

GENETYCZNA KONTROLA WYBRANYCH CECH ZJADLIWOŚCI
BAKTERII*

WŁADYSŁAW J. H. KUNICKI - GOLDFINGER

Instytut Mikrobiologii UW, Warszawa

Dziękując Organizatorom Sympozjum za zaproponowanie mi wygłoszenia tego referatu, pragnę jednocześnie usprawiedliwić się, dlaczego — jako nieparazytolog — podjąłem się tego zadania. Stosunki pasożyt - żywiciel badane są na wielu poziomach: ekologicznym, morfologicznym, fizjologicznym, a ostatnio także na najniższym dostępnym poziomie — molekularnym. Pełne wyjaśnienie problemu będzie owocem prac prowadzonych na tych wszystkich poziomach. Jako bakteriologowi i genetykowi molekularnemu bliższy mi jest właśnie poziom molekularny. Tak się jednocześnie składa, że spośród układów pasożyt - żywiciel najwięcej wiemy o molekularnych interakcjach między bakteriami i wirusami a zakażanymi przez nie organizmami gospodarzy. Zdaję sobie sprawę, że współdziaływanie pasożyta zwierzęcego, zwłaszcza należącego do *Metazoa*, a jego gospodarzem jest na pewno o wiele bardziej skomplikowane i czynne są w nim dodatkowe mechanizmy, nie spotykane w infekcjach bakteryjnych. Sądzę niemniej, że pewne podstawowe zjawiska i mechanizmy kształtujące te relacje są wspólne wszystkim pasożytom wewnętrznym, niezależnie od ich systematycznej przynależności. Dlatego też będę mówił o molekularnych interakcjach pasożyt bakteryjny - gospodarz zwierzęcy (lub człowiek) ufając, iż wykryte tu zjawiska i zarysowujące się możliwości szukania ogólnych prawidłowości mogą być przydatne i w parazytologii, choć rzecz jasna nie należy ich przenosić na inny poziom zbyt pochopnie.

W układzie bakteria pasożyt - gospodarz wykryć można pewne warunki konieczne, bez których spełnienia stosunek pasożytnictwa nie

* Referat wygłoszony na sympozjum pt. „Genetyczne problemy w parazytologii”, które odbyło się w Warszawie, dnia 25 XI 1977 r.

może się ustalić. Tymi warunkami są: 1) wniknięcie zarazka do organizmu zakażanego, 2) możliwość rozmnażania się bakterii w tym organizmie, 3) zdolność bakterii do przeciwstawienia się mechanizmom obronnym gospodarza i 4) uszkodzenie funkcjonalno - strukturalne gospodarza. Trzy pierwsze warunki spełniane są także w przypadkach pasożytnictwa nieantagonistycznego (symbiozy i komensalizmu), wszystkie cztery — w przypadkach pasożytnictwa antagonistycznego. Określamy wtedy pasożyta jako patogenego. Pojęcia patogenności i zjadliwości (wirulencji) nie są dokładnie zdefiniowane. Ogólnie możemy powiedzieć, że patogenym lub zjadliwym drobnoustrojem jest ten, który spełnia wszystkie cztery, wyliczone uprzednio, warunki. Z tym, że cechą patogenności przypisujemy zwykle gatunkowi: *Salmonella typhi* lub *Vibrio cholerae* są patogenne, *Escherichia coli* — warunkowo patogenna, *Azotobacter* jest niepatogeny. Cecha zjadliwości przypisywana bywa szczepowi: określony szczep *E. coli* nazywamy zjadliwym, znamy niezjadliwe szczepy *Salmonella* itd.

Wyliczone cztery warunki zjadliwości dotyczą mechanizmów wzajemnego oddziaływania między zarazkiem a gospodarzem. Mechanizmy te zależą od funkcji i właściwości obu partnerów. W obecnych rozważaniach ograniczymy się jednak tylko do mechanizmów zależnych od funkcji i właściwości pasożyta bakteryjnego. Nawet po takim zawężeniu problematyki byłaby ona za szeroka na jeden wykład. Celowe wydaje się zatem dalsze ograniczenie tematyki. Nasuwa to konieczność wyboru. Wyboru tego dokonałem arbitralnie, wykład swój poświęcając roli właściwości warstw powierzchniowych komórki bakteryjnej w spełnianiu znanych już nam czterech warunków zjadliwości. Pomiemy zatem ważne zagadnienie toksyn bakteryjnych i endotoksyn, choć w spełnianiu czwartego warunku (uszkodzenie organizmu gospodarza) pełnią one, a zwłaszcza pierwsze z nich, niewątpliwie najistotniejszą rolę. Wybór, aczkolwiek arbitralny, nie jest jednak zupełnie przypadkowy i to co najmniej z trzech powodów. Po pierwsze, dlatego że właściwości powierzchni komórki odgrywają podstawową rolę we wszelkich, jak się wydaje, interakcjach między komórkami. Po drugie, dlatego że ostatnio zgromadzono wiele nowych wiadomości na temat znaczenia struktur powierzchniowych, specjalnie w procesach swoistej adhezji i wnikania zarazków. Po trzecie wreszcie dlatego, że zjawiska te bez wątpienia muszą mieć znaczenie również w badaniach parazytologicznych. Określiśmy w ten sposób, po przydługim wstępie, zakres wykładu. Nic nie stoi na przeszkodzie by go zacząć.

