na limfocyty CD8<sup>+</sup>. Wykazano także, że efekt supresyjny zależy od bezpośredniego kontaktu Treg z komórką docelową przy udziale CTLA-4, oraz czynników rozpuszczalnych takich jak IL-10 i TGF- $\beta$ . Hsp60 łącząc się z TLR2 pobudza aktywność Treg na drodze zależnej od kinaz MAP, a Treg działając na Tef powodują hamowanie przemieszczenia się czynnika NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego, co skutkuje zahamowaniem produkcji IFN- $\gamma$  [49].

W doświadczeniach *in vitro* na transfekowanych TLR4 ludzkich komórkach nerki HEK-293, które nie wykazują ekspresji receptorów TLR oraz CD14 wykazano, że fibronektyna wiąże się z TLR4/MD2, co powoduje aktywację czynnika NF- $\kappa$ B, obecność CD14 nie wpływa na wiązanie fibronektyny [29]. Podobnie, rozpoznanie hialuronianu przez TLR4 wymaga obecności MD-2, ale nie CD14. W procesie tym bierze udział cząsteczka CD44, która oddziałuje z TLR4 w trakcie rozpoznania ligandu [42]. Cząsteczka CD14 jest natomiast wymagana przy rozpoznaniu Hsp70 przez TLR4 oraz TLR2. W obu przypadkach dochodzi do aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B. Hsp70 silniej stymuluje komórki wykazujące ekspresję równocześnie: TLR2, TLR4 i CD14, co sugeruje, że receptory te mogą tworzyć kompleksy rozpoznające Hsp70 [1]. W komórkach CHO-K1 pochodzących z jajnika chomika chińskiego CD14 jest wymagane do rozpoznania przez TLR4 występującego w płucach białka powierzchniowego A [11]. Endogenne ligandy TLR4 powodują także aktywację i dojrzewanie komórek układu odpornościowego np. fibrynogen stymuluje sekrecję chemokin przez makrofagi [37], a Hsp22 powoduje dojrzewanie komórek dendrytycznych [33].

#### 5. Podsumowanie

Receptory TLR są ważnym elementem regulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko patogenom, decydującym o rozpoczęciu usuwania mikroorganizmów bądź indukcji tolerancji. Wiązanie ligandów

przez receptory TLR limfocytów, może zmieniać aktywność Treg, bądź też sprawiać, że limfocyty T efektorowe nie wykazują wrażliwości na supresję (rys. 5). Ligandy tych receptorów mogą blokować aktywność supresyjną Treg, jak w przypadku TLR2, TLR8 i TLR9, co pozwala na skuteczną eliminację patogenów przez aktywowane limfocyty T i B. Flagelina, ligand TLR5, zmienia aktywność Treg zależnie od stanu aktywacji układu odpornościowego w lokalnym środowisku. Przy braku rozwijającego się stanu zapalnego aktywacja TLR5 flageliną, białkiem występującym także u bakterii komensalnych, promuje tolerancję natomiast podczas infekcji prowadzi do zahamowania supresji i rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Z kolei, stymulacja TLR7 wzmacnia aktywność supresyjną Treg zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Nierozstrzygnięty pozostaje wpływ ligandu TLR4 – lipopolisacharydu na regulatorowe limfocyty T, a wyjaśnienie tej kwestii wydaje się być istotne ze względu na powszechność występowania tej substancji wśród bakterii komensalnych i patogennych. Podobnie nie określono wpływu aktywacji TLR10 na aktywność Treg. Dalszych badań wymaga ekspresja receptorów TLR na limfocytach regulatorowych, szczególnie u ludzi, oraz poznanie szlaków przekazywania sygnału, które łączą sygnał wiodący od receptora TLR z ekspresją czynników odpowiedzialnych za indukcję lub zahamowanie aktywności supresyjnej tych komórek.

Oddzielnym zagadnieniem, którego szczegółowe omówienie przekracza ramy tego opracowania jest rola endogennych ligandów receptorów TLR i związana z nim teoria „sygnału o niebezpieczeństwie”.

Zrozumienie złożonych mechanizmów kontrolujących odpowiedź immunologiczną poszerzy wiedzę na temat sposobu w jaki receptory TLR wpływają na przebieg odpowiedzi immunologicznej. Wiedza ta może posłużyć do opracowania terapii pozwalających na wykorzystanie Treg do modulowania aktywności układu odpornościowego w przebiegu chorób przebiegających z zaburzeniem jego funkcji [34, 46].

Praca powstała w ramach grantu MNiSW nr NN303 395436

#### Piśmiennictwo

1. Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K.: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034 (2002)
2. Askenasy N., Kaminitz A., Yarkoni S.: Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun. Rev.* **7**, 370–375 (2008)
3. Bell M.P., Svingen P.A., Rahman M.K., Xiong Y., Faubion W.A. Jr.: FOXP3 regulates TLR10 expression in human T regulatory cells. *J. Immunol.* **179**, 1893–1900 (2007)
4. Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J.: Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**, 403–411 (2003)

5. Chen Q., Davidson T.S., Huter E.N., Shevach E.M.: Engagement of TLR2 does not reverse the suppressor function of mouse regulatory T cells, but promotes their survival. *J. Immunol.* **183**, 4458–4466 (2009)
6. Chiffolleau E., Heslan J.M., Heslan M., Louvet C., Condamine T., Cuturi M.C.: TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. *Int. Immunol.* **19**, 193–201 (2007)
7. Crellin N.K., Garcia R.V., Hadisfar O., Allan S.E., Steiner T.S., Levings M.K.: Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **175**, 8051–8059 (2005)
8. Dai J., Liu B., Ngoi S.M., Sun S., Vella AT., Li Z.: TLR4 hyper-responsiveness via cell surface expression of heat shock protein gp96 potentiates suppressive function of regulatory T cells. *J. Immunol.* **178**, 3219–3225 (2007)
9. Fehérvári Z., Sakaguchi S.: Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**, 1769–1780 (2004)
10. Forward N.A., Furlong S.J., Yang Y., Lin T.J., Hoskin D.W.: Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 117–125 (2010)
11. Guillot L., Balloy V., McCormack F.X., Golenbock D.T., Chignard M., Si-Tahar M.: Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **168**, 5989–5992 (2002)
12. Gupta S., Shang W., Sun Z.: Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **56**, 85–102 (2008)
13. Hu X., Chakravarty S.D., Ivashkiv L.B.: Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol. Rev.* **226**, 41–56 (2008)
14. Iwasaki A., Medzhitov R.: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004)
15. Kawai T., Akira S.: TLR signaling. *Semin. Immunol.* **19**, 24–32 (2007)
16. Kubo T., Hatton R.D., Oliver J., Liu X., Elson C.O., Weaver C.T.: Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 7249–7258 (2004)
17. LaRosa D.F., Gelman A.E., Rahman A.H., Zhang J., Turka L.A., Walsh P.T.: CpG DNA inhibits CD4+CD25+ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4+ T cells. *Immunol. Lett.* **108**, 183–188 (2007)
18. Layland L.E., Rad R., Wagner H., da Costa C.U.: Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2174–2184 (2007)
19. Leulier F., Lemaitre B.: Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 165–178 (2008)
20. Lewkowicz P., Lewkowicz N., Sasiak A., Tchórzewski H.: Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.* **177**, 7155–7163 (2006)
21. Liu G., Zhao Y.: Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Immunology*, **122**, 149–156 (2007)
22. Liu H., Komai-Koma M., Xu D., Liew F.Y.: Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7048–7053 (2006)
23. Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S., Annunziato F.: Thymic regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.* **4**, 579–586 (2005)
24. Mills K.H., McGuirk P.: Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection *Semin. Immunol.* **16**, 107–117 (2004)
25. Miyake K.: Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Endotoxin. Res.* **12**, 195–204 (2006)
26. Miyake K.: Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* **19**, 3–10 (2007)
27. Miyara M., Sakaguchi S.: Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* **13**, 108–116 (2007)
28. Netea M.G., Suttmuller R., Hermann C., Van der Graaf C.A., Van der Meer J.W., van Krieken J.H., Hartung T., Adema G., Kullberg B.J.: Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**, 3712–3718 (2004)
29. Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W., Ishizaka S.T., Rose J., Chow J.C., Strauss J.F. 3<sup>rd</sup>: The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **276**, 10229–10233 (2001)
30. Pasare C., Medzhitov R.: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, **299**, 1033–1036 (2003)
31. Pasare C., Medzhitov R.: Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* **6**, 1382–1387 (2004)
32. Peng G., Guo Z., Kiniwa Y., Voo K.S., Peng W., Fu T., Wang H.Y., Li Y., Wang H.Y., Wang R.F.: Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*, **309**, 1380–1384 (2005)
33. Roelofs M.F., Boelens W.C., Joosten L.A., Abdollahi-Roodsaz S., Geurts J., Wunderink L.U., Schreurs B.W., van den Berg W.B., Radstake T.R.: Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **176**, 7021–7027 (2006)
34. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T.: Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 18–32. (2001)
35. Sakaguchi S.: Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J. Exp. Med.* **197**, 397–401 (2003)
36. Sfondrini L., Rossini A., Besusso D., Merlo A., Tagliabue E., Ménard S., Balsari A.: Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *J. Immunol.* **176**, 6624–6630 (2006)
37. Smiley S.T., King J.A., Hancock W.W.: Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **167**, 2887–2894 (2001)
38. Sojka D.K., Huang Y.H., Fowell D.J.: Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, **124**, 13–22 (2008)
39. Suttmuller R.P., den Brok M.H., Kramer M., Bennink E.J., Toonen L.W., Kullberg B.J., Joosten L.A., Akira S., Netea M.G., Adema G.J.: Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 485–494 (2006)
40. Suttmuller R.P., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O., Adema G.J.: Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* **27**, 387–393 (2006)
41. Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1–14 (2005)
42. Taylor K.R., Yamasaki K., Radek K.A., Di Nardo A., Goodarzi H., Golenbock D., Beutler B., Gallo R.L.: Recognition of

- hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* **282**, 18265–18275 (2007)
43. Triantafilou M., Triantafilou K.: Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**, 301–304 (2002)
  44. Triantafilou M., Triantafilou K.: The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* **11**, 5–11 (2005)
  45. van Maren W.W., Jacobs J.F., de Vries I.J., Nierkens S., Adema G.J.: Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology*, **124**, 445–452 (2008)
  46. Wang R.F.: Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* **28**, 17–23 (2006)
  47. Watters T.M., Kenny E.F., O’Neill L.A.: Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins *Immunol. Cell. Biol.* **85**, 411–419. (2007)
  48. Yi H., Zhen Y., Jiang L., Zheng J., Zhao Y.: The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell. Mol. Immunol.* **3**, 189–195 (2006)
  49. Zanin-Zhorov A., Cahalon L., Tal G., Margalit R., Lider O., Cohen I.R.: Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 2022–2032 (2006)



Anna Katarzyna Kwaszewska<sup>1\*</sup>, Eligia Maria Szewczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 90-235 Łódź ul. Pomorska 137, e-mail: ZMF@umed.lodz.pl

Wpłynęło w lutym 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Postępy taksonomii rodzaju *Corynebacterium*. 3. Metody wykorzystywane w identyfikacji, taksonomii i typowaniu pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*. 3.1. Metody genotypowe. 3.2. Metody fenotypowe: morfologia, chemotaksonomia, właściwości biochemiczne. 4. Konsekwencje trudności w identyfikacji pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*. 5. Nowe gatunki *Corynebacterium* izolowane od ludzi. 6. Podsumowanie

#### Progress in taxonomy and methods of identification of members of the *Corynebacterium* genus isolated from humans

**Abstract:** In recent years a significant progress in taxonomy of *Corynebacterium* genus has been recorded. In the current century over 40 new corynebacteria species have been described. In this publication, genetic and phenotypic methods used in the taxonomy, identification and typing of these bacteria were evaluated. Genetic methods to studies *Corynebacterium* include analysis of conservative genes (16 rRNA, *rpoB*, 16S-23S rRNA intergenic spacer), DNA-DNA hybridization and RAPD and MLST typing. Chemotaxonomic methods include analysis of G+C content in DNA, cell-wall chemotype or cellular fatty acid composition. Eighteen new *Corynebacterium* species isolated from human clinical specimens and their biochemical characteristics were described.

