



## Hemolizyny aktywowane tiolem jako markery wirulencji bakterii

Bożena Szramka<sup>1</sup>, Julianna Kurlenda<sup>2</sup>, Anna J. Podhajska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

<sup>2</sup>Zakład Bakteriologii Klinicznej, Wojewódzki Szpital Zespolony, Gdańsk

### Thiol-activated hemolysins as virulence markers of bacteria

#### Summary

The article contains information regarding the similarities and differences between proteins of the thiol-activated cytolysins family (TACY). Members of this group of haemolysins are produced by several species of Gram-positive bacteria (*Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) and also by Gram-negative *Klebsiella* spp. Their cytolytic activity is sensitive to oxygen and can be restored by adding reducing compounds. TACY bind to cholesterol-containing membranes to form pores. Preincubation of the toxin with small amounts of cholesterol inhibits hemolytic activity as well as cytolysis of eucaryotic cells. Members of the group show 40-70% similarity in amino acid sequence, and contain an almost invariant Trp-rich undecapeptide sequence (ECTGLAWEWWR). The TACY are important virulence factors. Recently increased use has been made of molecular methods (PCR, hybridization) in the detection and identification of the TACY producing bacteria.

#### Key words:

thiol-activated hemolysin, cholesterol binding, pore-forming toxins, PCR.

#### Adres do korespondencji

Bożena Szramka,  
Katedra Biotechnologii,  
Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii,  
Uniwersytet Gdański  
i Akademia Medyczna,  
ul. Kładki 24,  
80-822 Gdańsk.

### 1. Wstęp

Hemolizyny są toksynami wytwarzanymi zarówno przez bakterie Gram-ujemne (np. *E. coli*, *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Vibrio* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*) jak i Gram-dodatnie (np. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp.). W przypadku większości tych

drobnoustrojów wytwarzanie hemolizyn jest istotnym czynnikiem wirulencji. Nazwa „hemolizyna” pochodzi od zdolności tych toksyn do powodowania lizy erytrocytów, a w konsekwencji do uwalniania hemoglobiny. Wiele z tych toksyn posiada również właściwości cytolityczne i cytotoksyczne w stosunku do innych komórek (1,2). Wśród hemolizyn bardzo ciekawą grupę stanowią cytolizyny aktywowane tiolem – TACY (*thiol-activated cytolysins*). Syntetyzują je głównie bakterie Gram-dodatnie (np. *Streptococcus* spp., *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) (1,3,4). Wśród bakterii Gram-ujemnych hemolizyny aktywowane tiolem opisane zostały tylko u *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca* (5-8). Nazwa „tiolem aktywowane cytolizyny” wzięła się stąd, że aktywność cytolityczna większości tych toksyn jest obserwowana po dodaniu związków tiolowych, takich jak 2-merkaptoetanol czy ditiotreitol (DTT). Dodanie związków tiolowych niweluje działanie tlenu, który wywiera efekt inhibitorowy w stosunku do aktywności cytolitycznej większości toksyn należących do grupy TACY. Toksyny te przyłączają się do błon, zawierających w swym składzie cholesterol i tworzą wewnątrz błonowe pory. Preinkubacja z niewielką ilością cholesterolu hamuje aktywność hemolityczną i cytolityczną (9). Hemolizyny należące do grupy TACY są białkami mającymi podobną masę cząsteczkową (ok. 50-60 kDa). Mają również podobną sekwencję aminokwasową (40-70% homologii) (4). W okolicy C-końca znajduje się konserwowana ewolucyjnie, jedenastoaminokwasowa sekwencja (ECTGLAWWWRT) (tab. 1). Ta charakterystyczna sekwencja bogata w reszty tryptofanu, zawiera również pojedynczą resztę cysteinową. Udowodniono, że sekwencja ta odpowiedzialna jest za przyłączanie się toksyny do komórki docelowej. Zastosowano przeciwciała monoklonalne (mAb PLY-5) przeciwko pneumolizynie (*Streptococcus pneumoniae*), które skutecznie hamowały również aktywność streptolizyny O (*Streptococcus pyogenes*), cereolizyny O (*Bacillus cereus*), alvelizyny (*Bacillus alvei*), listeriolizyny O (*Listeria monocytogenes*), ivanolizyny O (*Listeria ivanovii*) i seeligerolizyny O (*Listeria seelingeri*). Po przyłączeniu się toksyn do błony docelowej epitopy stały się niedostępne dla przeciwciał. W wyniku mapowania epitopów wykazano, że najmniejszą sekwencją rozpoznawaną przez przeciwciała PLY-5 jest fragment WWWWRT. Dla potwierdzenia wyniku mapowania epitopów, wykonano syntezę peptydu ECTGLAWWWRT, który skutecznie blokował działanie przeciwciał PLY-5 (4). Pojedyncza reszta cysteinowa obecna w konserwowanej sekwencji nie jest niezbędną do aktywności toksycznej wszystkich białek należących do TACY. Mutacja punktowa w genie pneumolizyny, a w konsekwencji zamiana reszty Cys-428/Ala, powodowała jedynie częściową utratę aktywności toksycznej. Białko, w którym wystąpiła zamiana reszty cysteinowej przez alaninową nie ulegało inaktywacji oksydacyjnej i aktywacji tiolem, co sugeruje, że reszta cysteinowa jest przypuszczalnie miejscem wrażliwym na tlen oraz miejscem aktywacji tiolowej (9).

Tabela 1

Porównanie cytolizyn aktywowanych tiolem w zakresie konserwowanej ewolucyjnie sekwencji aminokwasowej

Gatunek	Cytolizyna	Skrót nazwy	Nr pierwszego aminokwasu	Sekwencja aminokwasowa*	Nr dostępu** (GenBank)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	streptolizyna O	SLO	529	E C T G L A W E W W R	(M18638)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	pneumolizyna	PLY	427	E C T G L A W E W W R	(X52474)
<i>Streptococcus suis</i>	suilizyna	SLY	455	E C T G L A W E W W R	(Z36908)
<i>Streptococcus intermedius</i>	intermedilizyna	ILY	485	G A T G L A W E P W R	(AB029317)
<i>Listeria monocytogenes</i>	listeriolizyna O	LLO	483	E C T G L A W E W W R	(M24199)
<i>Listeria seeligeri</i>	seeligerolizyna O	LSO	484	E C T G L F W E W W R	(X60462)
<i>Listeria ivanovii</i>	ivanolizyna O	ILO	458	E C T G L A W E W W R	(X60461)
<i>Bacillus alvei</i>	abeolizyna	ALY	460	E C T G L A W E W W R	(M62709)
<i>Bacillus cereus</i>	cereolizyna	CLY	465	E C T G L A W E W W R	(D21270)
<i>Clostridium perfringens</i>	perfringolizyna O	PFO	458	E C T G L A W E W W R	(M81080)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	pyolizyna	PLO	491	E A T G L A W D P W W	(U84782)

\* E – Glu, C – Cys, T – Thr, G – Gly, L – Leu, A – Ala, W – Trp, D – Asp, P – Pro, F – Phe, R – Arg

\*\* GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Cytolizyny TACY są ważnym czynnikiem wirulencji bakterii. Dowiedziono tego m.in. poprzez mutacje genów odpowiedzialnych za syntezę tych toksyn. Właściwości toksyczne badano wobec różnego rodzaju linii komórkowych oraz na modelach zwierzęcych. Mutanty wykazywały obniżenie cytotoxycywności oraz wirulencji w stosunku do badanych zwierząt (3,10,11).

Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej możliwe stało się poznanie nie tylko właściwości biologicznych i chemicznych białek należących do grupy cytolizyn aktywowanych tiolem, ale również dogłębne poznanie mechanizmów genetycznych regulujących syntezę i wydzielanie tych toksyn. Celem tego opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości hemolizyn aktywowanych tiolem, wykazanie podobieństw i różnic między tymi toksynami oraz wskazanie możliwości zastosowania markerów molekularnych w celu wykrywania bakterii syntetyzujących te białka.

## **2. Aktywowane tiolem hemolizyny wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Streptococcus***

Najbardziej znaną hemolizyną aktywowaną tiolem wytwarzaną przez bakterie z rodzaju *Streptococcus* jest streptolizyna O (SLO). Jest to toksyna wydzielana przez bakterie z gatunku *Streptococcus pyogenes*. Bakterie te są najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń wywoływanych przez paciorkowce  $\beta$ -hemolizujące. Mogą występować w składzie mikroflory błon śluzowych gardła i skóry, ale mogą też powodować liczne, niekiedy bardzo poważne schorzenia. Szczególnie poważne są powikłania po zakażeniach, które mogą doprowadzić do gorączki reumatycznej, paciorkowcowego zespołu podobnego do wstrząsu toksycznego (STLS – *streptococcal toxic shock-like syndrome*) oraz do dysfunkcji układu oddechowego u dorosłych (ARDS – *adult respiratory distress syndrom*) (12). Streptolizyna O (SLO) jest jedną z najlepiej poznanych toksyn wydzielanych przez bakterie *Streptococcus pyogenes*. Gen *slo* koduje białko o masie cząsteczkowej 63,645 kDa. Pierwotny produkt translacji składa się z 571 aminokwasów. Na jego N-terminalnym końcu znajduje się 33 aminokwasowa sekwencja sygnałowa. Podczas wydzielania toksyny z komórki od białka odcięty zostaje fragment o m.c. 7 kDa. Fragment ten, nazywany również niskocząsteczkową formą streptolizyny O jest aktywny hemolitycznie. Ten fragment jest unikatowy dla streptolizyny O i nie został wykryty w innych cytotoxynach (13). Streptolizyna O wykazuje aktywność wobec ludzkich, króliczych i mysich erytrocytów oraz ludzkich fibroblastów i keratynocytów (14). Przyłącza się ona do błon, zawierających w swym składzie cholesterol i tworzy wewnątrz błonowe pory. Przyłączanie się do błony komórki docelowej nie jest związane z występującymi w błonach receptorami białkowymi (15). W przeprowadzonej mikroskopii elektronowej ujawniono, że struktury transbłonowe tworzone przez SLO są koliste lub łukowate. Aktywne hemolitycznie struktury składają się z 70-125 monomerów. Średnica całego pierścienia wynosi od

24-30 nm. Sądzi się, że zewnętrzna powierzchnia porów, kontaktująca się z warstwą lipidową błony, ma charakter hydrofobowy, natomiast powierzchnia wewnętrzna jest hydrofilowa (16). Cholesterol i lipidy błonowe nie biorą udziału w oligomeryzacji, a wielkie superstruktury powstają poprzez asocjację monomerów (14). W okolicy C-końca streptolizyny O znajduje się charakterystyczna dla białek TACY, jedenaścioaminokwasowa sekwencja (ECTGLAWEWWR) (tab. 1). Sekwencja ta odpowiedzialna jest za przyłączanie się białka do błony komórki docelowej (4).

Streptolizyna O jest ważnym czynnikiem wirulencji *Streptococcus pyogenes*. W przeprowadzonych doświadczeniach na modelu szczurzym wykazano, że synergistyczne działanie streptolizyny O i paciorkowcowej proteazy cysteinowej (SCP – *streptococcal cysteine protease*) powoduje uszkodzenie pęcherzyków płucnych (12). Natomiast w badaniach przeprowadzonych na świnkach morskich przypuszcza się, że SLO może również uszkadzać struktury ucha wewnętrznego, co w rezultacie może doprowadzić do utraty słuchu (17). Streptolizynę O wydzielają nie tylko szczepy *Streptococcus pyogenes*, ale także *S. canis* i *S. equisimilis* (3,13).

Kolejną wytwarzaną przez paciorkowce hemolizyną zaliczaną do grupy TACY jest pneumolizyna. Pneumolizyna (PLY), wytwarzana przez *Streptococcus pneumoniae*, jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 53 kDa. Gen strukturalny *ply* koduje polipeptyd składający się z 471 aminokwasów. W przeciwieństwie do innych cytolizyn aktywowanych tiolem pierwotny produkt translacji nie zawiera sekwencji sygnałowej. Za uwolnienie pneumolizyny z komórki odpowiedzialna jest autolizyna, produkt genu *lytA* (18). Aktywność cytolityczna związana jest, tak jak i u innych cytolizyn aktywowanych tiolem, z oddziaływaniem z cholesterolem znajdującym się w błonach komórek docelowych. Po związaniu z błoną w miejscu występowania cholesterolu, pneumolizyna oligomeryzuje tworząc transbłonowe pory o średnicy 30-40 nm (19). Aktywność hemolityczną pneumolizyny obserwowano zarówno w stosunku do króliczych, baranich, jak i ludzkich erytrocytów (20-23). Szczególnie podatne na lizę wywołaną przez pneumolizynę są erytrocyty, ale toksyna ta może oddziaływać również z innymi rodzajami komórek. Wykazuje efekt cytolityczny w stosunku do komórek nabłonka pęcherzyków płucnych, śródbłonka naczyń krwionośnych oraz oddziałuje z komórkami układu immunologicznego: neutrofilami i monocytami. Pneumolizyna posiada również zdolność aktywacji dopełniacza (20-22). Funkcję poszczególnych regionów sekwencji aminokwasowej pneumolizyny poznano dzięki wykonaniu licznych mutacji w obrębie genu pneumolizyny. Zahamowanie aktywności hemolitycznej następowało w wyniku mutacji, których konsekwencją była zmiana w sekwencji aminokwasowej Trp-433/Phe i Cys-428/Gly (21,22). W miejscowospecyficznej mutacji genu *ply*, prowadzącej do zmiany Cys-428/Gly wykazano, że reszta cysteinowa nie ma decydującego znaczenia dla aktywności hemolitycznej. Decydujące znaczenie dla aktywności hemolitycznej miała zmiana Trp433/Phe, która prawie całkowicie hamowała zarówno aktywność hemolityczną jak i cytolityczną. Mutacja tego regionu genu *ply* powoduje, że pneumolizyna nie przyłącza się do błon. Tryptofan w pozycji 433, jak i cysteina w pozycji 428, znajdują się w pobliżu

C-końca pneumolizyny, w obrębie konserwowanej ewolucyjnie jedenastoaminokwasowej sekwencji, charakterystycznej dla większości białek należących do grupy TACY. Sekwencja ta odpowiada za przyłączanie się pneumolizyny do błon komórek docelowych. Zostało to potwierdzone zarówno przy użyciu przeciwciał monoklonalnych PLY-5 (4,24) jak i dzięki metodom spektroskopii fluorescencyjnej (25). Stwierdzono, że monomer pneumolizyny składa się z czterech domen. Główną rolę w przyłączaniu się pneumolizyny do błony komórki docelowej odgrywa domena czwarta zawierająca charakterystyczną jedenastoaminokwasową sekwencję bogatą w tryptofan (26-28). Trzeciorzędowa struktura pierścienia tworzonego przez pneumolizynę przyjmuje kształt helikoidalny (27). Monomery pneumolizyny mogą również spontanicznie tworzyć oligomery w roztworze, bez udziału błon i zawartego w nich cholesterolu (26).