Historia zaczęła się 27 lat temu, gdy Burnet stwierdził, iż hemaglutynacja wywoływana przez wirusa grypy zależna jest od interakcji między jakimś skałdnikiem błony erytrocytów a cząstką wirusową, przy

czym interakcja ta modyfikuje w sposób swoisty powierzchnię komórki. Z czasem wykazano, że substancją w błonie krwinek reagującą z wirusem jest kwas sialowy (acetylowany kwas neuroaminowy), a substancją wirusową odpowiedzialną za reakcję jest enzym — neuroamidaza, odszczepiający kwas sialowy. Kwas sialowy normalnie związany jest z komponentą cukrową glikoproteidów błony.

W ciągu ostatnich lat zebrano wiele obserwacji świadczących, że glikoproteidy są powszechnie występującymi elementami swoistego wyznakowania komórek zwierzęcych. Wyznakowanie to określa swoistość gatunkową, szczerpową i osobniczą komórek, a także swoistość narządową, tkankową i rozwojową. Problem ten wykracza poza ramy artykułu, toteż ograniczymy się tu do podania kilku przykładów. Komórki pochodzące z określonego narządu jakiegoś gatunku mają zdolność rozpoznawania sobie podobnych. Jeśli zhomogenizujemy tkankę lub narząd jakiegoś zwierzęcia, tak aby otrzymać oddzielne komórki, a następnie zmieszamy je z podobnie przygotowanymi komórkami innego narządu lub innego zwierzęcia, to po pewnym czasie nastąpi reagregacja komórek. Okaze się wtedy, że powstające agregaty będą się składały z komórek określonego narządu określonego gatunku zwierzęcia. Komórki znajdujące się w mieszaninie rozpoznają zatem sobie podobne. Za wzajemne rozpoznanie identycznych komórek odpowiedzialna jest specjalna substancja, nazwana czynnikiem agregacji. W niektórych przypadkach udało się już wyisobnić i scharakteryzować takie czynniki, np. czynnik reagregacji, czynny w stosunku do komórek siatkówki z płodu, okazał się białkiem, o ciężarze cząsteczkowym 50 000 daltonów, związanym z komponentą cukrową, stanowiącą poniżej 15% masy cząsteczki. Komponenta cukrowa zawiera galaktozę, mannozę i glukozaminę, związane z kwasem sialowym, występującym w ilości 1-2 cząsteczek na cząsteczkę glikoproteidu (Moscona, Hausman, Moscona, 1975). Glikoproteidy decydują o swoistości systemu zgodności tkankowej (McDevitt, 1976). Jak wykazały badania Jacoba i Bennet, glikoproteidy związane z β -mikroglobuliną wyznakowują komórki w określonych stadiach embriogenezy myszy, a ich brak blokuje proces rozwoju (Levin, 1976). Wyznakowanie glikoproteidowe jest więc zjawiskiem powszechnym i odgrywa podstawową rolę w interakcjach międzykomórkowych, a nawet wewnątrzkomórkowych. Zainteresowani sięgnąć mogą do licznych już dziś monografii i przeglądów, np. Moscona (1974), Smith i Good (1969).

Swoistość wyznakowania warunkowana jest rodzajem terminalnych grup cukrowych (Ashwell, Morell, 1977). Nie w pełni wyjaśniono pytanie, na czym polega rozpoznawanie wyznakowania. Roseman (1974) wysunął hipotezę, wedle której kluczową rolę odgrywają w tym procesie transferazy glikozydowe. Enzymy te miałyby swoście reagować z cuk-

