

KATARZYNA BARANOWSKA, ANNA RODZIEWICZ

*Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
C.K. Norwida 25, Wrocław
E-mail: k.baranowska@interia.pl*

MOLEKULARNE INTERAKCJE W BIOFILMACH BAKTERYJNYCH

WPROWADZENIE

Większość bakterii, zarówno saprofitycznych, jak i patogennych, w warunkach naturalnych tworzy biofilmy (błony biologiczne, biowarstwy). Pod względem morfologicznym wyróżnia się trzy typy budowy błon biologicznych. Pierwszy z nich to płaska, dwuwymiarowa i homogenna struktura, która tworzy się na przykład na płycie nazębnej. Drugi to „piętrowy” układ mikrokolonii, otoczonych zewnątrzkomórkowymi związkami polimerów. Pod „kolumnami” utworzonymi przez bakterie znajduje się warstwa mikroorganizmów bezpośrednio związanych z powierzchnią adhezji, o grubości około 5 μm . Taki układ biofilmu nazywany jest „modelem heterogennej mozaiki”, którą najczęściej wytwarzają bakterie patogene, m.in.: *Pseudomonas aeruginosa* czy *Escherichia coli*. Trzecim, najbardziej złożonym modelem biowarstwy, jest „model grzyba”. Bakterie wytwarzają zbiorowiska mikrokolonii, które kształtem przypominają grzyby. Pomiędzy poszczególnymi strukturami znajdują się kanały wypełnione płynem (kanaliki wodne), łączące wnętrze biofilmu ze środowiskiem, w którym się znajduje. Jedną z funkcji kanalików jest rozprowadzanie w obrębie biofilmu tlenu oraz składników odżywczych. Jest to również droga dostępu dla substancji o działaniu antymikrobiologicznym (BAJ i MARKIEWICZ 2006). Ważnym składnikiem błon biologicznych jest EPS (ang. extracellular polymeric substances), wieloskładnikowa macierz (ang. matrix) otaczająca mikrokolonie biofilmu.

W jej skład wchodzi polisacharydy, białka, peptydy, kwasy nukleinowe, cząsteczki sygnalizacyjne oraz związki organiczne i nieorganiczne pochodzące ze środowiska powstawania błony biologicznej. Komórki bakterii związane w warstwach biofilmu tworzą mikrokolonie, które różnią się fenotypowo i genetycznie od swobodnie żyjących. Mikroorganizmy mogą tworzyć błony biologiczne na wielu odmiennych podłożach, zarówno wewnątrz żywych organizmów, np. na błonie śluzowej narządów wewnętrznych, na implantach, na tkankach roślin, jak i na powierzchniach abiotycznych jakimi są naturalne systemy wodne, skały w strumieniach będące w kontakcie z wodą czy rury kanalizacyjne (DONLAN 2002, O'TOOLE 2003, CZACZYK i WOJCIECHOWSKA 2003). Ponadto biofilmy mogą powstawać na granicy faz ciecz/powietrze poprzez wzajemną adhezję komórek (MORIKAWA 2006). Istotną funkcję w tworzeniu i prawidłowym funkcjonowaniu biofilmu pełni niskocząsteczkowe związki sygnałowe, za pomocą których poszczególne komórki kontaktują się między sobą. Zdolność do wytwarzania biofilmów posiada wiele gatunków mikroorganizmów, wśród których wyróżnia się: bakterie, promieniowce, drożdże oraz grzyby strzępkowe. Znane są także biofilmy tworzone przez algi czy ameby, jednakże najwięcej uwagi poświęcono bakteriom, ze względu na ich znaczenie oraz powszechne występowanie w wielu środowiskach.

ODDZIAŁYWANIA BAKTERII Z POWIERZCHNIĄ ICH ADHEZJI

Przekształcenie formy bytowania bakterii, ze swobodnie żyjących do uwieczonych (immobilizowanych) wewnątrz biofilmu, powiązane jest z adhezją, zmianami genotypowymi i metabolicznymi. Zmieniony fenotyp odpowiada za szczególną odporność mikroorganizmów na czynniki antydrobnoustrojowe. Nadal istnieje wiele niejasności co do przebiegu tych procesów.