1. Introduction. 2. Progress in taxonomy of *Corynebacterium* genus. 3. Methods used in the identification, taxonomy and typing of *Corynebacterium*. 3.1. Genotypic methods. 3.2. Phenotypic methods: morphology, chemotaxonomy, biochemical properties. 4. Consequences of problems with the identification of *Corynebacterium*. 5. New species of *Corynebacterium* isolated from humans. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** *Corynebacterium*, metody, taksonomia

**Key words:** *Corynebacterium*, methods, taxonomy

## 1. Wprowadzenie

Ostatnie, trzecie wydanie podręcznika *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* oparto na wynikającym z teorii Woese'go filogenetycznym podejściu do taksonomii [62, 88]. System filogenetyczny, uwzględniający wspólne ewolucyjne dziedzictwo stanowi obecnie podstawę wyodrębniania nowych taksonów i często, nowego umiejscawiania już istniejących. W praktyce, budowa tworzonego drzewa rodowego bakterii wynika z sekwencji nukleotydów zawartych w małej podjednostce 16S bakteryjnego rybosomu (SSU – small subunit). W specjalnie skonstruowanych bazach Ribosomal Database Project (RDP) i SILVA deponowane są dobrze udokumentowane i sprawdzone dane dotyczące budowy odcinków RNA pochodzących od szczepów bakterii, w tym od uznanych za typowe (wzorcowe: type strains) [17, 64]. W bazie SILVA wzbogacono te dane o sekwencje dużej podjednostki 23S rRNA (LSU – large subunit). Wielokierunkowa analiza sekwencji dokonywana jest etapami przy użyciu kolejnych narzędzi z pakietu ARB [56]. Każda jednostka taksonomiczna jest też dodatkowo analizowana w kontekście 1000 sekwencji

pochodzących od drobnoustrojów należących do innych typów lub domen. Od 2000 roku do chwili obecnej ukazały się dopiero trzy z pięciu zapowiadanych tomów kłucza Bergey'a, a prace nad kolejnymi postępują wolno. Nadal oczekujemy na tom, który roboczo nosi tytuł „The *Actinobacteria*”, w którym zawarta będzie systematyka i opis maczugowców. Postęp prac i opracowany dotąd kształt drzewa logenetycznego tego typu jest jednak dostępny w postaci publikowanego w internecie zarysu (outline) [57]. Nowe gatunki maczugowców są opisywane w publikacjach ukazujących się w *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Przyjęto, że jest to jedyne czasopismo, gdzie publikowane są wiarygodne dane o tym, że opisany gatunek jest nowy. Nakłada to na radę wydawniczą trudny obowiązek weryfikowania poprawności przedstawianych przez autorów argumentów w świetle najnowszych ustaleń. Publikacja taka wymaga wypełnienia odpowiedniego protokołu i zastosowania się do szeregu ściśle określonych zasad [79]. Materiały te, oraz najnowsza edycja LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) [27] stały się źródłem informacji dotyczących taksonomii przedstawianej w tym artykule.

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 90-235 Łódź ul. Pomorska 137; 90-235 Łódź ul. Pomorska 137; tel./fax 42 677 93 00; e-mail: anna.kwaszewska@umed.lodz.pl

## 2. Postępy taksonomii rodzaju *Corynebacterium*

Rodzaj *Corynebacterium* zalicza się do rodziny *Corynebacteriaceae*, należącej do typu *Actinobacteriae* oprócz kilku innych rodzin, w tym *Mycobacteriaceae* i *Nocardiaceae*. Rodzina *Corynebacteriaceae* obejmowała niegdyś rodzaje *Corynebacterium*, *Listeria* i *Erysipelothrix* [60]. Następnie, według propozycji zarysu z 2004 roku dla nowego wydania *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [41] mieścił się w niej jedynie rodzaj *Corynebacterium*, a obecnie według aktualizacji z grudnia 2010 roku *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* [27] rodzina *Corynebacteriaceae* obejmuje cztery rodzaje: *Bacterionema*, *Caseobacter*, *Turicella* i *Corynebacterium*.

Rodzaj *Corynebacterium* utworzony został przez *Lehmana i Neumanna* w 1896 roku i wówczas obejmował *Corynebacterium diphtheriae*, odpowiedzialne za ciężką i często występującą wtedy chorobę błonicę oraz gatunki będące patogenami zwierzęcymi [27, 41, 57].

Początkowo znaczenie kliniczne przypisywano jedynie bezwzględnie chorobotwórczemu gatunkowi *C. diphtheriae*, który został scharakteryzowany w latach 80. XIX wieku. W tym okresie opisano również gatunek *C. pseudodiphtheriticum*, a w końcu lat 90. *C. xerosis*. W latach 70. ubiegłego stulecia coraz większe zainteresowanie zaczęły budzić gatunki wchodzące w skład fizjologicznej mikroflory człowieka, gdyż okazało się, że mogą one wywoływać zakażenia oportunistyczne.

Aktualnie, baza *J.P. E u z é b y*: *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* [27] obejmuje 108 gatunków *Corynebacterium*, z których 19 zostało przeklasyfikowanych do innych rodzajów. Baza *Taxonomic Outline*, opracowana przez zespół *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* z 2007 roku [42], wymienia 73 gatunki *Corynebacterium* oraz 14, głównie stanowiących patogeny roślinne, które zostały obecnie zaliczone do innych rodzajów (*Rhodococcus*, *Curtobacterium*, *Clavibacter*, *Arthrobacter*, *Rathayibacter*, *Tsukamurella*, *Arcanobacterium*). Spośród gatunków maczugowców ujętych w tej bazie, 25 zostało opisanych lub zreklasyfikowanych w latach 90. ubiegłego wieku, a 22 – w tym stuleciu. Od 2007 roku w *Int. J. Syst. Evoll Microbiol.* opisano kolejne 19 nowych gatunków. Ogółem, w ostatnich 20 latach, w obrębie rodzaju *Corynebacterium* umieszczono 66 nowych gatunków. W tabeli I zestawiono gatunki opisane w obecnym stuleciu.

## 3. Metody wykorzystywane w identyfikacji, taksonomii i typowaniu pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*

### 3.1. Metody genotypowe

Identyfikacja maczugowców stanowi dla bakteriołógów klinicznych jedno z najtrudniejszych zadań. Wykorzystanie biologii molekularnej dla badania DNA tych

Tabela I

Gatunki *Corynebacterium* opisane po 2000 roku

Gatunki izolowane od ludzi	Gatunki izolowane od zwierząt	Gatunki izolowane ze środowiska
<i>C. simulans</i> , 2000 [86]	<i>C. auriscanis</i> , 2000 [21]	<i>C. casei</i> , 2001 [10]
<i>C. freneyi</i> , 2001 [66]	<i>C. capitovis</i> , 2001 [19]	<i>C. mooreparkense</i> ** <sub>2001</sub> [10]
<i>C. appendices</i> , 2002 [96]	<i>C. felinum</i> , 2001 [20]	<i>C. efficiens</i> , 2002 [32]
<i>C. aurimucosum</i> , 2002 [95]	<i>C. testudinoris</i> , 2001 [20]	<i>C. glaucum</i> , 2003 [93]
<i>C. atypicum</i> , 2003 [47]	<i>C. aquilae</i> , 2003 [29]	<i>C. halotolerans</i> , 2004 [15]
<i>C. tuberculostearicum</i> , 2004 [31]	<i>C. sphenisci</i> , 2003 [46]	<i>C. doosanense</i> , 2009 [54]
<i>C. resistens</i> , 2005 [63]	<i>C. spheniscorum</i> , 2003 [45]	<i>C. lubricantis</i> , 2009 [49]
<i>C. tuscaniense</i> , 2006 [69]	<i>C. suicordis</i> , 2003 [83]	<i>C. maris</i> , 2009 [4]
<i>C. hansenii</i> , 2007 [67]	<i>C. caspium</i> , 2004 [18]	<i>C. humireducens</i> , 2010 [89]
<i>C. ureicelerivorans</i> , 2007 [91]	<i>C. ciconiae</i> , 2004 [30]	<i>C. nuruki</i> , 2010 [72]
<i>C. sputi</i> , 2008 [94]	<i>C. ulceribovis</i> , 2009 [92]	<i>C. marinom</i> , 2010 [24]
<i>C. canis</i> , 2009 [33]	<i>C. mustelae</i> , 2010 [35]	
<i>C. freiburgense</i> , 2009 [36]		
<i>C. massiliense</i> , 2009 [59]		
<i>C. timonense</i> , 2009 [59]		
<i>C. pilbarensense</i> , 2010 [2]		
<i>C. pyruviciproducens</i> , 2010 [80]		
<i>C. stationis</i> , 2010 [7]		

\* synonim *C. aurimucosum* – *C. nigricans* [23]\*\* nazwa *C. mooreparkense* została w 2005 roku uznana za synonim *C. variable*, w związku z czym nie została ujęta w bazie z 2007 roku dla II wydania *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [43]

bakterii okazało się nie tak pomocne jak zakładano. Analiza genetyczna podjednostki 16S rRNA lub genu ją kodującego w przypadku drobnoustrojów należących do rodzaju *Corynebacterium* nie daje wyników porównywalnych z innymi rodzajami bakterii. Wykazuje bowiem stosunkowo niski polimorfizm. W ramach 1500 nukleotydowej sekwencji wykryto fragmenty stanowiące narzędzie dla identyfikacji, jednak nie jednoznacznej dla wszystkich gatunków w jednakowym stopniu. T a n g i wsp. [75] zaproponowali identyfikację wewnątrz rodzaju *Corynebacterium* i rodzajów pokrewnych na podstawie zestawu MicroSeq 500 16S (Perkin-Elmer Biosystems), który daje możliwość sekwencjonowania pierwszych 527 par zasad genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Autorzy otrzymali satysfakcjonujące wyniki w przypadku 27 spośród 42 badanych izolatów klinicznych maczugowców. Prawidłowo zidentyfikowano wszystkie izolaty *Corynebacterium jeikeium* i *C. diphtheriae*, ale dla innych gatunków tego rodzaju skuteczność metody wynosiła tylko 50%. W obrębie innych rodzajów: *Arthrobacter*, *Brevibacterium* i *Microbacterium* wyniki były bardzo dobre. Osiągnięto identyfikację do gatunku, co nie było możliwe metodami fenotypowymi. Sekwencjonowanie wskazanego przez T a n g a i wsp. [75] fragmentu, choć kosztowne, pozwoliło na wykonanie badania w czasie 18 godzin. Problem identyfikacji gatunków w obrębie rodzaju *Corynebacterium* okazał się jednak nadal nie rozwiązany. Podjęto zatem próby poszukiwania innych konserwatywnych sekwencji w genomie jego przedstawicieli.

W 2004 roku K h a m i s i wsp. [50] zaproponowali użycie, jako markera filogenetycznego i identyfikacyjnego dla *Corynebacterium*, genu *rpoB* kodującego podjednostkę beta polimerazy RNA. Analiza sekwencji genu *rpoB* była przydatna w badaniach nad innymi taksonami: *Bartonella*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Legionella* i dobrze się sprawdzała przy różnicowaniu drobnoustrojów wykazujących wysoki stopień podobieństwa genetycznego. Licząca około 3500 par zasad sekwencja *rpoB* maczugowców była silniej zróżnicowana niż sekwencja 16S rRNA, a mimo to drzewa pokrewieństwa filogenetycznego zbudowane na podstawie obu sekwencji dla dobrze scharakteryzowanych gatunków okazały niemal identyczne [51]. Pozwoliło to na wykorzystywanie analizy genu *rpoB* w identyfikacji i opisywaniu nowych gatunków *Corynebacterium*.