rem jednej komórki, a następnie z akceptorami glukozyłowymi innej rozpoznawanej komórki. Hipoteza ta została zakwestionowana przez Ashwella i Morella (1977). Ashwell jeszcze w 1968 r. zauważył, że glikoproteid, ceruloplazmina, po dożylnym podaniu zwierzęciu doświadczalnemu pozostaje wykrywalna we krwi w ciągu wielu dni. Ta sama ceruloplazmina, po enzymatycznym usunięciu z jej cząsteczki kwasu sialowego, podana dożylnie zwierzęciu znika z krążenia w ciągu kilku minut. Jak pokazały to dalsze badania, podobnie wpływa na pozostawanie we krwi innych glikoproteidów usunięcie z ich cząsteczek kwasu sialowego. Okazało się, że pozbawione kwasu sialowego glikoproteidy są rozpoznawane w wątrobie, pochłaniane przez hepatocyty, w których wnikają do lizosomów, gdzie podlegają zmetabolizowaniu. W błonie hepatocytów wykryto swoisty receptor rozpoznający takie desialowane glikoproteidy. Receptor ten jest też glikoproteidem zawierającym około 10% składowej cukrowej, składającej się z galaktozy, mannozy, glukozaminy i kwasu sialowego. Jest to białko polimeryczne, o ciężarze około 500 000 daltonów, będące kompleksem mieszaniny dwóch rodzajów białek monomerycznych, o ciężarze cząsteczkowym 40 000 i 48 000 daltonów. Dla reakcji między ceruloplazminą a receptorem konieczna jest obecność jonów Ca^{++} oraz usunięcie z glikoproteidu przynajmniej dwóch z 10 znajdujących się tam cząsteczek kwasu sialowego. Sygnałem rozpoznawczym okazała się reszta galaktozy odsłaniana po usunięciu kwasu sialowego. Białko receptorowe, rozpoznające glikoproteid, nie ma aktywności transferazy glikozydowej, wykazuje natomiast cechy lektyny, tj. aglutynuje erytrocyty, a ponadto ma działanie mitogenne. Obserwacje te świadczą, że w rozpoznaniu uczestniczy białko samo związane z resztą cukrową, ale nie mające aktywności enzymatycznej. Nie wyklucza to oczywiście, że w pewnych etapach procesu rozpoznawania lub w niektórych układach mogą funkcjonować transferazy glikozydowe w sposób podobny do zakładanego przez Rosemana.

Komórki bakteryjne, zakażające organizmy zwierzęce, stykają się z nimi i oddziałują na nie w pierwszym rzędzie poprzez swoją powierzchnię. Powierzchnia bakterii jest okryta wieloma strukturami (otoczki, antygeny powierzchniowe, błona zewnętrzna, ściana komórkowa) zawierającymi cukrowce. Swoistość gatunkową, a także szczepową bakterie zawdzięczają głównie budowie tych cukrowych składników powierzchni.

Jak na wstępie zazaczyliśmy, chorobotwórczość uwarunkowana jest m.in. swoistymi procesami adsorpcji (przylegania) zarazka do komórek zakażanych, zwykle penetracji bakterii do wnętrza komórki i niekiedy przenikania z niej do sąsiednich komórek i tkanek. Czynna infekcja u niektórych bakterii ograniczona jest tylko do pierwszego etapu —

adsorpcji. Przykładem może być przecinkowiec cholery (*Vibrio cholerae*) lub pałeczka krztuśca (*Bordetella pertussis*). Inne zarazki, jak np. pałeczka czerwonej (*Shigella*) i wirusy grypy, wnikają do komórki, na której się uprzednio zaadsorbowały. Wreszcie, pewne bakterie z zakażonej komórki penetrują sąsiednie partie tkanek. Jako przykład można podać paciorkowce, *Salmonella*.

Kontakt zarazka z powierzchnią komórki może być przypadkowy lub zależeć od mniej albo bardziej specyficznie wykształconych dróg jego przenoszenia, które mogą nas tu nie interesować. Natomiast adsorpcja bakterii na powierzchni zakażonej komórki jest niemal zawsze procesem swoistym. Przykładem może być *E. coli*. Szczepy patogenne adsorbują się wybiórczo w ileum na wierzchołkowych partiach kosmków jelitowych (Smith, Pearce, 1972). W przypadkach bliżej zbadanych okazało się, że za adsorpcję odpowiedzialne jest swoiste białko, którego synteza kontrolowana jest w bakterii przez plazmid K88. Szczep po utracie plazmidu staje się awirulentny (Arbuckle, 1972; 1976; Hohmann, Wilson, 1975; Nagy, Moon, Isaacson, 1976; Davidson, Hirsh, 1976; Rutter, 1976; Rutter, Jones, Brown, Burrows, Luther, 1976). Na błonie komórek śluzówki jelit znajduje się jakaś substancja receptorowa, której budowy chemicznej jeszcze nie znamy, wiążąca się swoiście z białkiem kodowanym przez plazmid K88. U świń wykazano, że receptor na śluzówce zależy od obecności jednego genu. Mutacja w tym genie powoduje utratę receptora, a w ślad za tym brak adsorpcji *E. coli* i zwiększoną odporność prosiąt na zakażenie. Cecha ta segreguje zgodnie z regułami Mendla (Rutter 1976, Rutter et al., 1976). Sprawę komplikuje ta okoliczność, że różne patogenne szczepy *E. coli* mogą rozporządzać różnymi substancjami warunkującymi adsorpcję. Tak np. szczepy chorobotwórcze dla cieląt mają inny antygen od jakiego zależy adsorbcja, też kodowany przez plazmid, ale odmiennego typu, np. K99 (Gibbons, van Houte, 1975, Burrows, Sellwood, Gibbons, 1976; Evans, Silver, Evans, Chase, Gorbach, 1975; Guinée, Jansen, Aghtberg, 1976; McNeish, 1975; Ørskov, Ørskov, Smith, Sojka, 1975).