Model biofilmu bakteryjnego został opracowany na przykładzie bakterii *Pseudomonas* sp. Proces formowania tej struktury rozpoczyna się od „rozpoznania” i wstępnego przytwierdzenia do powierzchni pojedynczych komórek. Następnie mikroorganizmy tworzą bardziej złożone zespoły i wytwarzają egzopolimeryczną macierz. Proces tworzenia oraz dojrzewania biofilmu uzależniony jest między innymi od dostępności tlenu, wielkości ciśnienia osmotycznego i pH środowiska. Wyróżnia się dwa zasadnicze etapy formowania biofilmu bakteryjnego: pierwotną adhezję bakterii do podłoża (ang. docking) oraz wtórną adhezję (ang. locking). Pierwszy etap jest odwracalny, uwarunkowany wieloma czynnikami fizyko-chemicznymi, przekładającymi się na interakcje pomiędzy powierzchnią bakterii a kolonizowaną powierzchnią. W początkowej fazie tego etapu mikroorganizmy muszą zbliżyć się na odpowiednio bliską odległość do podłoża, zwykle około 1 nm. Ostatecznie o adhezji komórek do powierzchni decyduje suma oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych, pokonanie sferycznych przeszkód, sił Van der Waalsa, temperatura i oddziaływania hydrodynamiczne (DUNNE 2002). W drugim etapie, na skutek oddziaływań międzykomórkowych i środowiskowych, następuje nieodwracalne związanie komórek drobnoustrojów z powierzchnią. W tej fazie tworzenia biofilmu luźno związane mikroorganizmy rozpoczynają produkcję EPS, a wolno żyjące bakterie przyłączają się do nowopowstającej struktury. Interesujący jest fakt, że powstanie specyficznego skupiska jednego gatunku mikroorganizmów stymuluje adhezję innych.

WATNICK i KOLTER (2000) wyróżnili dalsze trzy etapy formowania bakteryjnego biofilmu. W etapie trzecim bakterie przekazują sygnały stymulujące przyłączone mikroorganizmy do rozmnażania i tworzenia mikrokoloni. W czwartym etapie powstaje EPS, a gradienty chemiczne umożliwiają współistnienie drobnoustrojów różnych gatunków oraz znajdujących się w różnych stadiach metabolicz-

nych na zasadzie syntrofii. W piątym etapie niektóre bakterie opuszczają biofilm w celu utworzenia nowych skupisk poprzez kolonizację innych powierzchni (ang. detachment). VUONG i współaut. (2003) wyizolowali autolizynę AtlE regulującą pierwszy etap adhezji. Zawiera ona w swojej strukturze powtarzalną sekwencję aminokwasów, która prawdopodobnie oddziałuje hydrofobowo z abiotyczną powierzchnią. Białko AtlE zawiera dwie domeny o aktywności enzymatycznej: amidazową oraz N-acetylogluktoamidazową.

Większość bakterii wytwarza adhezyny, które stymulują powierzchniowe przyleganie komórek, co jest warunkiem niezbędnym do utworzenia biofilmu. Adhezyny mają charakter białkowy, sacharydowy lub kwasowy (kwas teichojowy, sjałowy). Ich receptormi są zwykle glikoproteiny lub glikolipidy. W interakcjach tych uczestniczą również kationy. Przykładem adhezyn są cząsteczki PIA (ang. polysaccharide intracellular adhesin) wytwarzane przez bakterie *Staphylococcus epidermis*. Adhezyna PIA zbudowana jest z 130 reszt β -1,6-GlcNAc (β -1,6-N-acetylo-D-glukozaminy), co stanowi 80-85 % jej cząsteczki, oraz z frakcji anionowej, którą tworzą nieacetylowane reszty D-glukozaaminy, zawierające fosforan i reszty bursztynianu. Syntetyzowana jest ona przy udziale UTP. Adhezyna ta odpowiedzialna jest za drugi etap adhezji komórek do powierzchni (SHIRTLIFF i współaut. 2002).

Oprócz białkowych adhezyn, w procesie tworzenia biofilmu duże znaczenie mają również inne białka nazwane cząsteczkami sygnałowymi. Wyłączenie genów kodujących niektóre z nich powoduje utratę zdolności do wytwarzania biofilmu. O'TOOLE i KOLTER (1998) zbadali zdolność wytwarzania biofilmu przez *P. fluorescens* na powierzchni abiotycznej. W początkowym stadium bakterie syntetyzowały pozakomórkowe białka, które miały wpływ na interakcje zachodzące pomiędzy przyłączającymi się mikroorganizmami a powierzchnią abiotyczną. Badacze ci wyizolowali mutanty niezdolne do aktywnej adhezji do podłoża (mutanty genu *sad* znajdującego się na transpozomie). Analiza molekularna mutantów *sad* wykazała istotną rolę białka Clp w formowaniu właściwej struktury biofilmu (Clp – proteaza cytoplazmatyczna). Białko to jest syntetyzowane przez komórki bakteryjne w odpowiedzi na różnorodne sygnały pochodzące z otoczenia.

Czynnikiem hamującym produkcję białka Clp jest tetracyklina (tc). Jej obecność hamowała rozwój biofilmu *P. fluorescens*, jednak dodanie tetracykliny po 30 min od zapoczątkowania procesu adhezji komórek, nie miało już wpływu na formowanie się biowarstwy komórkowej.