Inną aktywność pneumolizyny, zdolność do aktywacji dopełniacza hamuje zmiana Asp-358/Asn (21,22). Ta właściwość pneumolizyny ma znaczenie w przypadku osłabienia układu immunologicznego, a szczególnie przy niskim poziomie białek układu dopełniacza. Obniżony poziom białek układu dopełniacza obserwowany jest u chorych z marskością wątroby. Tacy chorzy częściej niż inni narażeni są na bakteremie wywołane przez szczepy *S. pneumoniae* typ 3. Udowodniono, że w czasie zakażenia *S. pneumoniae* typ 3, najbardziej szkodliwym czynnikiem jest pneumolizyna, a dokładniej jej zdolność aktywacji dopełniacza. Badania prowadzono na modelu szczurzym. Szczury cierpiące na marskość wątroby zainfekowano mutantami *Streptococcus pneumoniae*. Zwierzęta zainfekowane szczepem *S. pneumoniae* produkującym pneumolizynę pozbawioną funkcji aktywacji dopełniacza, żyły znacznie dłużej niż szczury zakażone *S. pneumoniae* wytwarzającym pneumolizynę posiadającą zdolność aktywacji dopełniacza (20). Pneumolizyna jest istotnym czynnikiem wirulencji *Streptococcus pneumoniae*. Prowadząc badania na świnkach morskich ustalono, że w przypadku zakażeń pneumokokowych pneumolizyna jest podstawowym czynnikiem powodującym uszkodzenie ucha wewnętrznego, którego konsekwencją jest utrata słuchu (29). Pneumolizyna jest głównym pneumokokowym czynnikiem oddziałującym na komórki układu immunologicznego i wywołującym odczyn zapalny. Obecność pneumolizyny stymuluje makrofagi do wydzielania tlenu azotu, który jest istotnym elementem odporności organizmu na infekcję (30). W badaniach wykonanych *in vitro* wykazano, że niewielkie, sublityczne stężenia pneumolizyny indukują monocyty do wydzielania TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (31,32).

Coraz częściej pojawiają się publikacje, wskazujące na możliwość szybkiej i skutecznej identyfikacji szczepów *Streptococcus pneumoniae* w oparciu na ich właściwości wytwarzania pneumolizyny. Do identyfikacji *S. pneumoniae* wykorzystywane są zarówno metody serologiczne, jak i metody genetyczne. Porównania skuteczności tych metod dokonali Toikka i in. (33). Wśród metod serologicznych porównywano metody wykorzystujące przeciwciała przeciwko pneumolizynie oraz przeciwko polisacharydowi C. Wykrywano także kompleksy immunologiczne pneumolizyny krążące we krwi badanych pacjentów. Metody genetyczne okazały się skuteczniej-

sze od metod serologicznych. Do wykrywania *S. pneumoniae* użyta została reakcja amplifikacji DNA-PCR (*polymerase chain reaction*), a dokładnie tzw. *nested PCR*, w której wykorzystano dwie pary starterów specyficznych dla genu pneumolizyny (tab. 2). Produkt amplifikacji wykrywano za pomocą hybrydyzacji metodą Southerna, do której użyto sondy znakowanej fosforem  $^{32}\text{P}$  (33).

Tabela 2

Sekwencje oligonukleotydów stosowanych do wykrywania obecności genów kodujących cytolizyny aktywowane tiolem

Cytolizyna	Oligonukleotyd	Sekwencja (5' → 3')	Literatura
pneumolizyna	I a	ATTTCTGTAACAGCTACCAACGA	Toikka P., (1999)
	I b	GAATTCCTGTCTTTTCAAAGTC	
	II a	CCCACTTCTTCTGCGGTTGA	
	II b	TGAGCCGTTATTTTTTCATACTG	
	[ $^{32}\text{P}$ ] ATP	TTGGAGAAAGCTATCGCTACTTGC	
intermedilizyna	ILY-NFw	AACACCTACCAAACCAAAGCAGC	Nagamune H., (2000)
	ILY-CBw	ACTGTGGATGAAGGGTTGTCCCC	
listeriolizyna O	A1	GCAGTTGCAAGCGCTTGAGTGAA	Paziak-Domańska B., (1999)
	A2	GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	
listeriolizyna O	HLYP1	CCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAA	Norton D.-M., (1999)
	HLYP2	TAGTTCTACATCACCTGAGACAGA	
	HLYP8	AGGATTGGATTACAATAAAAACAA	
	HLYP9	TTCGAATTCGCTTTTACGAGAGC	
	HLYP4R	CTTCTTCTTGCATTTCCCTTC	
	HLYP15	<b>R</b> CGGAGATGCAG <b>Q</b> GACAAATGTGCC <b>p</b>	

R – fluoresceina, Q – rodamina, p – fosforan

Bardzo skuteczną metodą, jak się okazało, był również test aglutynacji opracowany w oparciu na przeciwciałach specyficznych wobec pneumolizyny (34). Metoda ta jest specyficzna w 100 i czuła w 95% w wykrywaniu szczepów *S. pneumoniae*. Spośród osiemdziesięciu szczepów *S. pneumoniae* tylko cztery nie indukowały aglutynacji. Jeden z nich był hemolityczny w niewielkim stopniu, natomiast trzy pozostałe w ogóle nie wykazywały aktywności hemolitycznej. Test aglutynacji nie dawał pozytywnego wyniku w przypadku innych aktywnych hemolitycznie bakterii, również w przypadku pozostałych bakterii produkujących hemolizyny należące do grupy TACY (34).