Drugim przykładem są paciorkowce. Paciorkowce pasożytujące w jamie ustnej odznaczają się dużą swoistością adsorpcji. *S. mitis* adsorbuje się do śluzówki jamy ustnej, *S. salivarius* — do języka, a *S. sanguis* i *S. mutans* — do powierzchni zębów. Jak stwierdzono, *S. mutans* adsorbuje się w procesie dwufazowym. Najpierw zachodzi interakcja z glikoproteidami śliny, a następnie z dwoma typami glukanów z powierzchnią zębów. Jeden z tych glukanów, o wiązaniach α -1-6 między glukozami, ma cechy zbliżające go do dekstranu; drugi, charakteryzujący się wiązaniami α -1-3, jest nierozpuszczalny (Gibbons, van Houte, 1975). *Streptococcus pyogenes* przylega za pośrednictwem białka M (Ellen, Gibbons,

1972; Smith, 1977). Wybiórczość adsorpcji nie ogranicza się oczywiście do tych przykładów. *Clostridium perfringens* przylega selektywnie do kosmków jelitowych (Arbuckle, 1972), *Streptococcus agalactiae* i niektóre gronkowce — do śluzówki przewodu mlecznego wymienia (Frost, 1975). Mnożenie dalszych przykładów byłoby jednak zbędne.

Adsorpcja zarazka jest pierwszym etapem infekcji. Po nim zwykle następuje penetracja bakterii do wnętrza komórki. Zjawisko wnikania zarazka do komórki zostało stosunkowo najlepiej poznane w przypadku infekcji *Shigella*. Zawdzięczamy to w dużej mierze opracowaniu względnie prostego testu sprawdzającego. Wnikanie bakterii do komórek kosmków byłoby trudno badać. Okazało się jednak, że można sprawdzać tę reakcję przy zakażeniu spojówki królika. Szczepy odznaczające się zdolnością wnikania do komórek powodują wtedy keratoconjunctivitis; mutanty niezdolne do penetracji, reakcji tej nie wywołują. Dalsze badania wykazały, że cecha penetracji zależy od jednego chromosomalnego genu bakterii, oznaczonego symbolem *kcpA*, sprzężonego blisko z wyznacznikiem *purE* (Formal, Gemski, Gianella, Rout, 1975; LeBrec, Schneider, Magnani, Formal, 1964; Formal, Kent, Austin, LeBrec, 1966; Smith, Pearce, 1972). W penetracji zarazka odgrywa też jakąś dodatkową rolę antygen somatyczny O (Gemski, Sheahan, Washington, Formal, 1972; Formal, LeBrec, Kent, Falkow, 1965; Smith, 1972). Antygen O *Shigella flexneri* zawiera sekwencję: N-acetyloglukozamina, ramnoza, mannoza. Mutanty, które utraciły antygen O są awirulentne i mają naruszony mechanizm wnikania. O tym, że penetracja zależy od współdziałania zarówno produktu genu *kcpA*, jak i antygeny O przekonują nas doświadczenia nad krzyżowaniem *S. flexneri* z *E. coli*. Powstające w wyniku krzyżowania hybrydy, mimo posiadania antygeny *kcpA*, zachowują lub tracą zdolność do wnikania zależnie od budowy antygeny O. Hybryd uzyskujący antygen 08 *E. coli*, zawierający d-mannozę, nie ma możliwości wnikania; inny hybryd, o antygenie *E. coli* 025, zawierającym ramnozę, daje pozytywny test *kcp* (Gemski et al., 1972).

Proces wnikania zarazka jest więc bez wątpienia kontrolowany i regulowany w skomplikowany sposób, przy udziale produktów kilku genów, zapewne odmiennie u różnych drobnoustrojów. U *Salmonella* np. wnikanie zależy w mniejszym stopniu od antygeny O niż u *Shigella*. Czynna jest tu jakaś substancja rozpuszczalna, produkowana przez bakterię, bowiem reakcję komórki zakażanej obserwuje się już, gdy bakteria jeszcze nie przylega do niej, a nawet jest od niej znacznie odległa (do 350 μm) (Smith, 1977).

Po wniknięciu, bakteria — jeśli ma wywołać chorobę — musi się namnożyć. Zdolność do rozmnażania wewnątrz zakażonej komórki zależy od wielu czynników i jest regulowana w jeszcze bardziej złożony