Poszukiwanie fragmentów sekwencji pozwalających na różnicowanie wewnątrz rodzaju *Corynebacterium* doprowadziło do odkrycia ich, podobnie jak u innych bakterii, w DNA przestrzeni międzygenowej genów kodujących podjednostki 16S i 23S rybosomów (16S-23S rRNA intergenic spacer) [66]. Obszary te badane są przy wykorzystaniu ITS-PCR (Internally Transcribed Spacer PCR) lub RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Funke i Frodl [34] analizując prze-

strzeń międzygenową 16S i 23S rRNA z zastosowaniem RFLP odróżnili szczepy należące do gatunków *C. xerosis* i *C. freneyi*, które na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA zaliczono by do jednego gatunku.

Opisywanie nowych gatunków maczugowców czy ich późniejsza identyfikacja oparte są także na bardzo czulej metodzie, jaką jest hybrydyzacja DNA-DNA. Analiza sekwencji pełnych genomów wskazuje, że określony jako minimum 70% dla szczepów jednego gatunku stopień hybrydyzacji odpowiada 95% homologii nukleotydów (ANI – Average Nucleotide Identity) ich DNA. Metoda ta jest bardziej czuła niż opisane wcześniej analizy genów o wysokiej konserwatywności. W przypadku nowo opisanego gatunku *C. hansenii* metody takie, jak analiza sekwencji 16S rRNA, *rpoB* czy badanie profilu przestrzeni międzygenowej 16S-23S rRNA nie pozwoliły na wydzielenie tego odmiennego fenotypowo gatunku od gatunków blisko spokrewnionych. Osiągnięto to dopiero stosując hybrydyzację DNA-DNA [67]. Podobnym przykładem może być również, opisany w 2010 roku gatunek *C. pilbarensis* nieodróżnialny na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA od scharakteryzowanych gatunków, a na podstawie hybrydyzacji DNA-DNA uznany za odrębny [2]. Wewnątrz rodzaju *Corynebacterium*, pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami maczugowców stopień hybrydyzacji DNA-DNA może wskazywać na ich podobieństwo. Wynik ten nie zawsze pokrywa się z badaniami konserwatywnych fragmentów genomu, np. pomiędzy *C. hansenii* a *C. xerosis*, *C. freneyi* i *C. amycolatum* wynik hybrydyzacji DNA-DNA to odpowiednio 47%, 40% i 15%. Tymczasem według analizy genu *rpoB*, *C. hansenii* najbliższym spokrewnionym jest z *C. freneyi* a nie *C. xerosis* [67]. Genom *C. resistens* z genomem najbliższym spokrewnionego gatunku *C. auriscanis* wykazuje tylko 23,1% homologii [63].

Zarówno sekwencjonowanie genów, jak i hybrydyzacja DNA to metody bardzo przydatne do charakterystyki nowych gatunków i identyfikacji w laboratoriach referencyjnych. Ciągłe jednak poszukuje się nowych markerów genetycznych, które byłyby specyficzne gatunkowo i pozwalałyby na konstrukcję sond genetycznych umożliwiających wiarygodną identyfikację gatunków *Corynebacterium* w laboratoriach mikrobiologicznych. L e t e k i wsp. [55] zaproponowali identyfikację *C. amycolatum* na podstawie amplifikacji genu *divIVA* odpowiedzialnego za podział komórki, z użyciem PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Metoda ta pozwala na odróżnienie tego gatunku od innych blisko spokrewnionych: *C. striatum*, *C. minutissimum* i *C. xerosis*. [55]. Metody oparte na biologii molekularnej, np. typowanie RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) okazały się w przypadku maczugowców przydatne w dochodzeniach epidemiologicznych. B r a n d e n b u r g i wsp. [9] poszukiwali dowodu przenoszenia *C. striatum* między pacjentami na oddziałach intensywnej opieki medycznej.



RAPD i profil antybiotykowrażliwości pozwoliły potwierdzić, że izolaty wywołujące ciężkie zakażenia były tym samym szczepem i były identyczne z tymi izolowanymi od personelu i ze środowiska szpitalnego.

Dla typowania wewnątrzgatunkowego bakterii wykorzystuje się również MLST (Multi Locus Sequence Typing), metodę polegającą na analizie fragmentów kilku (5–7) wybranych genów ważnych dla ich metabolizmu bakterii. W typowaniu maczugowców po raz pierwszy metoda ta została wykorzystana w 2008 roku przez E g u c h i i wsp. [26] w analizie pokrewieństwa w obrębie *C. macginleyi*. Autorzy, opierając się na wynikach otrzymanych na podstawie sekwencjonowania genomów *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens* i *C. jeikeium* wybrali 7 konserwatywnych genów. Były to geny kodujące kinazę adenylową (*adk*), białko inicjujące replikację (*dnaA*), hydratyzę fumaranową (*fumC*), syntazę cytrynianową typ II (*gltA*), podjednostkę beta gyrazy DNA (*gyrB*), dehydrogenazę izocytrynianową (*icd*) i syntetazę adenylbursztynianową (*purA*). Dyskryminacyjność otrzymanych wyników była porównywalna z otrzymanymi przy zastosowaniu RAPD. Dostępne handlowo zestawy do typowania *C. diphtheriae* metodą MLST oparte są na analizie: sekwencji pochodzących z genów kodujących łańcuch alfa syntazy ATP (*atpA*), podjednostkę alfa polimerazy III DNA (*dnaE*), białka opiekuńcze (*dnaK*), czynnika elongacji G (*fusA*), syntazę 2-isopropylolabłczanową (*leuA*), dehydrogenazę 2-ketoglutaranową E1 i E2 (*odhA*), oraz proponowaną wcześniej przez K h a m i s i wsp. [50] podjednostkę beta polimerazy RNA (*rpoB*) [65].

Podobnie jak inne drobnoustroje, maczugowce stały się także obiektem badania pełnej sekwencji ich materiału genetycznego. Uzyskano w ten sposób dane, które w znacznym stopniu poszerzyły wiedzę na temat tych bakterii, chociaż nie rozwiązały problemów taksonomicznych [13, 77, 78]. Baza danych PubMed zawiera informacje o 13 ukończonych projektach sekwencjonowania genomu szczepów *Corynebacterium* spp. Dotyczą one głównie gatunków ważnych z punktu widzenia biotechnologicznego: *C. glutamicum* ATCC 13032 (3,3 Mpz), *C. glutamicum* R (3,35 Mpz) i *C. efficiens* YS-314 (3,22 Mpz). Zsekwencjonowano także DNA gatunków najważniejszych klinicznie: *C. diphtheriae* NCTC 13129 (2,49 Mpz), *C. jeikeium* K411 (2,51 Mpz) i *C. urealyticum* DSM7109 (2,4 Mpz), *C. aurimucosum* ATCC 700975 (2,83 Mpz), *C. kroppenstedtii* DSM 44385 (2,4 Mpz). Znane są także pełne sekwencje odwziewających gatunków *C. pseudotuberculosis* 1002 (2,3 Mpz), *C. pseudotuberculosis* C231 (2,3 Mpz), *C. pseudotuberculosis* I19 (2,3 Mpz) i *C. pseudotuberculosis* FRC41 (2,3 Mpz). Prowadzone są badania nad sekwencjonowaniem materiału genetycznego gatunków: *C. accolens*, *C. ammoniagenes*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. glucuronolyticum*, *C. lipophiloflavum*,

*C. atruchotii*, *C. resistens*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum*, a także *C. genitalium* i *C. pseudogenitalium* niemających statusu gatunku oraz gatunków izolowanych od zwierząt *C. variabile*, *C. bovis*.

Tworzona na markerach genetycznych taksonomia maczugowców ulega ciągłym zmianom i można spodziewać się, że zebranie pełnego zestawu sekwencji szczepów typowych (wzorcowych), na podstawie, których opisano poszczególne gatunki, stworzy szansę na konstrukcję bardziej jednoznacznych i uniwersalnych genetycznych testów identyfikacyjnych.

### 3.2. Metody fenotypowe: morfologia, chemotaksonomia, właściwości biochemiczne

W przypadku maczugowców, zarówno przy tworzeniu taksonomii, jak i przy ich identyfikacji, bardzo szeroko korzysta się z metod fenotypowych. W przypadku ustalania przynależności do rodzaju zwraca się uwagę na chemotyp ściany komórkowej i obecność krótkołańcuchowych kwasów mikolowych. Diagnostyka do poziomu gatunku wymaga wykonania dużej liczby reakcji biochemicznych, a także użycia dodatkowych technik chemotaksonomicznych. Jednak niekwestionowane autorytety w dziedzinie badań nad *Corynebacterium* spp., np. zespół Funkego, zwracają uwagę na ogromne znaczenie identyfikacji tych bakterii opartej na tych właśnie metodach. Istotna jest morfologia kolonii bakteryjnych (barwa, wielkość, kształt, konsystencja, zapach, otoczenie wokół kolonii), a także morfologia komórek. Barwienie metodą Grama pozwala, między innymi, na odróżnienie ich od szybkorosnących bakterii kwasoopornych [37]. Oprócz typowych dla maczugowców układów popodziałowych, komórki niektórych gatunków mogą mieć kształt „bicza”, np. *C. matruchotii*, lub wykazywać charakterystyczny układ popodziałowy komórek, jak koła ze szprychami (spoke-wheel), np. *C. freiburgense* [36]. Odpowiednie barwienie, np. metodą Neissera, pozwala na wykrycie obecnych w komórkach, typowych dla tego rodzaju ziarnistości metachromatycznych. W opisie nowych gatunków, a także w identyfikacji *Corynebacterium* spp. brane są pod uwagę liczne cechy. Sprawdza się wymagania atmosferyczne hodowli, typ metabolizmu (tlenowy czy fermentacja), a także wiele cech biochemicznych, które przedstawiono w tabeli II. W identyfikacji niektórych gatunków istotny jest również wynik testu synergistycznej hemolizy – CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen).

Gotowe zestawy do identyfikacji, np. Api Coryne, API ZYM, Biotype 100 (test asymilacji źródeł węgla) (bioMérieux) czy RapID CB Plus System (Remel Inc.) pozwalają na skrócenie czasu oczekiwania na wynik. Ich bazy danych nie są jednak wystarczająco szybko uaktualniane i nie uwzględniają zmian w taksonomii, w tym danych nowo opisanych gatunków.



Tabela II

Cechy metaboliczne brane pod uwagę w identyfikacji i opisie nowych gatunków *Corynebacterium* spp. [31, 37, 63, 86, 91]

ZAPOTRZEBOWANIE NA: lipidy
PODSTAWOWA AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA: katalaza, oksydaza, ureaza, nitroreduktaza,
AKTYWNOŚĆ SACHAROLITYCZNA – wytwarzanie kwasu z: glukozy, rybozy, ksylozy, arabinozy, glicerolu, glikogenu, inuliny, laktozy, maltozy, mannitolu, sorbitolu, sacharozy, trehalozy, i rafinozy wytwarzanie acetoiny
HYDROLIZA: Tween 80, hipuranu, eskuliny i żelatyny,
AKTYWNOŚĆ INNYCH ENZYMÓW: fosfataza alkaliczna i kwaśna, arylamidaza leucyny, waliny, cystyny, leucyny i pirolidonylu, pirazynamidaza, dihydrolaza argininy, esterazy C4 i C8, glukozydaza, galaktozydaza, N-acetylo-b-glukozaminidaza, mannozydaza, α-fukozydaza.