Mniej znaną aktywowaną tiolem hemolizyną wytwarzaną przez bakterie z rodzaju *Streptococcus* jest suilizyna. Wydzielają ją bakterie *Streptococcus suis*, znane przede wszystkim z tego, że są chorobotwórcze dla świń. U ludzi, szczególnie u tych, któ-

rzy mają kontakt z zakażonymi zwierzętami oraz spożywających surową wieprzowinę, zakażenie *Streptococcus suis* może manifestować się zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i bakteremią (35). Suilizyna wydzielana jest przez *Streptococcus suis* typ 2. Posiada cechy charakterystyczne dla hemolizyn aktywowanych tiolem, a zatem traci aktywność w kontakcie z tlenem i jest reaktywowana w warunkach zredukowanych oraz jest inaktywowana przez niewielkie ilości cholesterolu (36,37). Suilizyna, po odcięciu sekwencji sygnałowej, jest białkiem składającym się z 473 aminokwasów. Jej masę cząsteczkową oszacowano na 52,8 kDa (36). Sekwencja aminokwasowa suilizyny wykazuje duży stopień homologii z sekwencją pneumolizyny (52%) i alveolizyny (38%). W obrębie tej sekwencji obecny jest, charakterystyczny dla TACY jedenastoaminokwasowy peptyd zawierający w swym składzie pojedynczą resztę cysteinową (tab. 1) (37). Suilizyna powoduje nie tylko lizę baranich erytrocytów, ale może być również aktywna w stosunku do innych komórek. W badaniach prowadzonych *in vitro* dowiedziono, że suilizyna jest głównym czynnikiem, wytwarzanym przez bakterie *Streptococcus suis* typ 2, uszkodzającym ludzkie komórki śródbłonna naczyń włosowatych mózgu. Uszkodzenie tych komórek powodowały tylko szczepy wytwarzające suilizynę. Hamowanie toksyczności szczepów następowało po dodaniu cholesterolu lub przeciwciał przeciwko suilizynie. Oczyszczona suilizyna powodowała również uszkodzenie komórek śródbłonna. W badaniach tych sugeruje się, że suilizyna pełni ważną rolę w pokonywaniu bariery krew-mózg przez bakterie *Streptococcus suis* (35).

Wśród hemolizyn wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Streptococcus* na uwagę zasługuje intermedilizyna (ILY) wydzielana przez *Streptococcus intermedius*. Jej działanie nie wymaga aktywacji przez związki tiolowe, tak zatem nie można jej zaliczyć do grupy cytolizyn aktywowanych tiolem (38). Warto o niej wspomnieć ze względu na inne jej cechy upodabniające ją do białek TACY. Intermedilizyna została zidentyfikowana jako czynnik cytolityczny wydzielany przez szczep *Streptococcus intermedius* UNS46, wyizolowany z ropnia z ludzkiej wątroby. Toksyna ta wykazywała aktywność hemolityczną wobec erytrocytów ludzkich. Wobec erytrocytów szympansa była 100-krotnie mniej efektywna. Natomiast nie była aktywna wobec badanych erytrocytów dziewięciu innych gatunków ssaków. Oprócz właściwości hemolitycznych intermedilizyna posiada również właściwości cytolityczne. Badania właściwości cytolitycznych przeprowadzono na liniach komórkowych NB69 (*human neuroblastoma*) i HepG2 (*human hepatoma*). Śmierć komórek następowała w wyniku zniszczenia błony komórkowej. Intermedilizynę oczyszczono z hodowli *S. intermedius* UNS46, po rozdziale w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) występowała w postaci dwóch prążków – 54 i 53 kDa. Obydwa te białka reagowały z przeciwciałami przeciwko intermedilizynie. Poznano sekwencję amniokwasową pięciu wewnętrznych fragmentów intermedilizyny i stwierdzono, że są one homologiczne z sekwencją pneumolizyny. Podobnie jak w przypadku toksyn należących do grupy TACY w pobliżu C-końca sekwencji aminokwasowej intermedilizyny znajduje się fragment silnie konserwowanej sekwencji, zawierającej pojedynczą resztę cysteinową (tab. 1). Aktywność



intermedilizyny jest również hamowana przez niewielkie ilości cholesterolu (38). Przy użyciu reakcji PCR z zastosowaniem starterów specyficznych dla genu *ily*, kodującego intermedilizynę (tab. 2) oraz sondy DNA, specyficznej dla genu *ily* dokonano analizy dystrybucji genu kodującego intermedilizynę w obrębie grupy paciorkowców, do której należy *Streptococcus intermedius*. Stwierdzono, że gen kodujący intermedilizynę jest charakterystyczny tylko dla szczepów *Streptococcus intermedius*. Nie obserwowano produktu amplifikacji ani hybrydyzacji w przypadku badanych szczepów *S. anginosus* i *S. constellatus* (39). Poprzez zastosowanie przeciwciał specyficznych wobec intermedilizyny ustalono, że poziom wydzielanej intermedilizyny był znacznie wyższy w przypadku szczepów izolowanych z ropni mózgu i wątroby (odpowiednio 6,2 i 10,2 razy większy) niż szczepów naturalnie występujących w jamie ustnej. Intermedilizyna jest zatem istotnym czynnikiem wirulencji *Streptococcus intermedius*, a metody identyfikacji tych bakterii oparte na znajomości sekwencji nukleotydowej genu intermedilizyny są skutecznym narzędziem diagnostycznym (39).

### 3. Listeriolizyna O – czynnik wirulencji *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* powoduje zakażenia nazywane listeriozami, w przebiegu których nierzadko dochodzi do posocznicy i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (40). Zakażeniom najczęściej ulegają noworodki i chorzy z obniżoną odpornością. Zakażenie *Listeria monocytogenes* może również być przyczyną poronień (41,42). Listeriolizyna O (LLO) kodowana jest przez gen *hlyA* (*lisA*), który znajduje się w ważnym genetycznie regionie chromosomu grupującym operony najważniejszych determinant patogenezy *L. monocytogenes*. Synteza listeriolizyny, podobnie jak synteza innych cytolizyn jest pozytywnie regulowana. Aktywatorem transkrypcji genu *hlyA* jest polipeptyd PrfA, o masie cząsteczkowej 27 kDa, kodowany przez gen *prf* (1,10,43).

Listeriolizyna O (58 kDa) jest polipeptydem składającym się z 529 aminokwasów (44). Sekwencja aminokwasowa listeriolizyny O, wykazuje wysoką homologię (ok. 43%) z sekwencją aminokwasową streptolizyny O, pneumolizyny, perfringolizyny O i alveolizyny, jeśli porównywany jest C-koniec, który jest silniej konserwowany, niż zawierający sekwencję sygnałową N-koniec (tab. 1). Podobnie jak inne białka należące do grupy TACY listeriolizyna przyłącza się do błon komórek docelowych w miejscu występowania cholesterolu. Stwierdzono, że dodanie niewielkich ilości cholesterolu wywołuje efekt inhibitorowy w stosunku do aktywności cytolitycznej, lecz nie hamuje przyłączania się listeriolizyny do błony komórkowej. Udowodniono to dzięki zastosowaniu przeciwciał poliklonalnych przeciwko listeriolizynie. Podobnie jak w przypadku streptolizyny O i pneumolizyny wykazano za pomocą metod mikroskopii elektronowej, że listeriolizyna tworzy koliste i łukowate struktury o średnicy 30-50 nm. Struktur tych nie obserwowano po preinkubacji listeriolizyny z cholesterolem. Sugeruje to, że cholesterol blokuje oligomeryzację toksyny (9). Listeriolizyna O potraktowana cholesterolem ciągle jest zdolna do częściowej integracji z błoną komórki docelowej (42).