sposób. U wspomnianej *S. flexneri* wykryto gen vir, leżący w chromosomie między wyznacznikami xyl i mal, a wkrótce potem inny gen wirulencji, nie aleliczny z poprzednim. Geny te nie warunkują penetracji, lecz zdolność przeżycia bakterii w zakażonej komórce. Mechanizm tego zjawiska nie jest w tej chwili poznany (Timakov, Petrovskaya, 1972; Falkow, Schneider, Baron, Formal, 1963). Zdolność przeżycia może zależeć od czynników pokarmowych. Pierwsze badania tego rodzaju wykonano blisko trzydzieści lat temu. Stwierdzono, że mutanty auksotroficzne *Salmonella typhimurium*, o nie zmienionych właściwościach antygenowych, mają wyraźnie obniżoną wirulencję. Np. mutant wymagający puryn i mutant nie syntetyzujący kwasu para - aminobenzoesowego przy eksperymentalnym zakażeniu myszy były prawie niepatogenne. Jednocześnie podawanie zwierzętom brakujących czynników wzrostowych lub mieszane zakażeniu obu mutantami, gdy mogły one wzajemnie uzupełniać swoje zapotrzebowania pokarmowe, przywracało pełną wirulencję. W zdolności bakterii do rozmnażania w zakażonym organizmie znaczną rolę odgrywa zaspokojenie ich zapotrzebowania na mikroelementy. W transporcie jonów metalicznych do wnętrza komórki bakteryjnej często biorą udział występujące naturalnie związki chelatujące. Zjawisko to względnie najlepiej poznano przy badaniu pobierania żelaza. Bakterie wytwarzają i wydalają pozakomórkowo tego rodzaju substancje chelatujące żelazo i ułatwiające wnikanie jego do komórki, tzw. siderochromy. Tak więc *E. coli* produkuje enterocholinę. Jest to mieszanina dwóch pochodnych aromatycznych: kwasu 2,3 - dwuhydroksybenzoesowego i jego połączenia z seryną (Miles, Khinji, 1975; Sussman, 1974). Awirulentny mutant *E. coli* stawał się zdolny do wywołania zakażenia, gdy podawano go zwierzęciu łącznie z enterocholiną otrzymaną ze szczepu zjadliwego (Rogers, 1973). Związek o podobnym działaniu, zwany mykobaktyną, wytwarza *Mycobacterium tuberculosis*. W organizmie zwierzęcym bakteria może być pozbawiona dostatecznego zaopatrzenia w żelazo nie tylko dlatego, że brak go w środowisku lub że bakteria nie tworzy siderochromów, ale dlatego, iż żelazo jest silnie wiązane przez składniki organizmu. Na przykład hamowanie wzrostu *Yersenia* przez surowicę krwi przypisuje się obecności w niej transferyn i laktoferyn, wiążących żelazo silniej niż bakteryjny siderochrom.

Budowa powierzchniowych warstw bakterii decyduje też o ochronie jej przed hamującym lub zabójczym działaniem mechanizmów obronnych organizmu zwierzęcego. Antygen O *Enterobacteriaceae* chroni je w pewnym stopniu przed wchłonięciem przez fagocyty. Mutanty *E. coli*, których komponenta cukrowa nie zawiera kolitozy, są bardziej podatne na fagocytozę; podatność ta zwiększa się jeszcze bardziej przy dodatkowym braku galaktozy, glukozy i N - acetyloglukozaminy. Podobny efekt

u *S. typhimurium* wywołuje brak w antygenie O abekwozy, mannozy i ramnozy (Smith, 1976). Powierzchniowe antygeny, takie jak Vi u *S. typhi* lub K u *E. coli*, stanowią jeszcze silniejszą ochronę przed fagocytozą (Smith, Pearce, 1972; Smith, 1977). Antygenom tym zawdzięczają bakterie także zwiększoną oporność na działanie przeciwciał i dopełniacza (Nicholson, Glynn, 1975; McCabe, Carling, Bruin, Greely, 1975). Powszechnie znana jest ochronna rola śluzów otoczkowych u wielu bakterii chorobotwórczych, np. u dwoinki zapalenia płuc (*Streptococcus pneumoniae*) lub u laseczki wąglika (*Bacillus anthracis*).

Budowa chemiczna wszystkich osłon powierzchniowych komórki bakteryjnej, od ściany komórkowej aż po otoczkę, zależna jest od informacji genetycznej. Zdolność do wytwarzania określonej substancji tego typu jest cechą dziedzicznie przekazywaną, choć może ona być zależna od genów chromosomalnych lub pozachromosomalnych (plazmidowych). Zmienność cech, zależnych od występowania określonych substancji na powierzchni bakterii, może mieć jednak albo charakter genotypowy, albo tylko fenotypowy. Genotyp określa bowiem jedynie potencjalną sposobność komórki do syntezy danej substancji, ale to czy bakteria rzeczywiście ją syntezuje zależy od skomplikowanych mechanizmów regulacji wyrażania informacji genetycznej.

Zmiany informacji genetycznej zachodzić mogą w wyniku spontanicznej lub indukowanej mutacji, w rezultacie rekombinacji genetycznej towarzyszącej koniugacji, transdukcji lub transformacji, a wreszcie wskutek utraty lub uzyskania plazmidu albo lizogenizacji bakterii przez bakteriofaga łagodnego. Wykazano obecnie, że w organizmie zakażonym mogą zachodzić wszystkie te procesy, choć dotychczas nie jest jasne, jakie jest ich nasilenie w naturze i jaką rolę odgrywają w kształtowaniu naturalnych populacji bakteryjnych. Przekazywanie i rekombinacja plazmidów zdają się jednak odgrywać poważną rolę, zwłaszcza w rozprzestrzenianiu się szczepów opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki. Przemiana populacji bakteryjnej zależy w takich przypadkach nie tylko od zajścia określonego procesu genetycznego, ale w dużej mierze od nakładających się nań zjawisk selekcji.