W latach 2001–2003 B o h n e r i wsp. [8] opracowali metodę polegającą na wszechstronnej analizie fenotypu badanego drobnoustroju, którą nazwali Phenotype Micro Arrays (PM) (Biolog Inc.). Ten zautomatyzowany system pozwala na wykrycie 1920 cech fenotypowych. Są to: zdolność wykorzystywania 190 źródeł węgla, 380 źródeł azotu i 95 źródeł fosforu i siarki. Próby obejmują również badanie metabolicznych szlaków biosyntezy, wpływ pH, ciśnienia osmotycznego i różnych jonów na metabolizm komórki (każde badanie w około 100 testach) oraz ocenę wrażliwości na 240 związków chemicznych (każdy w czterech stężeniach). Ocena metabolizmu komórki opiera się na pomiarze jej aktywności oddechowej w określonych warunkach wyrażonej zdolnością redukcji barwnika tetrazoliowego. Według autorów przy zastosowaniu systemu PM możliwa jest identyfikacja bakterii oraz drożdży i grzybów nitkowatych. System ten uwzględnia również identyfikację bakterii z rodzaju *Corynebacterium*. Baza danych obejmuje 57 gatunków *Corynebacterium* – głównie patogenów ludzi i zwierząt, wśród których 9 opisanych w obecnym stuleciu. Autorzy proponują ułatwione podejście do opisu nowych gatunków: od fenotypu do genotypu. Wstępem do odkrycia nowego gatunku jest izolacja szczepu różnego od znanych w systemie PM. Rodzaje różnic fenotypowych wskazują miejsce poszukiwań różnic w genomie. Kolejnym etapem są badania chemotaksonomiczne i analiza porównawcza materiału genetycznego, która może potwierdzić pojawienie się nowego gatunku. Analiza aktywności życiowej komórek w zróżnicowanych warunkach stanowić może zatem istotne narzędzie w identyfikacji drobnoustrojów, czy w dochodzeniach epidemiologicznych, ale również w pracach nad opisywaniem nowych gatunków. Być może, ten nowy szybko rozwijający się automatyczny system stanowi szansę na poprawę możliwości identyfikacji maczugowców.

Badania chemotaksonomiczne odgrywają ważną rolę w identyfikacji maczugowców. Wśród nich najważniejsze to: profil komórkowych kwasów tłuszczowych, ultrastruktura i chemiczny skład ściany komórkowej. Jeden z podstawowych elementów przy opisie nowych gatunków wszystkich bakterii, jakim jest udział procentowy zasad G+C mol% w DNA, w przypadku maczugowców

nie daje możliwości przestrzegania kryteriów przyjętych dla innych rodzajów. U bakterii należących do jednego rodzaju, G+C mol% powinien różnić się nie więcej niż o 10%, a u szczepów należących do jednego gatunku – o 3%. Rodzaj *Corynebacterium* ma wysoką zawartość G+C, mieszczącą się w szerszych granicach od 51 do prawie 66 mol%. U gatunków *C. afermentans* i *C. auris* wartość ta jest wyższa niż 65 mol% [50], a u nowo opisanego – *C. appendicis* wynosi 65,8 mol% [96]. Dlatego kryterium to nie jest wartościową cechą przy ustalaniu przynależności do rodzaju. W zaklasyfikowaniu nowego izolatu do rodzaju *Corynebacterium* istotne znaczenie ma skład ściany komórkowej. Rodzaj ten ma bowiem specyficzną budowę tej struktury. Zawiera ona cukry – arabinozę i galaktozę (arabinogalaktan), kwas mezo-diaminopimelinowy (meso-DAP), unikatowe niskocząsteczkowe alfa-alkilo-beta-hydroksy-długołańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwasy korynemikolowe oraz dwuwodorowe menachinony z 8 lub 9 jednostkami izoprenu: MK-8 (H2), MK-9 (H2) a także fostatydyloinozytol [22, 37, 60]. Wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) kwasów mikolowych w ścianie komórkowej ma istotne znaczenie w odróżnianiu *Corynebacterium* spp. od innych rodzajów (*Corynebacterium* – C<sub>22</sub>-C<sub>38</sub>, *Rhodococcus* – C<sub>34</sub>-C<sub>64</sub>, *Nocardia* – C<sub>44</sub>-C<sub>60</sub>, *Mycobacterium* – C<sub>60</sub>-C<sub>90</sub>) [11]. Przy zastosowaniu tej metody wśród przedstawicieli rodzaju są jednak także odstępstwa, które należy brać pod uwagę. Niektóre gatunki maczugowców nie zawierają w ścianie kwasów korynemikolowych. Są to: *C. kroppenstedtii*, *C. amycolatum* czy *C. atypicum* [47]. Przy analizie obecności charakterystycznych dla rodzaju cukrów ściany komórkowej: arabinozy i galaktozy opisano gatunki zawierające tych cukrów znacznie mniej niż to przyjęto dla całego rodzaju, np. *C. simulans* [86]. W przypadku szczepów lipofilnych składniki podłoża, konieczne wobec braku u nich syntazy kwasów tłuszczowych, mogą wpływać na obecność i budowę kwasów korynemikolowych [77].

Maczugowce od innych spokrewnionych rodzajów bakterii można odróżnić w oparciu o analizę komórkowych kwasów tłuszczowych (CFA – Cellular Fatty Acid) za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej [5].

Komórkowe kwasy tłuszczowe w przypadku większości gatunków maczugowców są nasycone lub jednonienasycone i nierozgałęzione. Pozwala to odróżnić je od rodzajów zawierających rozgałęzione kwasy tłuszczowe takich jak *Brevibacterium*, *Rothia* czy *Listeria*. Także i tu są wyjątki. Dotyczą one *C. bovis* i *C. urealyticum* [90]. Metoda ta jest stosowana głównie w laboratoriach referencyjnych i stanowi narzędzie pomocnicze [5]. Zawartość kwasów tłuszczowych w komórkach gatunków *Corynebacterium* spp. zależy od warunków hodowli (np. dodatek związków tłuszczowych niezbędnych do wzrostu gatunków lipofilnych), a wiele z nich ma podobny profil tych kwasów. Metoda ta jest mało przydatna w odróżnianiu gatunków [74]. Van der Velde i wsp. [84] twierdzą jednak, że mała użyteczność analizy komórkowych kwasów tłuszczowych w różnicowaniu gatunkowym w obrębie rodzaju *Corynebacterium* wynika z nieaktualnych baz danych. Autorzy zaproponowali własną bazę danych, na podstawie której udało się im przypisać do gatunku 29 spośród 34 badanych izolatów. Niektóre gatunki jak *C. pseudotuberculosis* cechuje heterogenność profilu komórkowych kwasów tłuszczowych. Cechą charakterystyczną niektórych gatunków jest występowanie kwasu tuberkulostearynowego. Początkowo jego obecność przypisywana była jedynie szczepom należącym do „*C. tuberculostearicum*”. Z czasem jednak opisano zdolność wytwarzania tego kwasu przez inne gatunki, jak *C. urealyticum*, *C. mucifaciens*, *C. minutissimum*, *C. singulare*, *C. confusum*, a także przez niedawno opisane *C. aurimucosum*, *C. appendicis*, *C. ureicelerivans*, co pozwala odróżnić je od pozostałych [84, 91, 96].

Niektóre gatunki rodzaju *Corynebacterium* można zidentyfikować określając skład fosfolipidów metodą chromatografii cienkowarstwowej [61] lub stosując zaawansowane techniki analizy chemotaksonomicznej jak na przykład FAB-MS (Fast-Atom Bombardment) i ESI-MS (Electrospray Ionization). Zastosowanie FAB-MS pozwala na odróżnienie gatunków na podstawie acylowanych podstawników dołączonych do kwasów tłuszczowych [90]. Precyzyjną metodą jest badanie składu chemicznego całej komórki poddanej pirolizie metodami spektrometrii i chromatografii. Voisin i wsp. [85] zaproponowali opartą na pirolizie chromatografię gazową (Pyrolysis-Gas Chromatography), a następnie za pomocą emisji atomowej (Atomic Emission Detection – AED) dokonali identyfikacji *C. amycolatum* i spokrewnionych gatunków: *C. striatum*, *C. minutissimum*, *C. xerosis* i *C. frenyi*. Metody te nie są wprawdzie stosowane rutynowo w diagnostyce, ale stanowią precyzyjne narzędzie poznawcze.

W przypadku maczugowców podobieństwo fenotypowe często nie daje się potwierdzić podobieństwem genotypowym, a czasem i odwrotnie. Riegel i wsp. [70] porównując i grupując szczepy kliniczne maczugowców tworzyli „genomogatunki”. Cechy fenotypowe

(biotypy) szczepów wchodzących w ich skład, często nie potwierdzały wyników tych grupowań. Badacze ci nawet wśród wzorcowych szczepów zaklasyfikowanych na podstawie właściwości fenotypowych do gatunku *C. jeikeium* notowali takie zróżnicowanie genetyczne, które mogłoby tę przynależność poddawać w wątpliwość [68]. W obrębie rodzaju *Corynebacterium* występują jeszcze z pewnością nowe gatunki, albo podgatunki, które wraz z postępem wiedzy znajdą swoje właściwe miejsce w taksonomii. Wyzwaniem są tu, między innymi, szczepy klasyfikowane obecnie do tzw. „grup CDC”. W 1981 roku w Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób w Atlancie (Center for Disease Control and Prevention USA) zajęto się opisywaniem i systematyzowaniem szczepów bakterii o cechach nieformalnej grupy „coryneform” (Maczugowate). Grupa ta obejmuje szereg rodzajów bakterii o podobnej morfologii mikroskopowej i niektórych cechach fizjologicznych. Zaliczano do niej różne rodzaje, oprócz *Corynebacterium* również *Brevibacterium*, *Turicella*, *Rothia* i kilka innych rodzajów [37]. Obecnie odchodzi się już od wyróżniania tej grupy. Jednak zgromadzona w laboratorium w Atlancie kolekcja szczepów typowych dla poszczególnych grup CDC oznaczanych literami i czasem cyframi (np. CDC Coryneform group?), nadal jest w użyciu. Wiele szczepów tej kolekcji stało się podstawą opisu nowych gatunków, czasem odległych rodzajów, np. wśród maczugowców *Corynebacterium* grupa CDC JK to obecnie *C. jeikeium*. Wiele szczepów określanych jako „grupa CDC” mimo scharakteryzowania nie może jeszcze uzyskać statusu gatunku, a czasem nawet przypisania do określonego rodzaju. Pomocne z pewnością okażą się najnowsze bazy danych i narzędzia do ich porządkowania (np. SILVA i ARB) po wprowadzeniu do nich sekwencji ich genomów.

#### 4. Konsekwencje trudności w identyfikacji pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*

Problemy w identyfikacji maczugowców nakazują z ostrożnością podchodzić do cech klinicznych i zdolności wywoływania określonych zakażeń przypisywanych poszczególnym ich gatunkom, szczególnie jeśli ich opis i charakterystyka kliniczna pojawiły się dawno. Przykładem może być *C. xerosis*, jeden z najwcześniej, bo w 1899 roku, opisanych gatunków [27]. Przypisywano mu udział w obejmujących wiele narządów zakażeniach u chorych z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego [53]. Tymczasem Funke i wsp. [37, 38] twierdzą, że zakażenia tym gatunkiem są niezwykle rzadkie, a szczepy *C. xerosis* były i są mylone podczas identyfikacji biochemicznej z blisko spokrewnionymi *C. amycolatum* i *C. striatum*. Wraz z rozwojem metod stosowanych w dochodzeniach taksonomicznych opisano liczne nowe gatunki, które będąc spokrewnione z gatunkami

opisanymi wcześniej, mogły być przyczyną błędnych wniosków dotyczących ich chorobotwórczości. Tym samym obecnie trudno z całą stanowczością twierdzić, że niektóre gatunki są bardziej chorobotwórcze niż inne. Dysponujemy bowiem ograniczonymi lub niepewnymi danymi z laboratoriów prowadzących diagnostykę mikrobiologiczną.

### 5. Nowe gatunki *Corynebacterium* izolowane od ludzi

W rozdziale tym zamieszczono opis nowo opisanych gatunków, które izolowano z materiału od ludzi i scharakteryzowano w ostatnich 10 latach, a które mogą okazać się ważne ze względów klinicznych. W wielu przypadkach opublikowany opis nie dostarcza wystarczają

cych danych, które pozwalałyby na ich fenotypową identyfikację. Wszystkie wymienione tu gatunki uwzględnione są w spisie gatunków według E u z é b y' e g o [27], ale jeszcze nie wszystkie znalazły się w szkicu – filogenetycznym drzewie skonstruowanym dla potrzeb piątego tomu II wydania *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [42, 57]. Właściwości biochemiczne tych szczepów przedstawiono w tabeli III.