Listeriolizyna O jest ważnym czynnikiem wirulencji *Listeria monocytogenes*. Szczepy niehemolityczne, otrzymywane poprzez mutagenезę transpozonową stawały się awirulentne dla myszy (10,11). *Listeria monocytogenes* jest charakteryzowana jako pasożyt wewnątrzkomórkowy. Dzięki wytwarzaniu listeriolizyny O oraz białka ActA (aktyna) bakterie te są zdolne do przemieszczania się między komórkami (43,45,46). W przeciwieństwie do hemolitycznych, niehemolityczne szczepy nie są zdolne do wzrostu wewnątrzkomórkowego. Szczepy niehemolityczne odnajdywane były wprawdzie w mysich makrofagach, ale wykazywały silnie obniżony wskaźnik przeżywalności. Szczepy niehemolityczne były również niezdolne do ucieczki z endosomu i przedostania się do cytoplazmy podczas podziałów. Nie są one również zdolne do wzrostu wewnątrzkomórkowego w hodowlach tkankowych oraz nie ulegają podziałom w tkankach zainfekowanych myszy (10). Klonowanie genu listeriolizyny do szczepu *Bacillus subtilis* spowodowało zdolność transformantów do wzrostu wewnątrz cytoplazmy komórek makrofagopodobnej linii J774. Wystarczył tylko produkt genu *hlyA*, aby *Bacillus subtilis*, niechorobotwórcza bakteria glebowa, stała się patogenem zdolnym do wzrostu wewnątrzkomórkowego (10,11,43).

Oprócz właściwości cytolitycznych LLO związana jest również z aktywacją drażliwego na warunki stresowe czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B u transgenicznych myszy. Wstrzyknięcie dożylnie LLO indukowało aktywację NF- $\kappa$ B w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych linii HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*). Szczepy *Listeria monocytogenes* z mutacją insercyjną w genie *hlyA* nie indukowały NF- $\kappa$ B (47). Listeriolizyna O jest także głównym czynnikiem wydzielanym przez *Listeria monocytogenes* dopełniającym  $\beta$ -hemolizę *Staphylococcus aureus* w teście CAMP. Udowodniono to również dzięki mutacji transpozonowej w genie *hlyA* (48).

W obrębie rodzaju *Listeria* oprócz *Listeria monocytogenes* również *L. ivanovii* i *L. seeligeri* wydzielają hemolizyny aktywowane tiałem. Ivanolizyna i seeligerolizyna wykazują wysoki stopień homologii sekwencji aminokwasowej z listeriolizyną (tab. 1). Białka te reagują krzyżowo z przeciwciałami przeciwko listeriolizynie i streptolizynie. Ustalono, że reakcje krzyżowe przeciwciał anty-LLO z ivanolizyną, seeligerolizyną oraz z innymi toksynami należącymi do grupy TACY, zachodzą dzięki epitopom grupowym, charakterystycznym dla wszystkich aktywowanych cytolizyn. Listeriolizyna O posiada także gatunkospecyficzne epitopy i to właśnie dzięki nim można z dużą skutecznością identyfikować hemolityczne szczepy *Listeria monocytogenes* za pomocą metod serologicznych (40). Ostatnio coraz częściej pojawiają się publikacje wskazujące na możliwość wykrywania bakterii *Listeria monocytogenes* za pomocą metod opartych na znajomości sekwencji nukleotydowej genu kodującego listeriolizynę O. Stosunkowo skuteczną i szybką jest metoda amplifikacji DNA (PCR), w której jako startery służą oligonukleotydy specyficzne dla genu kodującego listeriolizynę (tab. 2) (49). Wadą tej metody jest jednak możliwość występowania pozytywnych wyników amplifikacji DNA pochodzącego z martwych komórek bakteryjnych. W celu wykluczenia fałszywie pozytywnych wyników, stosowana jest metoda RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) (50-53). W metodzie tej wyko-

rzystywane są oligonukleotydy specyficzne dla mRNA, uzyskanego po transkrypcji genu listeriolizyny O (tab. 2) (53). Dla wykrycia produktów po amplifikacji stosowane są metody hybrydyzacji, w których jako sonda używane są biotynylowane, jak również znakowane fluorescencyjnie oligonukleotydy (51-53).

#### 4. Tiolem aktywowane hemolizyny wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Clostridium*

Laseczki zgorzeli gazowej, bakterie *Clostridium perfringens*, wydzielają wiele toksyn. Jedną z nich jest perfringolizyna O (PFO) (54,55). Gen strukturalny *pfo* koduje tiolem aktywowaną cytolizynę o masie cząsteczkowej 53 kDa. Polipeptyd składa się z 499 aminokwasów, w tym znajduje się 27-aminokwasowy peptyd sygnałowy. W obrębie sekwencji obecny jest, charakterystyczny dla TACY jedenastoaminokwasowy peptyd zawierający w swym składzie pojedynczą resztę cysteinową (tab. 1). Sekwencja aminokwasowa perfringolizyny jest najbardziej zbliżona do sekwencji streptolizyny O (65% podobieństwa) oraz do pneumolizyny (45% homologii) (24,25). PFO reaguje krzyżowo z monoklonalnymi przeciwciałami przeciwko pneumolizynie (PLY-4 i PLY-5) (24). Podobnie jak inne aktywowane tiolem cytolizyny perfringolizyna tworzy w błonach łuko- i pierścieniokształtne struktury widoczne w mikroskopie elektronowym. Pierścień o średnicy ok. 24 nm zbudowany jest z części zewnętrznej i wewnętrznej (56). W wyniku analizy krystalograficznej stwierdzono, że aktywna forma PFO jest tetramerem, kształtem przypominającym grzyb. Każda z czterech cząsteczek posiada na C-końcu fragment bogaty w tryptofan. Ten hydrofobowy fragment łączy się z membraną komórki docelowej (4,56,57). Tak jak w przypadku innych TACY miejscem receptorowym na powierzchni błony jest cholesterol. Potwierdzono to w doświadczeniach przeprowadzonych przy użyciu biotynylowanej perfringolizyny. Kompleksy perfringolizyna-biotyna przyłączały się do komórki docelowej w miejscu, w którym zlokalizowany był cholesterol. Barwne kompleksy obserwowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (58). Na podstawie danych uzyskanych dzięki mikroskopii elektronowej skonstruowano trójwymiarowy model perfringolizyny, według którego jej pojedyncza cząsteczka składa się z czterech domen. Czwarta domena odpowiedzialna jest za przyłączanie się do komórki docelowej, tam też zlokalizowany jest konserwowany ewolucyjnie fragment 458 ECTGLAWWWWR468 (tab. 1) (57).