Jak wspomniano, interesujące nas tu cechy powierzchni bakteryjnej podlegają także silnym i częstym modyfikacjom fenotypowym, pojawiającym się bez zmiany genotypu. Musimy pamiętać, że bakterie w organizmie zakażonym znajdują się w środowisku najzupełniej odmiennym od tego, w jakim żyją na podłożach w warunkach hodowli laboratoryjnych. Przede wszystkim bakterie in vivo rosną bez porównania wolniej niż w laboratorium. Czas generacji bakterii w organizmie zwierzęcym wydłuża się do kilku, często do dziesięciu godzin, nawet u szczepów, które w warunkach laboratoryjnych dzielą się co kilkanaście

lub kilkadziesiąt minut (Smith, 1975, 1977). Wynika to z jednej strony z oddziaływania mechanizmów obronnych organizmu, z drugiej — z często limitowanego zaopatrzenia w pewne czynniki wzrostowe lub mikroelementy. Toteż o zachowaniu się bakterii w czasie wzrostu *in vivo* nie można sądzić na podstawie badań prowadzonych nad normalnymi hodowlami laboratoryjnymi. Pewne, choć też tylko względne zbliżenie do warunków *in vivo* uzyskuje się w różnego typu hodowlach ciągłych, głównie chemostatowych. Liczne prace tego typu (Ellwood, 1974; 1975; Ellwood, Tempest, 1972; Tempest, 1974) wykazują, że modyfikacja warunków hodowli, szczególnie przez ograniczenie zaopatrzenia w jakiś metabolit, bardzo silnie odbija się na interesujących nas tu właściwościach chorobotwórczych bakterii, np. brak glicerolu zwiększa bardzo silnie toksyczność preparatów ściany komórkowej *E. coli*. Finch i Brown (1976) stwierdzili, że ograniczenie zaopatrzenia w magnez powoduje u pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) zmiany antygenów powierzchniowych, większą podatność na lizę pod wpływem polimiksyny, a równocześnie mniejszą podatność na fagocytozę. Podobne zmiany znaleziono u *Bordetella pertussis* (Wardlow, Parton, Hooker, 1976). Hodowla *in vivo* prowadzi do zmiany ujawnianych antygenów oraz zwiększonej oporności na wchłanianie przez fagocyty u pałeczki dżumy (*Yersenia pestis*) lub u pałeczki ronienia zakaźnego u bydła (*Brucella abortus*) (Smith, 1976). Błona bakterii hodowanych *in vivo* albo w chemostacie w warunkach naśladujących warunki *in vivo* staje się bardziej przepuszczalna (Tempest, 1974; Sussman 1974; Smith 1976). Niektóre bakterie wytwarzają *in vivo* formy L, pozbawione ściany i o zupełnie zmienionych antygenach. *B. anthracis* po hodowli *in vivo* staje się podatny na lizę pod wpływem węgla amonowego, choć ta sama bakteria rosnąca na pożywkach laboratoryjnych na związek ten nie jest wrażliwa. *M. tuberculosis* w organizmie zwierzęcym staje się znacznie mniej hydrofobowe niż w hodowli na pożywkach. Kolejno zachodzące przemiany antygenów zaobserwowano *in vivo* u *Vibrio cholerae* (Miller, Wong, Feely, Forbines, 1972) lub u krętka duru powrotnego (*Borrelia recurrentis*) (Smith, 1976).

Opisane tu przykłady fenotypowych zmian struktur powierzchniowych u bakterii mogą mieć różne przyczyny. Mogą one być wynikiem bloków metabolicznych powodowanych przez brak określonych składników pokarmu lub przez obecność inhibitorów reakcji enzymatycznych. Mogą też wynikać z represji albo derepresji określonych operonów. Mechanizmy te są wciąż zaledwie fragmentarycznie i częściowo poznane. Ich znajomość ma jednak nie tylko wartość teoretyczną - poznawczą, ale może się również przyczynić do racjonalizacji zabiegów leczniczych.

Podano tu tylko ogólny szkic zagadnienia genetycznego uwarunko-

wania zjadliwości bakterii zależnej od jednej tylko klasy zjawisk: budowy warstw powierzchniowych i roli glikoproteidów. Niektóre z opisanych zjawisk mogą odgrywać również jakąś rolę w procesach inwazji pasożytniczych, inne przypuszczalnie charakterystyczne są raczej tylko do procesów infekcji bakteryjnych. Mimo to sądzę, że możliwość skonfrontowania osiągnięć i trudności napotykaných przez mikrobiologię i parazytologię, nawet gdy dotyczy tak wąskiego tematu, jak poruszony w obecnym referacie, może okazać się korzystna dla obu stron.