W 2001 roku opisano nowy gatunek spokrewniony z *C. xerosis* i *C. amycolatum* – *C. freneyi*. Szczepy dla niego typowe wyizolowano z trzech próbek materiału klinicznego: ropy pobranej z palca stopy, z owrzodzenia żylaka i z przetoki podskórnego ropnia [66]. Początkowo, te nielipofilne maczugowce, na podstawie cech biochemicznych, zostały zidentyfikowane jako *C. xerosis*. Jednak badania oparte na porównaniu

Tabela III

Podstawowe właściwości gatunków maczugowców opisanych w ciągu ostatnich dziesięciu lat [2, 7, 14, 31, 33, 36, 47, 59, 63, 66, 67, 69, 80, 86, 91, 94–96]

Cecha	<i>C. simulans</i>	<i>C. freneyi</i>	<i>C. appendicis</i>	<i>C. aurimucosum</i>	<i>C. atypicum</i>	<i>C. tuberculostrictum</i>	<i>C. resistens</i>	<i>C. tuscanense</i>	<i>C. hansenii</i>	<i>C. ureticulivorans</i>	<i>C. sputi</i>	<i>C. canis</i>	<i>C. freiburgense</i>	<i>C. massiliense</i>	<i>C. timonense</i>	<i>C. pilbarensis</i>	<i>C. pyruviciproducens</i>	<i>C. stationis</i> *
Liczba szczepów typowych w CCUG	3	10	1	6	1	25	1	1	1	6	1	1	1	4	2	1	7	1
Lipofilność	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	bd	-	-	bd	bd	-	bd	-
Redukcja azotanów	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Pirazynoamidaza	V	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Arylamidaza pirolidonylu	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Fosfataza alkaliczna	+	+	+	-	-	V	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	V	V
Beta-glukuronidaza	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Beta-galaktozydaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Alfa-glukozydaza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
N-acetylo-beta-glukozaminidaza	-	-	-	-	-	v/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydroliza eskuliny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	V	-
Ureaza	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Hydroliza żelatyny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentacja glukozy	+	+	(+)	+	+	+	-	+	+	V	V	+	+	-	-	+	V	V
Fermentacja rybozy	V	+	-	-	+	+	-	-	+	W	-	-	+	-	-	-	V	V
Fermentacja ksylozy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentacja mannitolu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentacja maltozy	-	+	(+)	+	+	V	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Fermentacja laktozy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Fermentacja sacharozy	+	+	-	+	+	V	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	V	-
Fermentacja glikogenu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ – reakcja dodatnia; (+) reakcja dodatnia po 7 dniach inkubacji; w – słaba reakcja dodatnia; v – wynik reakcji zmienny;

- – wynik reakcji ujemny; bd – autorom nie udało się uzyskać danych w dostępnych źródłach

\* – opisane jeszcze jako *Brevibacterium stations* – przeklasyfikowane do *Corynebacterium* spp. w 2010 roku

CCUG – kolekcja Culture Collection, University of Göteborg, Sweden [14]



przestrzeni międzygenowej 16S-23S, sekwencjonowaniu rRNA (rDNA) oraz hybrydyzacji DNA-DNA pozwoliły na zaliczenie wyizolowanych szczepów do innego, nowego gatunku. Samo badanie homologii 16S rRNA nie pozwoliło na odróżnienie *C. freneyi* od *C. xerosis*, a umożliwiło to dopiero badanie homologii sekwencji genu *rpoB*. *C. reneyi* jest blisko spokrewniony z *C. xerosis*, a w dalszej kolejności z *C. amycolatum*. Gatunki te są często mylone wtedy, gdy identyfikacja oparta jest tylko na cechach biochemicznych [37, 38]. Drobnoustroj izolowano później z licznych materiałów klinicznych. A u z i a s i wsp. [3] wyhodowano go z krwi pacjenta poddanego zabiegowi chirurgii naczyniowej. Opisany szczep był wrażliwy na amoksycylinę. W 2008 roku F u n k e i wsp. [34] scharakteryzowali 18 nowych, izolowanych od ludzi szczepów należących do *C. freneyi*. Wyodrębniono je z ropy, owrzodzenia żyłaków, z pochwy, szyjki macicy, jądra, ucha zewnętrznego, biopłynu dwunastnicy oraz moczu. Szczepy te były wrażliwe na antybiotyki beta-laktamowe, często jednak odporne na erytromycynę. A l b æ k i wsp. [1] wyizolowali również patogenne szczepy *C. freneyi* od zwierząt – z zakażeń ucha zewnętrznego u psów.

Gatunkiem blisko spokrewnionym z *C. xerosis*, a także *C. freneyi* jest *C. hansenii*. Został on opisany w 2007 roku przez R e n a u d a i wsp. [67]. Sekwencje 16S rRNA, a także *rpoB* oraz profil przestrzeni międzygenowej 16S-23S nie odróżniają go od tych dwóch gatunków. O jego wyodrębnieniu zadecydowały wyniki hybrydyzacji DNA-DNA. Szczep, który stał się wzorcem tego gatunku wyizolowano z tłuszczako-mięsaka. Wykazywał wrażliwość na większość antybiotyków w tym beta-laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, glikopeptydy. Był odporny na fosfomicynę, pefloksacylinę i tetracyklinę.

Kolejny blisko spokrewniony z *C. freneyi*, *C. hansenii*, *C. xerosis*, *C. amycolatum* i odzwierzęcym *C. sphenisci* gatunek został opisany w roku 2008 przez Y a s s i n i S i e r i n g [94]. Został nazwany *C. sputi*, ponieważ był wyizolowany po raz pierwszy z płwociny chorego z zapaleniem płuc. Szczep różni się biochemicznie od innych gatunków i tworzy osobną linię w klastrze obejmującym wymienione gatunki pokrewne.

W 2002 roku Y a s s i n i wsp. [95] opisali nowy gatunek *C. aurimucosum* (syn. *C. nigricans*) charakteryzując dwa takie same genetycznie szczepy, z których jeden pochodził z krwi pacjenta z zapaleniem oskrzeli. Określono, że filogenetycznie gatunek ten najbliższym jest spokrewniony z *C. minutissimum*. Historia wyodrębnienia tego gatunku wskazuje, jak bardzo skomplikowany bywa proces ustalania taksonomii maczugowców i jak duże znaczenie mają badania porównawcze za pośrednictwem baz sekwencji DNA. W tym samym bowiem czasie, w 2001 i 2003 roku, S h u k l a i wsp. [73, 74] na podstawie cech 6 nielipofilnych szczepów *Corynebacterium* spp. wytwarzających czarny barwnik, opi-

sali nowy gatunek – *C. nigricans*. Szczepy pochodziły z układu moczowo-płciowego kobiet, u których wystąpiły poważne komplikacje w ciąży. Analiza 16S rRNA i porównanie z bazą danych GenBank wykazały podobieństwo opisanego przez nich gatunku ze szczepami opisanymi już w 1999 roku przez innych badaczy [76]. Jeden z tych szczepów również wytwarzał czarny barwnik i został wprowadzony do kolekcji CDC i zaliczony do grupy CDC 4. Równolegle, w 2002 roku B e r n a r d i wsp. [6] w pracy charakteryzującej 73 szczepy *Corynebacterium* spp. izolowane z materiału klinicznego poza Europą, opisali dwa szczepy nazwane przez nich *Corynebacterium-like*, podobne do opisanych w 2001 roku przez S h u k l a i i wsp. [74]. Wyodrębniono je z narządów płciowych – z owrzodzenia sromu oraz materiału z pochwy [6]. Szczepy te różniły się pod względem cech biochemicznych. W latach 1969–2004 laboratorium referencyjne CDC zgromadziło 63 szczepy, które wytwarzały nierozpuszczalny w wodzie, czarny barwnik. Izolowane były one głównie z materiału pochodzącego z żeńskich dróg moczowo-płciowych (82%), ale również z sutka, gardła, płwociny, oskrzeli oraz krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego noworodków. Wszystkie te szczepy zostały zaliczone do grupy CDC 4 – fermentujących pałeczek Maczugowatych (grupa CDC FCG4) [23]. Dopiero badania oparte na hybrydyzacji DNA-DNA pozwoliły na zaliczenie części szczepów do wariantu wytwarzającego czarny barwnik – *Rothia dentocariosa*, a pozostałe, na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA, do wariantu wytwarzającego czarny barwnik – *C. aurimucosum*. Okazało się więc, że *C. aurimucosum* i *C. nigricans* to jeden gatunek, dla którego pozostawiono wcześniej nadaną nazwę *C. aurimucosum*. Badania oparte na sekwencjonowaniu genu *rpoB* potwierdziły, że *C. aurimucosum* i *C. nigricans* są tym samym gatunkiem a ich nazwy synonimami [50, 51]. Opisano również szczepy *C. aurimucosum* niewytwarzające czarnego barwnika. Gatunek jest zatem niejednorodny pod tym względem. Nie wytwarzające barwnika szczepy izolowane były z ostrych i przewlekłych zakażeń kości i stawów [71], ze stopy cukrzycowej [44]. Stwierdzono również obecność tych drobnoustrojów w środowisku [25]. W 2010 roku T r o s t i wsp. [81] zsekwencjonowali genom szczepu *C. aurimucosum* izolowanego z wymazu z pochwy kobiety, u której nastąpiło poronienie. Badania te pozwoliły na scharakteryzowanie tego gatunku jako patogenu oportunistycznego o szczególnym powinowactwie do dróg rodnych. Wykazano, że za zdolność kolonizacji i zakażenia środowiska pochwy odpowiedzialne są fimbrie adhezyjne podobne strukturalnie do fimbrii SpaH u *C. diphtheriae*. Wykryto również gen *aap* kodujący białko, które może mieć znaczenie dla zdolności tworzenia biofilmów przez te bakterie (Bap), a także unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Okazało się także, że istotną rolę



w kolonizacji środowiska pochwy odgrywa wydzielany przez te bakterie charakterystyczny, nierozpuszczalny w wodzie czarny barwnik. Jego synteza kodowana jest na plazmidzie pET44827. Związek ten ułatwia kolonizację i chroni komórki przed niekorzystnym działaniem nadtlenu wodoru wytwarzanego przez bakterie kwasu mlekowego bytujące w pochwie jako mikroflora fizjologiczna [81]. Źródłem zakażenia jest prawdopodobnie przewód pokarmowy lub skóra [40, 58].

Większość nowych gatunków maczugowców to gatunki nielipofilne. Jednak według ogólnie przyjętej opinii, szczególna zdolność kumulowania genów oporności na antybiotyki dotyczy przede wszystkim maczugowców lipofilnych. Szczególnie często izolowane są *C. jeikeium* i *C. urealyticum*, które stanowią zagrożenie jako potencjalne patogeny alarmowe w szpitalach. W 2005 roku O t s u k a i wsp. [63] opisali nowy gatunek lipofilny *C. resistens*. Pięć izolatów, które były podstawą opisu gatunku wyizolowano z materiału klinicznego od ludzi: z krwi, aspiratu oskrzelowego oraz ropni od chorych z nowotworami. Okazały się one odporne na większość grup antybiotyków w tym beta-laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, chinolony i tetracykliny, a wrażliwe jedynie na glikopeptydy. Badania porównawcze oparte na sekwencjonowaniu 16S rRNA i hybrydizacji DNA-DNA wskazały, że nowy gatunek jest najbliższym spokrewnionym z *C. auriscanis* i *C. falsenii*. Jednak te są gatunkami nie wymagającymi do wzrostu substancji tłuszczowych i na ogół nie charakteryzowały się opornością na leki przeciwbakteryjne. W dalszej kolejności nowy gatunek wykazywał wysokie pokrewieństwo z lipofilnymi *C. jeikeium* i *C. urealyticum*.