Inna laseczka z rodzaju *Clostridium-Clostridium botulinum*, wytwarza botulinolizynę. Botulinolizyna (BLY), podobnie jak inne cytotoksyny aktywowane tiolem, traci aktywność w warunkach tlenowych (59). Masa cząsteczkowa botulinolizyny wynosi 58 kDa. Dzięki mikroskopii elektronowej wiadomo, że botulinolizyna po przyłączeniu do komórki docelowej formuje pory, których wewnętrzna średnica wynosi  $32 \pm 2,4$  nm, a szerokość ich krawędzi  $6,7 \pm 0,6$  nm. Pory mogą składać się z ponad 50 cząsteczek. Posługując się badaniami *in vitro* stwierdzono, że botulinolizyna najlepiej

przyłącza się do błon erytrocytów w temp. 0°C, ale formowanie porów następuje w temp. 37°C. Oligomeryzacja zostaje zahamowana w przypadku, gdy błony z przyłączoną botulinolizyną zostaną potraktowane jonami  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  lub  $Mg^{2+}$ . Oczyszczona botulinolizyna jest letalna dla myszy i wywołuje efekt cytotoksyczny wobec komórek linii Vero (59).

## 5. Alveolizyna i cereolizyna – hemolizyny wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bacillus*

Alveolizyna jest cytolityczną toksyną bakteryjną wytwarzaną przez *Bacillus alvei*. *Bacillus alvei* jest bakterią glebową, rzadko toksyczną dla ssaków. O przynależności alveolizyny do hemolizyn aktywowanych tiolem decyduje przede wszystkim fakt, że toksyna ta traci swoje cytolityczne właściwości w kontakcie z tlenem. Reaktywacja alveolizyny następuje w obecności związków redukujących, takich jak np. DTT (60-62). Alveolizyna kodowana jest przez gen *alv* (501 p.z., 41% G+C). Jest syntetyzowana jako białko prekursorowe, którego sekwencja sygnałowa składająca się z 32 reszt aminokwasowych zostaje odcięta podczas sekrecji. W rezultacie pozostaje polipeptyd zawierający 469 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 51,766 Da (62). Sekwencja aminokwasowa alveolizyny jest w wysokim stopniu homologiczna z sekwencją aminokwasową listeriolizyny O, perfringolizyny O, streptolizyny O i pneumolizyny. Alveolizyna, podobnie jak większość aktywowanych tiolem cytolizyn, posiada w obrębie C-końcowej części polipeptydu silnie konserwowaną sekwencję jedenastu aminokwasów, w skład których wchodzi pojedyncza reszta cysteinowa (tab. 1) (62). Alveolizyna oprócz tego, że posiada właściwości cytolityczne jest również czynnikiem dopełniającym  $\beta$ -hemolizę *Staphylococcus aureus* w teście CAMP (48).

Kolejna w rodzaju *Bacillus* cytolizyna aktywowana tiolem to cereolizyna. Jest ona jedną z wielu toksyn wydzielanych przez *Bacillus cereus*, bakterię, która jest zarówno popularnym saprofitem glebowym jak i bakterią oportunistyczną mogącą wywoływać zakażenia układu pokarmowego (63). *Bacillus cereus* produkuje różnorodne toksyny zewnątrzkomórkowe, takie jak np. fosfolipaza C, sfingomielinaza i hemolizyny. Cereolizyna jest hemolizyną aktywowaną przez związki tiolowe (np. DTT) oraz inaktywowaną przez cholesterol, czyli posiada podstawowe cechy klasyfikujące ją do grupy hemolizyn aktywowanych tiolem. Hybrydyzacja przy użyciu sondy specyficznej dla genu kodującego cereolizynę, z DNA chromosomalnym uzyskanym ze szczepu *Streptococcus pyogenes* produkującego streptolizynę O oraz z DNA uzyskanym ze szczepu *Listeria monocytogenes* produkującego listeriolizynę O nie dała pozytywnego wyniku, co sugeruje, że pomiędzy genami kodującymi cereolizynę, listeriolizynę oraz streptolizynę nie ma wysokiej homologii (64). Podobnie jak u innych białek należących do grupy TACY w pobliżu końca C sekwencji aminokwasowej cereolizyny obecny jest charakterystyczny jedenastoaminokwasowy peptyd zawierający w swym składzie pojedynczą resztę cysteinową (tab. 1).

## 6. Pyolizyna – tiolem aktywowana hemolizyna wydzielana przez *Arcanobacterium*

Pyolizyna (PLO) wydzielana jest przez *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*. *A. pyogenes* to Gram-dodatnie pałeczki, beztlenowe (65). Bakterie te powodują wiele schorzeń u zwierząt, np. zapalenie sutka u krów, ropnie u bydła, owiec i psów. Pyolizyna wydzielana przez *A. pyogenes* jest zaliczana do grupy hemolizyn aktywowanych tiolem chociaż nie jest wrażliwa na działanie tlenu i nie ulega aktywacji za pomocą związków tiolowych (65). Posiada natomiast wiele innych cech wspólnych z białkami należącymi do grupy TACY. PLO jest białkiem o masie cząsteczkowej 57,9 kDa. Sekwencja aminokwasowa pyolizyny wykazuje 30-40% homologii w stosunku do sekwencji aminokwasowej cytolizyn aktywowanych tiolem. W sekwencji aminokwasowej C-końca obecny jest fragment w znacznej części podobny do konserwowanej sekwencji bogatej w tryptofan (tab. 1). Tak jak inne toksyny należące do TACY pyolizyna jest wrażliwa na działanie cholesterolu (65). Oprócz właściwości hemolitycznych wykazuje toksyczność w stosunku do makrofagów i komórek makrofagopodobnych J774 (66). W doświadczeniach wykonanych na modelu mysim wykazano, że pyolizyna jest ważnym czynnikiem wirulencji *A. pyogenes*. Szczepionka zawierająca zainaktywowane białko okazała się skuteczną metodą ochrony przed działaniem *A. pyogenes* (65,66). Zastosowanie przeciwciał specyficznych wobec pyolizyny całkowicie hamuje aktywność hemolityczną. Oznacza to, że u *Arcanobacterium pyogenes* występuje tylko jeden czynnik o aktywności hemolitycznej (65). Również inaktywacja genu *plo* poprzez mutację insercyjną doprowadziła do zaniku ekspresji białka PLO oraz do utraty aktywności hemolitycznej (66).

## 7. Aktywowane tiolem hemolizyny występujące u bakterii Gram-ujemnych

Aktywowane tiolem cytolizyny są charakterystyczne głównie dla bakterii Gram-dodatnich. Wśród bakterii Gram-ujemnych hemolizynę aktywowaną tiolem wytwarzają tylko bakterie z rodzaju *Klebsiella*, które do niedawna uważane były za niehemolityczne (1). Zarówno *Klebsiella pneumoniae* (5-7) jak i *Klebsiella oxytoca* (8), posiadają aktywność hemolityczną w stosunku do erytrocytów króliczych. Hemolizę obserwowano po zastosowaniu inkubacji hodowli w  $\beta$ -merkaptoetanolu jako czynnikiem redukującym (6). Stwierdzono inaktywację hemolizyny w kontakcie z tlenem. Określono ciężar molekularny klebolizyny wydzielanej przez *Klebsiella pneumoniae*. Posługując się metodą sączenia molekularnego i elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących uzyskano dwie wartości: 8400 i 19 000 Da, natomiast stosując elektroforezę SDS – poliakrylamidową uzyskano wartości 15 500 i 27 000 Da (7). Ustalono, że klebolizyna ulega inaktywacji w obecności cholesterolu oraz reaguje krzyżowo z przeciwciałami przeciwko streptolizynie O (5,6). Nie wiadomo nic o składzie aminokwasowym klebolizyny, ale na podstawie jej właściwości

można przypuszczać, że struktura klebolizyny podobna jest do struktury białek należących do grupy TACY (1).