Adres autora:

00-046 Warszawa, Nowy Świat 67

LITERATURA

1. Arbuckle, J. B. R.: The attachment of *Clostridium welchii* (C. *perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. — *J. Path.*, 106, 65: 72, 1972.
2. Arbuckle, J. B. R.: Observations on the association of pathogenic *E. coli* with small intestinal villi of pigs. — *Res. vet. Sci.*, 20, 233 - 236, 1976.
3. Ashwell, G., Morell, A. G.: Membrane glycoproteins and recognition phenomena. — *TIBS*, 76 - 79, 1977.
4. Burrows, M. R., Sellwood, R., Gibbons, R. A.: Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli* — *J. gen. Microbiol.*, 96, 269 - 275, 1976.
5. Davidson, J. N., Hirsh, D. C.: Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. — *Infect. Immun.*, 13, 1773 - 1774, 1976.
6. Ellen, R. P., Gibbons, R. J.: M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. — *Infect. Immun.*, 5, 826 - 830, 1972.
7. Ellwood, D. C., Tempest, D. W.: Effects of environment on bacterial cell wall content and composition. — *Adv. Microb. Physiol.*, 7, 83 - 117, 1972.
8. Ellwood, D. C.: Growth, environment and bacterial toxicity. — *J. med. Microbiol.*, 7, 391 - 393, 1974.
9. Ellwood, D. C.: Variation of cell surfaces in relation to pathogenicity. — *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 3, 72, 1975.
10. Evans, D. G., Silver, R. P., Evans D. J., Chase, D. G., Gorbach, S. L.: Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxinogenic for humans. — *Infect. Immun.*, 12, 656 - 687, 1975.
11. Falkow, S., Schneider, H., Baron, L. S., Formal, S. B.: Virulence of *Escherichia-Shigella* genetic hybrids for the guinea pig. — *J. Bact.*, 86, 1251 - 1258, 1963.
12. Finch, J. E., Brown, M. R. W.: The effect of growth environment on killing of chemostat grown *Pseudomonas aeruginosa* by phagocytes and cationic proteins. — *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 3, 82 - 83, 1976.

13. Formal, S. B., LeBrec, E. H., Kent, T. H., Falkow, S.: Abortive intestinal infection with an *Escherichia coli*-*Shigella flexnerii* hybrid strain. — *J. Bact.*, 89, 1374 - 1382, 1965.
14. Formal, S. B., Kent, T. H., Austin, S., LeBrec, E. H.: Fluorescent - antibody and histological study of vaccinated and control monkeys challenged with *Shigella flexneri*. — *J. Bact.*, 91, 2368 - 2376, 1966.
15. Formal, S. B., Gemski, P., Gianella, R. A., Rout, W. R., Studies on Shigellosis and Salmonellosis. in: Gram - negative Bacterial Infection and Mode of Endotoxic Action. — Ed. B. Urbaschek, R. Urbaschek, N. Neter, Springer Verlag, Heidelberg - New York 1975.
16. Forst, A. J.: Selective adhesion of microorganisms to the ductural epithelium of the bovine mammary gland. — *Infect. Immun.*, 12, 1154 - 1156, 1975.
17. Gemski, P., Sheahan, D. G., Washington, O., Formal, S. B.: Virulence of *Shigella flexneri* hybrid expressing *Escherichia coli* somatic antigens. — *Infect. Immun.*, 6, 104 - 111, 1972.
18. Gibbons, R. J., van Houte, J.: Bacterial adherence in oral microbial ecology. — *A. Rev. Microbiol.*, 29, 19 - 44, 1975.
19. Guinée, P. A. M., Jansen, W. H., Aghtberg, C. M.: Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. — *Infect. Immun.*, 13, 1369 - 1377, 1976.
20. Hohmann, A., Wilson, M. R.: Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to intestinal epithelium in vivo. — *Infect. Immun.*, 12, 866 - 880, 1975.
21. LeBrec, E. H., Schneider, H., Magnani, T. J., Formal, S. B.: Epithelial cell penetration as an essential step in pathogenesis of bacillary dysentery. — *J. Bact.*, 88, 1503 - 1518, 1964.
22. McCabe, W. R., Carling, P. C., Bruin, S., Greely, A.: The relation of K-antigen to virulence of *Escherichia coli*. — *J. inf. Dis.*, 131, 6 - 16, 1975.
23. McDevitt, H. O.: The evolution of genes in the major histocompatibility complex. — *Federation Proc.*, 35, 2168 - 2173, 1976.
24. McNeish, A. S.: Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. — *Lancet*, 11, 946 - 948, 1975.
25. Miles, A. A., Khinji, P. L.: Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection and relation to pathogenicity. — *J. med. Microbiol.*, 8, 477 - 490, 1975.
26. Miller, C. E., Wong, K. H., Feely, J. C., Forbines, M. E.: Immunological conversion of *Vibrio cholerae* in gnotobiotic mice. — *Infect. Immun.*, 6, 739 - 742, 1972.
27. Moscona, A. A., (ed.): The Cell Surface in Development. — John Wiley, New York 1974.
28. Moscona, A. A., Hausman, R. E., Moscona, M.: Experiment on embryonic cell recognition: in search for molecular mechanisms. — *Proc. Xth FEBS Meet.*, 38, 245 - 256, 1975.
29. Nagy, B., Moon, H. W., Isaacson, R. E.: Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ideal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. — *Infect. Immun.*, 13, 1214 - 1220, 1976.
30. Nicholson, A. M., Glynn, A. A.: Investigation of the effect of K antigen in *Escherichia coli* urinary tract infections by use of the mouse model. — *Brit. J. exp. Path.*, 54, 549 - 553, 1975.