W przypadku niektórych nowo opisanych gatunków maczugowców badanie ograniczone tylko do sekwencji 16S rRNA okazało się dobrym, wystarczającym narzędziem identyfikacyjnym. Wśród nich znalazł się nielipofilny gatunek *C. simulans*, scharakteryzowany w 2000 roku [86]. Jego opis, oparto na cechach trzech szczepów, które izolowano z ropnia stopy, z bioptatu węzła chłonного pachowego i czyraka. Ich kolonie przypominały *C. minutissimum* i *C. striatum*. Drobnoustroje te były odporne na antybiotyki. Badania chemotaksonomiczne wykazały skład ściany komórkowej typowy dla innych gatunków *Corynebacterium* spp., przy czym ilość galaktozy była mniejsza niż u innych wcześniej opisanych gatunków. Analiza 16S rRNA odróżniła izolowane szczepy od podobnych fenotypowo, co dało podstawę do opisu nowego gatunku. W 2002 roku B e r n a r d i wsp. [6] opisali kolejne dwa szczepy *C. simulans*, pochodzące z żółci i z krwi. Okazało się, iż drugi ze szczepów opisanych przez B e r n a r d a i wsp. nie wytwarzał katalazy. Nie spowodowało to jednak jego reklasyfikacji. Obecności tego gatunku została stwierdzona wśród mikroflory towarzyszącej zmianom zapalnym przyzębia [39]. Kolejny gatunek wyróżniony na podstawie sekwencji

16S rRNA – *C. appendicis* [96] to lipofilny, wytwarzający ureazę maczugowiec pochodzący z jamy otrzewnej pacjenta z ropnym zapaleniem wyrostka robaczkowego. W 2003 roku H a l l i wsp. [47] opisali *C. atypicum*. Opis oparli na cechach 5 nielipofilnych szczepów izolowanych z rany, nasienia, ropy i owrzodzenia żyłaka. Przeprowadzane przy identyfikacji maczugowców badania chemotaksonomiczne nie wykazały obecności w ich komórkach typowych dla rodzaju *Corynebacterium* kwasów korynemikolowych. Analiza 16S rRNA wykazała jednak, że bakterie te należą do rodzaju *Corynebacterium*. Mimo znacznych różnic fenotypowych, opisany gatunek spokrewniony jest z *C. kroppenstedtii*, również nie zawierającym kwasów korynemikolowych.

Złożona historia opisu nowego gatunku *C. tuberculostearicum* rozpoczęła się 20 lat przed jego ogłoszeniem. W 2004 roku F e u r e r i wsp. [31] opublikowali informacje o nowym gatunku opisanym na podstawie cech 9 szczepów, które pochodziły z różnego materiału klinicznego i żywności. Były one podobne do szczepów referencyjnych nie posiadających statusu gatunku „*C. tuberculostearicum*” i „*C. pseudogenitalium*”. Pierwszy został scharakteryzowany w 1984 roku przez B r o w n a i wsp. [12] jako wymagający lipidów maczugowiec pochodzący ze zmian leprotycznych (LDC – Leprosy-Derived Corynebacteria). Zawierał on kwas tuberkulostearynowy (10-metylooktadekanowy). Nie traktowano go jako prawdziwego gatunku, więc nazwę opatrzone cudzysłowem. Nie był on również uwzględniany w *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* do 2004 roku. Analiza porównawcza sekwencji 16S rRNA wykazała, że wszystkie izolaty, także „*C. pseudogenitalium*”, są ze sobą blisko spokrewnione i autorzy zaproponowali, aby nadać im rangę nowego gatunku *C. tuberculostearicum*. Gatunek ten jest lipofilny, najbliższym spokrewnionym z innymi lipofilnymi gatunkami *C. accolens* i *C. macginleyi*. Analiza oparta na sekwencji genu *rpoB* [51] wskazuje na najbliższe podobieństwo nowo opisanego gatunku *C. tuberculostearicum* do *Corynebacterium* grupa CDC G.

Kolejny nowy gatunek lipofilny – *C. ureicelerivorans* został opisany w 2007 roku [91]. Szczep tego gatunku został wyizolowany z krwi pacjenta z objawami sepsy. Analiza genu 16S rRNA pozwoliła określić najbliższe pokrewieństwo z *C. mucifaciens*, a w dalszej kolejności z obu podgatunkami *C. afermentans*.

Nowy nielipofilny gatunek – *C. tuscaniense* został scharakteryzowany w 2006 roku przez R i e g e l a i wsp. [28, 69]. Jego szczep wzorcowy, początkowo opisany jako *C. tuscaniae* został wyosobniony z krwi chorego na zapalenie wsierdzia. Pod względem właściwości biochemicznych gatunek wykazywał podobieństwo do *C. amycolatum*, jednak analiza chemotaksonomiczna wykazała obecność kwasów tłuszczowych, których *C. amycolatum* w ścianie komórkowej nie zawiera. Analiza genu kodującego podjednostkę 16S rRNA pozwoliła

na stworzenie nowej gałęzi w drzewie rodzaju *Corynebacterium*. Nowo opisany gatunek wykazuje największe podobieństwo do *C. appendicis*, a także *C. mucifaciens*, *C. riegelii* i *C. coyleae*.

W 2009 roku wyodrębniono i zaakceptowano, opisem w *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* cztery nowe gatunki, które pochodziły z materiału od ludzi. Były to *C. canis*, *C. freiburgense*, *C. massliense* i *C. timonense*. *C. canis* oraz *C. freiburgense* zostały opisane przez *Funkę* i *wsp.* [33, 36]. Oba izolaty, które stały się szczepami wzorcowymi dla tych gatunków pochodziły z ran po pogryzieniu przez psa. Analiza sekwencji genu 16S rRNA oraz fragmentu genu *rpoB* wskazała na duże pokrewieństwo filogenetyczne tych dwóch gatunków. Oba gatunki są nielipofilne i fenotypowo różnią się od innych gatunków *Corynebacterium* spp. *C. canis* ma nitkowate komórki o długości większej 15 µm, mogące się rozgałęziać na końcach. Na podłożu stałym tworzy wypukłe kolonie silnie związane z podłożem. Kolonie *C. freiburgense* również bardzo silnie przylegają do podłoża, a obraz mikroskopowy ze starszych hodowli przypomina koła ze szprychami.

*Merhej* i *wsp.* [59] podczas badania dwóch, różniących się od dotychczas poznanych szczepów maczugowców, opisali kolejne gatunki: *C. massliense* i *C. timonense*. Zostały one scharakteryzowane na bazie taksonomii polifazowej uwzględniającej morfologię mikro- i makroskopową, cechy biochemiczne, budowę ściany komórkowej, analizę sekwencji genu 16S rRNA oraz genu *rpoB*. Szczep wyizolowany z krwi pacjenta z zapaleniem wsierdza stał się wzorcem gatunku *C. timonense*. Gatunek ten okazał się najbliższym spokrewnionym z *C. auris*, *C. capitovis*, *C. lipophiloflavum* i *C. mycetoides*. Drugi szczep, izolowany z płynu stawu biodrowego pobranego od chorego z infekcją protezy ortopedycznej opisano jako *C. massliense*. Genetycznie gatunek ten okazał się najbliższym spokrewnionym z *C. maginleyi*, *C. accolens*, *C. tuberculostearicum*, a w dalszej kolejności z *C. confusum*, *C. mastitidis* i *C. renale*.

Rok 2010 przyniósł opisy trzech nowych gatunków wyizolowanych od ludzi: *C. pilbarensis*, *C. stationis* i *C. pyruviciproducens*. *C. pilbarensis* został opisany przez *Ara* i *wsp.* [2] na podstawie cech jednego szczepu pochodzącego z aspiratu z kostki. Drobnoustroj ten został wyhodowany na podłożu dla bakterii beztlenowych, ale analiza chemotaksonomiczna wykazała obecność krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych typowych dla rodzaju *Corynebacterium*. Homologia sekwencji genu 16S rRNA (99%) wskazywała na bardzo bliskie pokrewieństwo z opisanym *C. ureicelivivorans*, ale drobnoustroje te znacznie różniły się pod względem właściwości metabolicznych. Hybrydyzacja DNA-DNA pozwoliła na wykazanie istotnych różnic genetycznych (tylko 39,5% pokrewieństwo), co przesądziło o wydzieleniu nowego gatunku. Z kolei gatunek

*C. stationis* został zaproponowany przez *Bernarda* i *wsp.* [7]. Opis został stworzony na bazie dwóch szczepów izolowanych z kału niemowlęcia oraz reklasyfikacji dwóch szczepów należących do *Brevibacterium stationis* i *C. ammoniagenes*. Jest to pierwszy gatunek w obrębie rodzaju *Corynebacterium*, który ma zdolność rozkładu cytrynianu i alkalizowania podłoża.

*C. pyruviciproducens* opisali *Tong* i *wsp.* [80]. Szczep, który stał się wzorcem dla tego gatunku został wyizolowany z ropnia pachwiny. Analiza sekwencji 16S rRNA oraz części sekwencji genu *rpoB* wskazała na najbliższe pokrewieństwo z *C. glucuronolyticum*. Metodą hybrydyzacji DNA-DNA wykazano jednak niskie pokrewieństwo genetyczne z tym gatunkiem. Nowy gatunek różnił się także szeregiem cech fenotypowych, w tym zdolnością tworzenia kwasu pirogronowego, która dała podstawę nadania mu nazwy.

## 6. Podsumowanie

Wydzielanie nowych taksonów maczugowców oparte jest, w największym stopniu na wykazywaniu różnic w sekwencjach genomu. Podejście filogenetyczne ma niezaprzeczalne uzasadnienie. Porządkuje dotychczasowe wyniki i wyklucza niepotrzebne powtórzenia, gdyż niektóre gatunki, jak się okazało, były opisane pod różnymi nazwami, należącymi czasem do odległych taksonów. Klasyfikacja genetyczna okazuje się jednak nie w pełni doskonała. Ciągłe prowadzone są dyskusje na temat definicji gatunku. W kontekście taksonomii maczugowców są one szczególnie ważne. Sugeruje się bowiem, że podstawowe kryterium zaproponowane przez *Wayne* i *wsp.* [87] czyli tożsamość 70% sekwencji mierzonej hybrydyzacją DNA-DNA, jest zbyt mała, aby szczepy zaliczone do tego samego gatunku przedstawiały możliwe do przewidzenia podobieństwo cech fenotypowych. Posługując się przykładem *Escherichia coli* autorzy pokazują, że oznaczać to może różnice w budowie aż 1000 genów funkcjonalnych, co pociąga poważne konsekwencje w ekologii szczepów, a odrębność ekologiczna jest jednym z elementów definicji gatunku [16, 52]. Znaczne genetyczne podobieństwo może dotyczyć drobnoustrojów wyraźnie odmiennych fenotypowo, szczególnie pod względem chorobotwórczości, np. *E. coli* i *Shigella* spp. [48]. Dlatego z nadzieją należy spojrzeć na nowe techniki oceny fenotypowej, jak te zaproponowane przez *Bochnera* i *wsp.* [8]. Już w 1996 roku *Vandamme* i *wsp.* [82] głosili teorię taksonomii polifazowej, która szczególnie w przypadku maczugowców okazała się przydatna. Sekwencje przyjęte w tworzeniu drzewa filogenetycznego tych bakterii okazały się zbyt podobne i trzeba było sięgnąć po inne sekwencje genów konserwatywnych, a także po metody chemotaksonomiczne i biochemiczne. System fenetyczny

wykorzystywany jest w identyfikacyjnych systemach numerycznych, gdzie współczynniki podobieństwa wyliczane są na podstawie wielu cech. Mimo znacznego postępu identyfikacja maczugowców nadal stanowi ogromne wyzwanie, z którym wobec narastającego znaczenia klinicznego tych bakterii musimy się zmierzyć.