## 8. Podsumowanie

Najnowsze osiągnięcia biochemii, inżynierii genetycznej i mikroskopii pozwoliły lepiej poznać naturę białek należących do grupy cytolizyn aktywowanych tiolem. Ustalono, że najbardziej istotną wspólną cechą tych białek nie jest aktywacja tiolem, ale ich zdolność przyłączania się do błon komórek docelowych w miejscu, w którym wbudowany jest cholesterol oraz to, że tworzą w błonach pory. Dlatego istnieją sugestie, aby zrezygnować z nazwy cytolizyny aktywowanej tiolem TACY (*thiol-activated cytolysins*) na rzecz nazwy toksyny wiążące cholesterol, tworzące pory – CHOP (*cholesterol binding, pore-forming toxins*) (3). W polskiej nomenklaturze powinno to brzmieć toksyny cholesterolozależne. Białka te charakteryzują się bardzo podobną sekwencją aminokwasową, szczególnie jeśli porównywany jest C-koniec (ok. 40% homologii), który jest silniej ewolucyjnie konserwowany niż zawierający sekwencję sygnałową N-koniec. Następstwem podobieństwa struktury białek są ich krzyżowe reakcje serologiczne. Związane są one głównie z wysoką homologią sekwencji aminokwasowej w okolicy C-końca, w której występuje charakterystyczny 11-aminokwasowy peptyd (ECTGLAWEWWR) bogaty w reszty tryptofanu (tab. 1). Peptyd ten odpowiedzialny jest za przyłączanie się toksyn do błon komórek docelowych, w miejscu występowania cholesterolu. W błonach dochodzi do oligomeryzacji i tworzenia transbłonowych struktur. Dowiedziono, że toksyny cholesterolozależne są niewątpliwym czynnikiem wirulencji bakterii, które je wydzielają. Wiadomo, że oprócz bardzo widocznych niekiedy właściwości cytolitycznych, ich niecytolityczne stężenia oddziałują na komórki układu odpornościowego. Poznanie właściwości tych cytolizyn i mechanizmów odpowiedzialnych za ich syntezę spowodowało, że coraz częściej przy identyfikacji bakterii wytwarzających te toksyny, wykorzystywane są nie tylko metody serologiczne wskazujące obecność toksyn, ale również metody molekularne za pomocą których wykrywa się kodujące je geny. Konwencjonalne metody ustalania czynnika etiologicznego zakażeń bakteryjnych są skuteczne, ale czasochłonne. Coraz częściej w literaturze pojawiają się publikacje wskazujące na możliwość wykrywania bakterii przy użyciu stosunkowo szybkiej metody amplifikacji kwasów nukleinowych – PCR (*polymerase chain reaction*), w której jako startery służą oligonukleotydy specyficzne dla genów kodujących toksyny bakteryjne. Szczególnie przydatna, jak się wydaje, jest metoda RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), dzięki której możliwe jest wykrywanie żywych bakterii. Do tej pory w publikacjach na temat toksyn cholesterolozależnych najczęściej opisywane są badania nad możliwością zastosowania markerów molekularnych służących do wykrywania genów kodujących pneumolizynę i listeriolizynę O. Białka te są, jak dotąd, najlepiej poznanyymi cytolizynami cholesterolozależnymi, zarówno

pod względem właściwości biochemicznych, jak i aktywności toksycznej wobec komórek ludzkiego organizmu. Wykrycie obecności genów kodujących toksyny świadczy o możliwości potencjalnego zagrożenia ze strony bakterii, które je wytwarzają. Udowodniono, że toksyny cholesterolozależne wytwarzane przez inne gatunki bakterii są również istotnym czynnikiem wirulencji. Uzasadnione są, jak się wydaje, prace prowadzące do skonstruowania specyficznych i czułych zestawów diagnostycznych służących do wykrywania bakterii wytwarzających toksyny cholesterolozależne zarówno w materiałach klinicznych, jak i do wczesnego wykrywania w produktach żywnościowych.

## Literatura

1. Braun V., Focareta T., (1991), *Crit. Rev. Microbiol.*, 18, 115-158.
2. Goebel W., Chakraborty T., Kreft J., (1988), *Antonie van Leeuwenhoek*, 54, 453-463.
3. Billington S. J., Jost B. H., Songer J. G., (2000), *FEMS Microbiol Lett.*, 182, 197-205.
4. Jacobs T., Cima-Cabal M. D., Darji A., Mendez F. J., Vazquez F., Jacobs A. A. C., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Weiss S., de los Toyos J.R., (1999), *FEBS Lett.*, 459, 463-466.
5. Albesa I. J., (1989), *App. Bact.*, 67, 263-266.
6. Albesa I., Barberis L. I., Pajaro M. C., Farnochi M. C., Eraso A. J., (1985), *Can. J. Microbiol.*, 31, 297-300.
7. Barberis L. I., Eraso A. J., Pajaro M. C., Albesa I., (1986), *Can. J. Microbiol.*, 32, 884-888.
8. Szramka B., Kurlenda J., Bielawski K., (1998), *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 50, 207-213.
9. Jacobs T., Darji A., Frahm N., Rohde M., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S., (1998), *Mol. Microbiol.*, 28, 1081-1089.
10. Bielecki J., (1994), *Post. Mikrobiol.*, 1, 85-104.
11. Bielecki J., Youngman P., Connelly P., Portnoy D. A., (1990), *Nature*, 345, 175-176.
12. Shanley T. P., Schirer D., Kapur V., Kehoe M., Musser J. M., Ward P. A., (1996), *Infect. Immun.*, 64, 870-877.
13. Pinkney M., Kapur V., Smith J., Weller U., Palmer M., Glanville M., Messner M., Musser J. M., Bhakdi S., Kehoe M. A., (1995), *Infect. Immun.*, 63, 2776-2779.
14. Walev I., Palmer M., Valeva A., Weller U., Bhakdi, S., (1995), *Infect. Immun.*, 63, 1188-1194.
15. Sekiya K., Danbara H., Yase K., Futaesaku Y., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 6998-7002.
16. Sekiya K., Satoh R., Danbara H., Futaesaku Y., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 5953-5961.
17. Engel F., Blatz R., Schliebs R., Palmer M., Bhakdi S., (1998), *Infect. Immun.*, 66, 343-346.
18. Whatmore A. M., King S. J., Doherty N. C., Sturgeon D., Chanter N., Dowson C. G., (1999), *Infect. Immun.*, 67, 2776-2782.
19. Morgan P. J., Hyman S. C., Byron O., Andrew P. W., Mitchell T. J., Rowe A. J., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 2531-25320.
20. Alcantara R. B., Preheim L. C., Gentry M. J., (1999), *Infect. Immun.*, 67, 2862-2866.
21. Berry A. M., Alexander J. E., Mitchell T. J., Andrew P. W., Hansman D., Paton J. C., (1995), *Infect. Immun.*, 63, 1969-1974.
22. Berry A. M., Ogunniji A. D., Miller D. C., Paton J. C., (1999), *Infect. Immun.*, 67, 981-985.
23. Korchev Y. E., Bashford C. L., Pederzoli C., Pasternak C. A., Morgan P. J., Andrew P. W., Mitchell T. J., (1998), *Biochem. J.*, 329, 571-577.
24. DeLos Toyos J. R., Mendez F. J., Aparicio J. F., Vazquez F., Maria Del Mar Garcia Suarez, Fleites A., Hardisson C., Morgan P. J., Andrew P. W., Mitchell T. J., (1996), *Infect. Immun.*, 64, 480-484.
25. Rossjohn J., Gilbert, R. J. C., Crane D., Morgan P. J., Mitchell T. J., Rowe A. J., Andrew P. W., Paton J. C., Tweten R. K., Parker M. W., (1998), *J. Mol. Biol.*, 284, 449-461.