31. Ørskov, J., Ørskov, F., Williams Smith, H., Sojka, W. J.: The establishment of K99, a thermostabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called „Kco”, possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. — *Acta path. microbiol. scand.*, Sec. B, 83, 31 - 36, 1975.
32. Rogers, H. J.: Iron-binding catechols and virulence in *Escherichia coli*. — *Infect. Immun.*, 7, 445 - 456, 1973.
33. Roseman, S.: Complex carbohydrates and intercellular adhesion. in: *The Cell Surface in Development*. — Ed. Moscona A. A., John Wiley, New York 1974.
34. Rutter, J. M.: Genetic resistance to *Escherichia coli* infection. — *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 3, 107, 1976.
35. Rutter, J. M., Jones, G. W., Brown, G. T. H., Burrows, R. M., Luther, P. D.: Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K - 88 positive *Escherichia coli*. — *Infect. Immun.*, 13, 667 - 676, 1976.
36. Smith, R. T., Good, R. A.: *Cellular Recognition*. — North Holland Publ. co., Amsterdam 1969.
37. Smith, H.: Mechanisms of virus pathogenicity. — *Bact. Rev.*, 36, 281 - 310, 1972.
38. Smith, H., Pearce, J. H.: *Microbial Pathogenicity in Man and Animals*. — Symp. Soc. Gen. Microbiol., 22, 1972. Cambridge Univ. Press.
39. Smith, H.: Gram-negative bacteria: the determinants of pathogenicity. in: *Gram-negative Bacterial Infections and Mode of Endotoxic Action*. — Ed.: B. Urbaschek, R. Urbaschek, E. Neter, Springer Verlag, Heidelberg - New York, 1975.
40. Smith, H.: Survival of vegetative bacteria in animals. — *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 26, 299 - 326, 1976.
41. Smith, H.: Microbial surfaces in relation to pathogenicity. — *Bact. Rev.*, 41, 475 - 500, 1977.
42. Sussman, M.: Iron and infection. — in: *Iron in Biochemistry and Medicine*. — Ed. A. Jacobs, M. Worwood, Academic Press, London - New York 1974.
43. Tempest, D. W.: Adaptation of microorganisms to growth limiting environments. — *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 2, 1 - 2, 1974.
44. Timakov, V. D., Petrovskaya, V. G.: *Biologia i Genetika Shigella flexneri*. — Medicina, Moskva 1972.
45. Wardlow, A. C., Parton, R., Hooker, M. J.: Loss of protective antigen, histamine-sensitizing factor, and envelope polypeptides in cultural variants of *Bordetella pertussis*. — *J. med. Microbiol.*, 9, 89 - 100, 1976.

THE GENETIC CONTROL OF BACTERIAL VIRULENCE

by

WŁADYSŁAW J. H. KUNICKI-GOLDFINGER

The author discusses some aspects of host-parasite relationship, referring to the bacteria or viruses and the host organism, studied on the molecular level. The subject of the lecture has been limited mainly to the questions of the properties of surface structures of bacterial cell, determining its pathogenicity.

The host-parasite relationship in a form of an infective disease may be established, only if four conditions are being fulfilled: entry to the host organism, reproduction, resistance against host immune system, and functional-structural damage of the host organism. The last condition differentiated the pathogenic bacteria from symbionts or commensals. The author analyses the factors conditioning the occurrence of pathogenic processes and provoking the variability of bacterial virulence.

The chemical structure of surface layers of bacteria depends on genetic information, and the ability to produce the defining substances is hereditary feature. The observed variability of the virulence of bacteria population can be of genotypic or phenotypic character. The changes of genetic information can result from different processes: mutation, recombination connected with conjugation, transduction or transformation, loss or acquiring new plasmids, followed by selection. The phenotypic changes are the result of environmental influences, especially of nutrient availability, the presence of inhibitors of enzymatic reactions, the repression or derepression of particular operons etc. The understanding of these phenomena is not only interesting from theoretical point of view, but has also great importance for rationalization of the therapeutic interventions.