## Piśmiennictwo

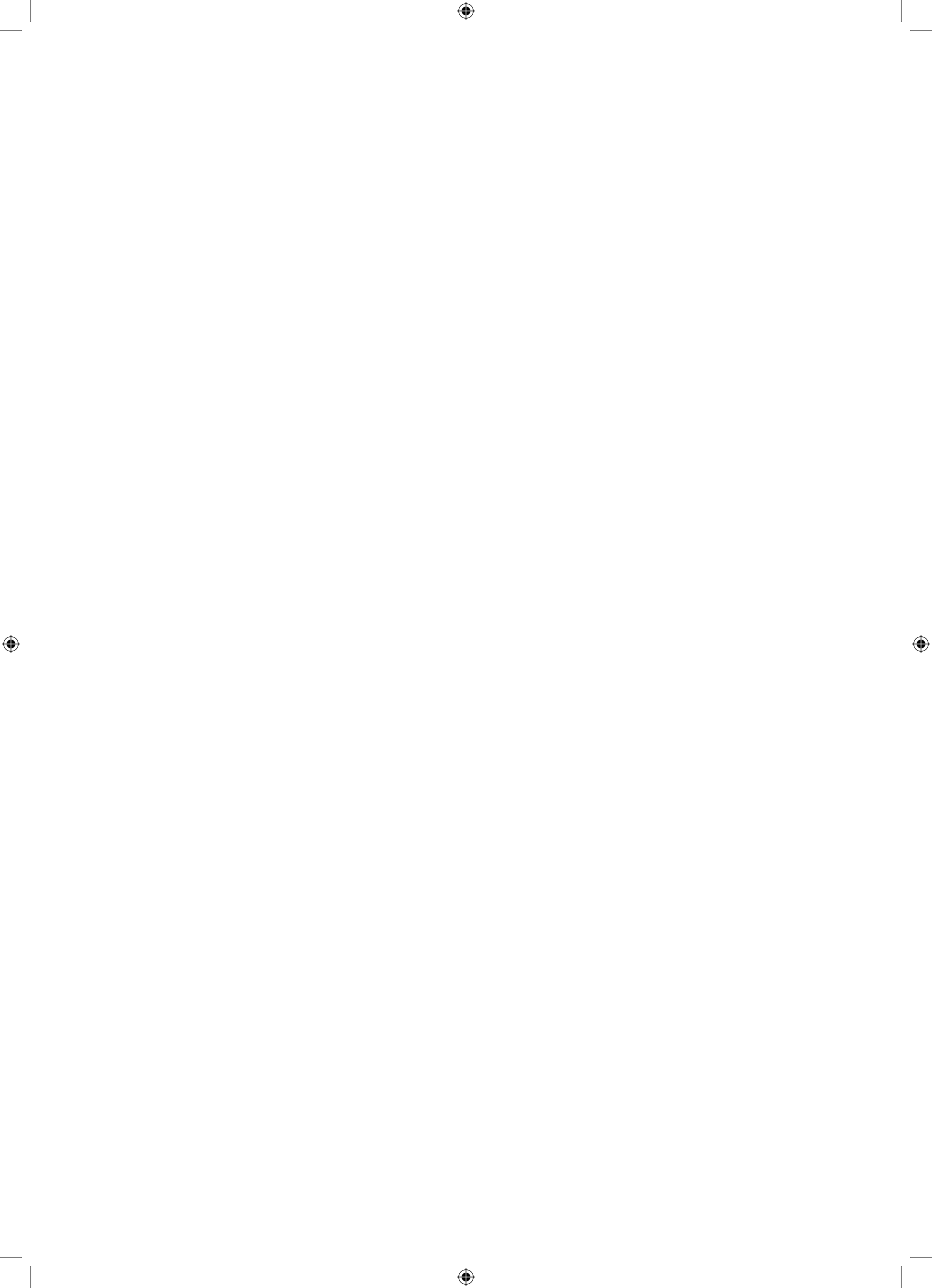
- Aalbæk B, Bemis D.A., Schjærff M., Kania S.A., Frank L.A., Guardabassi L.: Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. *Vet. Microbiol.* **145**, 292–298 (2010)
- Aravena-Roman M., Spröer C., Sträubler B., Inglis T., Yassin A.F.: *Corynebacterium pilbarensis* sp. nov., a non-lipophilic corynebacterium isolated from a human ankle aspirate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1484–1487 (2010)
- Auzias A., Bollet C., Ayari R., Drancourt M., Raoult D.: *Corynebacterium freneyi* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2777–2778 (2003)
- Ben-Dov E., Ben Yosef D.Z., Pavlov V., Kushmaro A.: *Corynebacterium maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from the mucus of the coral *Fungia granulosa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2458–2463 (2009)
- Bernard K.A., Bellefeuille M., Ewan E.P.: Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 83–89 (1991)
- Bernard K.A., Munro C., Wiebe D., Ongsansom E.: Characteristic of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4375–4381 (2002)
- Bernard K.A., Wiebe D., Burdz T., Reimer A., Ng B., Singh C., Schindle S., Pacheco A.L.: Assignment of *Brevibacterium stationis* ZoBell and Upham 1944 Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalize citrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 874–879 (2010)
- Bochner B.R.: Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 191–205 (2009)
- Brandenburg A.H., van Belkum A., van Pelt C., Bruining H.A., Mouton J.W., Verbrugh H.A.: Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2089–2094 (1996)
- Brennan N.M., Brown R., Goodfellow M., Ward A.C., Beresford T.P., Simpson P.J., Fox P.F., Cogan T.M.: *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 843–852 (2001)
- de Briel D., Couderc F., Riegel P., Jehl F., Minck R.: High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1407–1417 (1992)
- Brown S., Lanéelle M.A., Asselineau J., Barksdale L.: Description of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov., a leprosy-derived *Corynebacterium*. *Ann. Microbiol.* **135**, 251–267 (1984)
- Brune I., Brinkrolf K., Kalinowski J., Pühler A., Tauch A.: The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. *BMC Genomics*, **6**, 86–95 (2005)
- CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Sweden, <http://www.ccug.se/> (7 stycznia 2011 roku)
- Chen H.H., Li W.J., Tang S.K., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., Xu L.H., Jiang C.L.: *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 779–782 (2004)
- Cohan F.M.: What are Bacterial species? *Ann. Rev. Microbiol.* **56**, 457–87 (2002)
- Cole J.R., Tiedje J.M. i wsp.: The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D141–D145 (2009) (praca jest dziełem 11 autorów)
- Collins M.D., Hoyles L., Foster G., Falsen E.: *Corynebacterium caspium* sp. nov., from a Caspian seal *Phoca caspica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 925–928 (2004)
- Collins M.D., Hoyles L., Foster G., Sjödn B., Falsen E.: *Corynebacterium capitovis* sp. nov., from a sheep. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 857–860 (2001)
- Collins M.D., Hoyles L., Hutson R.A., Foster G., Falsen E.: *Corynebacterium testudinoris* sp. nov., from a tortoise, and *Corynebacterium felinum* sp. nov., from a Scottish wild cat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1349–1352 (2001)
- Collins M.D., Hoyles L., Lawson P.A., Falsen E., Robson R.L., Foster G.: Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3443–3447 (1999)
- Coyle M.B., Lipsky B.A.: Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 227–246 (1990)
- Daneshvar M.I., Brown J.M. i wsp.: Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of *Rothia dentocariosa* emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigricans* Shukla et al. 2003 pro synon. *Corynebacterium aurimucosum*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4189–4198 (2004) (praca jest dziełem 14 autorów)
- Du Z.J., Jordan E.M., Rooney A.P., Chen G.J., Austin B.: *Corynebacterium marinum* sp. nov. isolated from coastal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1944–1947 (2010)
- La Duc M.T., Dekas A., Osman S., Moissl C., Newcombe D., Venkateswaran K.: Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2600–2611 (2007)
- Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imahiji H., Ichimura M., Hayashi T., Shiota H.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 527–532 (2008)
- Euzéby J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) <http://www.bacterio.cict.fr/> (7 stycznia 2011 roku)
- Euzéby J.P.: List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published Validation List no. 111. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2025–2027 (2006)
- Fernández-Garayzábal J.F., Egado R., Vela A.I., Briones V., Collins M.D., Mateos A., Hutson R.A., Domínguez L., Goyache J.: Isolation of *Corynebacterium falsenii* and description of *Corynebacterium aquilae* sp. nov., from eagles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1135–1138 (2003)
- Fernández-Garayzábal J.F., Vela A.I., Egado R., Hutson R.A., Lanzarot M.P., Fernández-García M., Collins M.D.: *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks *Ciconia nigra*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2191–2195 (2004)



31. Feurer C., Clermont D., Bimet F., Candréa A., Jackson M., Glaser P., Bizet C., Dauga C.: Taxonomic characterization of nine strains isolated from clinical and environmental specimens, and proposal of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1055–1061 (2004)
32. Fudou R., Jojima Y., Seto A., Yamada K., Kimura E., Nakamatsu T., Hiraishi A., Yamanaka S.: *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1127–1131 (2002)
33. Funke G., Englert R., Frodl R., Bernard K.A., Stenger S.: *Corynebacterium canis* sp. nov., isolated from a wound infection caused by a dog bite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2544–2547 (2010)
34. Funke G., Frodl R.: Comprehensive Study of *Corynebacterium freneyi* strains and extended and emended description of *Corynebacterium freneyi* Renaud, Aubel, Riegel, Meugnier, and Bollet 2001. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 638–643 (2008)
35. Funke G., Frodl R., Bernard K.A.: *Corynebacterium mustelae* sp. nov., isolated from a ferret with lethal sepsis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 871–873 (2010)
36. Funke G., Frodl R., Bernard K.A., Englert R.: *Corynebacterium freiburgense* sp. nov., isolated from a wound obtained from a dog bite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2054–2057 (2009)
37. Funke G., von Graevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 125–159 (1997)
38. Funke G., Lawson P.A., Bernard K.A., Collins M.: Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1124–1128 (1996)
39. Fujii R., Saito Y., Tokura Y., Nakagawa K.-I., Okuda K., Ishihara K.: Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 502–505 (2009)
40. Gao Z., Tseng C., Pei Z., Blaser M.J.: Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2927–2932 (2007)
41. Garrity G.M., Bell J.A., Liburn T.G.: Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2004, [http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline\\_5\\_2004.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf) (7 stycznia 2011 roku)
42. Garrity G.M., Liburn T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzéby J., Tindall B.J.: Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007, <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/viewFile/181/214> (7 stycznia 2011 roku)
43. Gelsomino R., Vancanneyt M., Snauwaert C., Vandemeulebroeck K., Hoste B., Cogan T.M., Swings J.: *Corynebacterium mooreparkense*, a later heterotypic synonym of *Corynebacterium variabile*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1129–1131 (2005)
44. Goldstein E.J., Citron D.M., Merriam C.V., Warren Y.A., Tyrrell K.L., Fernandez H.T.: *In vitro* activities of doripenem and six comparator drugs against 423 aerobic and anaerobic bacterial isolates from infected diabetic foot wounds. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **52**, 761–766 (2008)
45. Goyache J., Vela A.I., Collins M.D., Ballesteros C., Briones V., Moreno J., Yorio P., Domínguez L., Hutson R., Fernández-Garayzábal J.F.: *Corynebacterium spheniscorum* sp. nov., isolated from the cloacae of wild penguins. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 43–46 (2003)
46. Goyache J., Ballesteros C., Vela A.I., Collins M.D., Briones V., Hutson R.A., Potti J., García-Borboroglu P., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F.: *Corynebacterium sphenisci* sp. nov., isolated from wild penguins. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1009–1012 (2003)
47. Hall V., Collins M.D., Hutson R.A., Lawson P.A., Falsen E., Duerden B.I.: *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1065–1068 (2003)
48. Johnson J.R.: *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J. Med. Microbiol.* **49**, 583–585 (2000)
49. Kämpfer P., Lidders N., Warfolomeow I., Falsen E., Busse H.J.: *Corynebacterium lubricantis* sp. nov., isolated from a coolant lubricant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1112–1115 (2009)
50. Khamis A., Raoult D., La Scola B.: *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3925–3931 (2004)
51. Khamis A., Raoult D., La Scola B.: Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1934–1936 (2005)
52. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M.: The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**, 1929–1940 (2006)
53. Krish G., Beaver W., Sarubbi F., Verghese A.: *Corynebacterium xerosis* as a cause of vertebral osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2869–2870 (1989)
54. Lee H.J., Cho S.L., Jung M.Y., Van Nguyen T.H., Jung Y.C., Park H.K., Le V.P., Kim W.: *Corynebacterium doosanense* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2734–2737 (2009)
55. Letek M., Ordóñez E., Fernández-Natal I., Gil J.A., Mateos L.M.: Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential *divIVA* gene as a target. *FEMS Microbiol. Lett.* **265**, 256–263 (2006)
56. Ludwig W., Schleifer K.-H. i wsp.: ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1363–1371 (2004) (praca jest dziełem 32 autorów)
57. Ludwig W., Euzéby J., Whitman W.B.: Phylogenetic trees of the phylum *Actinobacteria*, [http://www.bergeys.org/outlines/volume\\_5\\_actinobacteria.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/volume_5_actinobacteria.pdf) (7 stycznia 2011 roku)
58. Morita H., Kuwahara T., Ohshima K., Sasamoto H., Kltoh K., Hattori M., Hayashi T., Takami H.: An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* **22**, 214–222 (2007)
59. Merhej V., Falsen E., Raoult D., Roux V.: *Corynebacterium timonense* sp. nov. and *Corynebacterium massiliense* sp. nov., isolated from human blood and human articular hip fluid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1953–1959 (2009)
60. Mikucka A.: Coryneform bakterie – znane drobnoustroje, nieznanne patogeny? *Post. Mikrobiol.* **42**, 385–401 (2003)
61. Niepel T., Meyer H., Wray V., Wolf-Rainer A.: Intraspecific variation of unusual phospholipids from *Corynebacterium* spp. containing a novel fatty acid. *J. Bacteriol.* **180**, 4650–4657 (1998)
62. Olsen G.J., Woese C.R., Overbeek R.: The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**, 1–6 (1994)
63. Otsuka Y., Kawamura Y., Koyama T., Iihara H., Ohkusu K., Ezaki T.: *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3713–3717 (2005)
64. Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O.: SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7188–7196 (2007)
65. PubMLST, <http://pubmlst.org/cdiphtheriae/> (7 stycznia 2011 roku)