26. Gilbert R. J. C., Rossjohn J., Parker M. W., Tweten R. K., Morgan P. J., Mitchell T. J., Errington N., Rowe A. J., Andrew P. W., Byron O., (1998), *J. Mol. Biol.*, 284, 1223-1237.
27. Gilbert R. J. C., Jimenez J. L., Chen S., Tickle I., Rossjohn J., Parker M., Andrew P. W., Saibil H. R., (1999), *Cell*, 97, 647-655.
28. Gilbert R. J. C., Heenan R. K., Timmins P. A., Gingles N. A., Mitchell T. J., Rowe A. J., Rossjohn J., Parker M. W., Andrew P. W., Byron O., (1999), *J. Mol. Biol.*, 293, 1145-1160.
29. Winter A. J., Commis S. D., Osborne M. P., Tarlowe M. J., Stephen J., Andrew P. W., Hill J., Mitchell T. J., (1997), *Infect. Immun.*, 65, 4411-4418.
30. Braun J. S., Novak R., Gao G., Murray P. J., Shenep J. L., (1999), *Infect. Immun.*, 67, 3750-3756.
31. Benton K. A., Everson M. P., Briles D. E., (1995), *Infect. Immun.*, 63, 448-455.
32. Benton K. A., van Cot J. L., Briles D. E., (1998), *Infect. Immun.*, 66, 839-842.
33. Toikka P., Nikkari S., Ruuskanen O., Leinonen M., Mertsola J., (1999), *J. Clin. Microbiol.*, 37, 633-637.
34. Cima-Cabal M. D., Vazquez F., DeLos Toyos J. R., Mendez F. J., (1999), *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1964-1966.
35. Charland N., Nizet V., Rubens C. E., Kim K. S., Lacouture S., Gottschalk M., (2000), *Infect. Immun.*, 68, 637-643.
36. Okwumabua O., Abdelmagid O., Chengappa M. M., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 181, 113-121.
37. Segers R. P. A. M., Kenter T., de Haan A. M., Jacobs A. A. C., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 167, 255-261.
38. Nagamune H., Ohnishi C., Katsura A., Foshitani K., Whiley R.A., Tsuji A., Matsuda Y., (1996), *Infect. Immun.*, 64, 3093-3100.
39. Nagamune H., Whiley R. A., Goto T., Inai Y., Maeda T., Hardie J. M., Kourai H., (2000), *J. Clin. Microbiol.*, 38, 200-226.
40. Erdenlig S., Ainsworth A. J., Austin F. W., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2827-2832.
41. Kuhn M., Goebel W., (1998), *Trends in Microbiology*, 6, 11-15.
42. Thompson R. J., Bouwer H. G. A., Portnoy D. A., Frankel F. R., (1998), *Infect. Immun.*, 66, 3552-3561.
43. Moors M. A., Levitt B., Youngman P., Portnoy D. A., (1999), *Infect. Immun.*, 67, 131-139.
44. Domann E., Chakaborty T., (1989), 17, 6406.
45. Appelberg R. and Leal I. S., (2000), *Inf. Immun.*, 68, 912-914.
46. Gedde M. M., Higgins D. E., Tilney L. G., Portnoy D. A., (2000), *Infect. Immun.*, 68, 999-1003.
47. Kayal S., Lilienbaum A., Poyart C., Memet S., Israel A., Berche P., (1999), *Mol. Microbiol.*, 31, 1709-1722.
48. Ripio M.-T., Geoffroy C., Dominguez G., Alouf J. E., Vasquez-Boland J. A., (1995), *Res. Microbiol.*, 146, 303-313.
49. Paziak-Domańska B., Bogusławska E., Więckowska-Szakiel M., Kotłowski R., Różalska B., Chmiela M., Kur J., Dąbrowski W., Rudnicka W., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 171, 209-214.
50. Klein P. G., Juneja V. K., (1997), *App. Env. Microbiol.*, 63, 4441-4448.
51. Blais B. W., Turner G., Sooknanan R., Malek L. T., (1997), *App. Env. Microbiol.*, 63, 310-313.
52. Bassler H. A., Flood S. J., Livak K. J., Marmaro J., Knorr R., Batt C. A., (1995), *App. Env. Microbiol.*, 61, 3724-3728.
53. Norton D.-M., Batt C., (1999), *App. Env. Microb.*, 65, 2122-2127.
54. Petit L., Gibert M., Popoff M. R., (1999), *Trends in Microbiology*, 7, 104-110.
55. Rod J., (1998), *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, 333-360.
56. Sugahara M., Seikino-Suzuki N., Ohno-Iwashita Y., Miki K., (1996), *J. Crystal Growth*, 168, 288-291.
57. Rossjohn J., Feil S. C., McKinstry W. J., Tweten R. K., Parker M. W., (1997), *Cell*, 89, 685-692.
58. Iwamoto M., Morita I., Fukuda M., Murota S., Ando S., Ohno-Iwashita Y., (1997), *Bioch. Bioph. Acta*, 1327, 222-230.
59. Sekiya K., Danbara H., Futaesaku Y., Haque A., Sugimoto N., Matsuda M., (1998), *Infect. Immun.*, 66, 2987-2990.
60. Geoffroy Ch., Alouf J. E., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 9968-9972.



61. Geoffroy Ch., Gilles A. M., Alouf J. E., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, 781-788.
62. Geoffroy Ch., Mengaud J., Alouf J. E., Cossart P., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 7301-7305.
63. Gilmore M. S., Cruz-Rodz A. L., Leimeister-Wachter M., Kreft J., Goebel W., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 744-753.
64. Kreft J., Berger H., Hartlein M., Muller B., Weidinger G., Goebel W., (1983), *J. Bacteriol.*, 155, 681-689.
65. Billington S. J., Jost B. H., Cuevas W. A., Bright K. R., Songer J. G., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 6100-6106.
66. Jost B. H., Songer J. G., Billington S. J., (1999), *Infect. Immunn.*, 67, 1723-1728.