66. Renaud F.N.R., Aubel D., Riegel P., Meugnier H., Bollet C.: *Corynebacterium freneyi* sp. nov.,  $\alpha$ -glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1723–1728 (2001)
67. Renaud F.N.R., Le Coustumier A., Wilhem N., Aubel D., Riegel P., Bollet C., Freney J.: *Corynebacterium hansenii* sp. nov., an  $\alpha$ -glucosidase-negative bacterium related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1113–1116 (2007)
68. Riegel P., de Briel D., Prévost G., Jehl F., Monteil H.: Genomic diversity among *Corynebacterium jeikeium* strains and comparison with biochemical characteristic and antimicrobial susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1860–1865 (1994)
69. Riegel P., Creti R., Mattei R., Nieri A., von Hunolstein C.: Isolation of *Corynebacterium tuscaniae* sp. nov. from blood cultures of a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 307–312 (2006)
70. Riegel P., Ruimy R., de Briel D., Prévost G., Jehl F., Christen R., Monteil H.: Genomic diversity and phylogenetic relationships among lipid-requiring diphtheroids from humans and characterization of *Corynebacterium macginleyi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 128–133 (1995)
71. Roux V., Drancourt M., Stein A., Riegel P., Raoult D., La Scola B.: *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2231–2233 (2004)
72. Shin N.R., Jung M.J., Kim M.S., Roh S.W., Nam Y.D., Bae J.W.: *Corynebacterium nuruki* sp. nov., isolated from alcohol fermentation starter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2010) – praca w druku
73. Shukla S.K., Bernard K.A., Harney M., Frank D.N., Reed K.D.: *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4353–4358 (2003)
74. Shukla S.K., Vevea D.N., Frank D.N., Pace N.R., Reed K.D.: Isolation and characterization of a black-pigmented *Corynebacterium* sp. from a woman with spontaneous abortion. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1109–1113 (2001)
75. Tang Y.-W., von Graevenitz A., Waddington M.G., Hopkins M.K., Smith D.H., Li H., Kolbert Ch.P., Montgomery S.O., Persing D.H.: Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1676–1678 (2000)
76. Tanner M.A., Shoskes D., Shahed A., Pace N.R.: Prevalence of corynebacterial 16S rRNA sequences in patients with bacterial and “nonbacterial” prostatitis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1863–1870 (1999)
77. Tauch A., Pühler A. i wsp.: Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* **187**, 4671–4682 (2005) (praca jest dziełem 16 autorów)
78. Tauch A., Pühler A. i wsp.: The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *J. Biotechnol.* **136**, 11–21 (2008) (praca jest dziełem 19 autorów)
79. Tindall B.J., Kämpfer P., Euzéby J.P., Oren A.: Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2715–2720 (2006)
80. Tong J., Liu C., Summanen P.H., Xu H., Finegold S.M.: *Corynebacterium pyruviciproducens* sp. nov., a pyruvic acid producer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1135–1140 (2010)
81. Trost E., Tauch A. i wsp.: Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics*, **11**, 91–106 (2010) (praca jest dziełem 16 autorów)
82. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438 (1996)
83. Vela A.I., Mateos A., Collins M.D., Briones V., Hutson R.A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F.: *Corynebacterium suicordis* sp. nov., from pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 2027–2031 (2003)
84. Van den Velde S., Lagrou K., Desmet K., Wauters G., Verhaegen J.: Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**, 99–104 (2006)
85. Voisin S., Deruaz D., Freney J., Renaud F.N.R.: Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. striatum* and related species by pyrolysis-gas-liquid chromatography with atomic emission detection. *Res. Microbiol.* **153**, 307–311 (2002)
86. Wattiau P., Janssens M., Wauters G.: *Corynebacterium simulans* sp. nov., a non-lipophilic, fermentative *Corynebacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 347–353 (2000)
87. Wayne L.G., Trüper H.G. i wsp.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463–464 (1987) (praca jest dziełem 12 autorów)
88. Woese C.R.: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271 (1987)
89. Wu C.Y., Zhuang L., Zhou S.G., Li F.B., He J.: *Corynebacterium humireducens* sp. nov., an alkaliphilic humic-reducing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2010) – praca w druku
90. Yagüe G., Segovia M., Valero-Guillén P.L.: Phospholipid composition of several clinically relevant *Corynebacterium* species as determined by mass spectrometry: an unusual fatty acyl moiety is present in inositol-containing phospholipids of *Corynebacterium urealyticum*. *Microbiol.* **149**, 1675–1685 (2003)
91. Yassin A.F.: *Corynebacterium ureicelerivorans* sp. nov., a lipophilic bacterium isolated from blood culture. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1200–1203 (2007)
92. Yassin A.F.: *Corynebacterium ulceribovis* sp. nov., isolated from the skin of the udder of a cow with a profound ulceration. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 34–37 (2009)
93. Yassin A.F., Kroppenstedt R.M., Ludwig W.: *Corynebacterium glaucum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 705–709 (2003)
94. Yassin A.F., Siering C.: *Corynebacterium sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pneumonia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2876–2879 (2008)
95. Yassin A.F., Steiner U., Ludwig W.: *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1001–1005 (2002)
96. Yassin A.F., Steiner U., Ludwig W.: *Corynebacterium appendicis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1165–1169 (2002)



## XXVII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

5–8 września 2012 r. Lublin

W dniach 5–8.09.2012 r. odbędzie się XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów organizowany przez Lubelski Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

### Miejsce obrad:

Uniwersytet Medyczny w Lublinie. Collegium Maius Lublin ul. Jaczewskiego 4.

SZCZEGÓŁOWE INFORMACJE DOTYCZĄCE ZJAZDU  
UKAŻĄ SIĘ NA STRONIE INTERNETOWEJ

**[www.microbiology.pl](http://www.microbiology.pl) i w *Postęпах Mikrobiologii***

W imieniu Komitetu Organizacyjnego XXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
prof. dr hab. *Maria Koziół-Montewka*

---

### INFORMACJA DLA AUTORÓW o opłatach za prace publikowane w *Postęпах Mikrobiologii*

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

**Bank Pekao S.A. 18 1240 5992 1111 0000 4774 7434.**

Opłatę można wносить indywidualnie, po otrzymaniu informacji po zaakceptowaniu pracy do druku. W imieniu Autorów opłatę może wносить sponsorująca instytucja, fundacja itp. Wtedy Autorzy zobowiązani są do złożenia w Redakcji wraz z manuskrytem pisemnego zobowiązania się do opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT. Należy dodatkowo:

- Przesyłać dane do wystawienia faktury VAT (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej) na nr faksu (022) 841-29 49, lub drogą pocztową na adres siedziby Zarządu PTM: 00-725 Warszawa ul. Chełmska 30/34.
- Do dowodu wpłaty lub zobowiązania zapłaty dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego.



## List do Redakcji

Zwracam się z prośbą o zamieszczenia sprostowania i korektę tytułu mojej publikacji zatytułowanej „Epidemiologia wybranych podgatunków bakterii *Clavibacter michiganensis* oraz metody ich identyfikacji i zwalczania”, która ukazała się w *Postęпах Mikrobiologii* w 4 zeszytcie 2010 r.

Jako nowy tytuł proponuję

**„ETIOLOGIA I PATOGENEZA ZAKAŻEŃ WYWOŁANYCH PRZEZ PODGATUNKI BAKTERII  
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS ORAZ METODY IDENTYFIKACJI TYCH BAKTERII”**

**“Etiology and pathogenesis of infections caused by *Clavibacter michiganensis* subspecies and methods of identification of these bacteria”**

Problematyczny tytuł pod jakim opublikowano pracę jest efektem poprawek w trakcie redagowania pracy, mających na celu jego skrócenie.

*w imieniu Autorów  
Małgorzata Waleron*

## Od Redakcji

Redakcja *Postępow Mikrobiologii* przeprasza czytelników naszego pisma za niedopatrzenie związane z tytułem powyższej pracy.

*w imieniu Redakcji  
Bohdan Starościak  
sekretarz Redakcji*

## SPIS TREŚCI

Profesor dr hab. Konrad Malicki (1929–2011) .....	83
mgr Jarosław Marek Wiśniewski (1964–2011) .....	85
Ł. Dziewit, D. Bartosik – Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych .....	87
U. Kuklińska, A.M. Łasica, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Białko CagA <i>Helicobacter pylori</i> – pierwsza zidentyfikowana bakteryjna onkoproteina .....	97
M. Kordowska-Wiater – Drożdże jako czynniki ochrony biologicznej roślin .....	107
A. Słońska, A. Golke, M. Solarska, J. Cymerys, T. Dzieciatkowski, M. Bańbura – Wpływ zakażeń wirusowych na cytoszkielet komórkowy .....	121
K. Caraballo Cortés, M. Radkowski – Wpływ zmienności wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) na skuteczność terapii przeciwwirusowej .....	131
M. A. Grygorowicz, E. Kozłowska – Udział receptorów TLR rozpoznających wzorce molekularne organizmów patogennych w modulowaniu aktywności regulatorowych limfocytów T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> .....	141
A. K. Kwaszewska, E. M. Szewczyk – Postępy w taksonomii i metodach identyfikacyjnych izolowanych od ludzi bakterii z rodzaju <i>Corynebacterium</i> .....	155

## CONTENTS

Professor Konrad Malicki (1929–2011) .....	83
Jarosław Marek Wiśniewski MSc. (1964–2011) .....	85
Ł. Dziewit, D. Bartosik – Prokaryotic genomes in the light of genomic analyses .....	87
U. Kuklińska, A.M. Łasica, E.K. Jagusztyn-Krynicka – <i>Helicobacter pylori</i> CagA protein – the first identified bacterial oncoprotein .....	97
M. Kordowska-Wiater – Yeasts as biological control agents for plants .....	107
A. Słońska, A. Golke, M. Solarska, J. Cymerys, T. Dzieciatkowski, M. Bańbura – Viral manipulations of cells cytoskeleton .....	121
K. Caraballo Cortés, M. Radkowski – The influence of hepatitis C virus (HCV) genetic variability on the outcome of antiviral therapy .....	131
M. A. Grygorowicz, E. Kozłowska – Involvement of receptors recognizing pathogen-associated molecular patterns – TLRs in modulation of regulatory T cell CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> activity .....	141
A. K. Kwaszewska, E. M. Szewczyk – Progress in taxonomy and methods of identification of members of the <i>Corynebacterium</i> genus isolated from human .....	155