Wspólną cechą bakterii gramujemnych tworzących biofilmy (*E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) jest ich ruchliwość. Wszystkie przypadki uszkodzenia w genie kodującym ruch rzęskowy powodowały zaburzenia w tworzeniu biofilmu, a szczególnie w pierwszym etapie kontaktu z powierzchnią. W pierwotnej adhezji tych bakterii uczestniczą fimbrie typu I i IV, odpowiedzialne za ruch pełzający. Mutanty niezdolne do ich wytwarzania nie agregują. Niezdolne

do ruchu mutanty *E. coli*, stymulowane przez allel genu *ompR*, produkowały adhezyny powierzchniowe. Ponadto uszkodzenia w genie kodującym ruch rzęskowy *P. fluorescens* mogą być cofnięte poprzez hodowle bakterii na podłożu z cytrynianem, glutaminianem lub żelazem. Fimbrie typu I są niezbędne do tworzenia biofilmu na wszystkich powierzchniach przez bakterie *E. coli*. Są one grupą adhezyn mannozowrażliwych (MS), gdyż mannoza i jej pochodne hamują adhezję fimbrii do receptorów. Zbliżone wyniki dała genetyczna analiza biofilmu szczepu *Vibrio cholerae* E1 Tor. W ten sposób analogi mannozy można wykorzystać w celu zahamowania tworzenia biofilmów przez omawiane bakterie (PRATT i KOLTER 1999).

DOJRZEWANIE BIOFILMU BAKTERII GRAM-UJEMNYCH I GRAM-DODATNICH

Wykazano istotne różnice w procesie dojrzewania biofilmu u bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich. U Gram-ujemnych bakterii *P. aeruginosa* składnikami EPS są kwas alginowy (β -1,4-D-mannuronowy) oraz C-5 epimer kwasu guluronowego. Bakterie niezdolne do wytwarzania tego kwasu tworzyły biofilmy o zmienionej strukturze. Synteza kwasu alginowego znajduje się pod kontrolą genu *algACD*. Produkcja tego składnika macierzy egzopolimerycznej jest zdeterminowana wieloma czynnikami, między innymi warunkami środowiska. Ekspresja genu *algC* u organizmów związanych w strukturę błony biologicznej osiąga poziom prawie 19 razy wyższy niż w komórkach planktonowych. Również ilość gromadzonego kwasu uroonowego, będącego swoistym markerem intensywności syntezy kwasu alginowego, jest dwukrotnie wyższa w komórkach związanych w stosunku do wolno żyjących. Mikroorganizmy nie wykazujące ekspresji genu *algC*, cechują się większym prawdopodobieństwem oddzielenia się od struktury biofilmu (DAVEY i O'TOOLE 2000, DUNNE 2002). Wytwarzanie bardzo dużych ilości kwasu alginowego odpowiada prawdopodobnie za odporność bakterii *P. aeruginosa* na antybiotyk tobramycynę, będącego podstawowym lekiem w chorobach płuc wywołanych przez te mikroorganizmy. Polisacharyd ten może być barierą uniemożliwiającą przenikanie tobramycyn do wnętrza biofilmu i patogenu. Bardzo istotnym sygnałem stymulującym dojrzewanie makrostruktur biofilmu u *P. aeruginosa* są

acylowane laktony homoseryny (acyl-AHLs). Genem kodującym enzymy kierujące syntezą laktonu N-(3-oksododekanylo)-L-homoseryny jest *lasI*. Mutanty *lasI* nie wykazują zdolności utworzenia właściwej postaci biofilmu pomimo zachodzących interakcji komórka-komórka. Proteom dojrzałego biofilmu *P. aeruginosa* zawiera dodatkowe frakcje białek metabolizmu energetycznego i procesu translacji, a także cząsteczki autoinduktorów odpowiedzialne za wyczuwanie własnej gęstości (GUINA i współaut. 2003, MIHOUB i wsp. 2003). Za główny składnik egzopolisacharydowej macierzy u *E. coli* uważa się kwas kolaminowy (ang. colanic acid.). Jest on konieczny do utworzenia biofilmu, jednakże nie odgrywa ważnej roli podczas adhezji bakterii do podłoża. Za syntezę kwasu odpowiedzialne są geny *ompC* Korin oraz *wca*. Transkrypcja tych genów regulowana jest indukcyjnie. Wykazano również wiele podobieństw w strukturach biofilmu między *E. coli* oraz *P. aeruginosa*, które dotyczyły mikrokolonii, kanałów wodnych, różnorodności oraz grubości połączonej warstwy komórek i egzopolisacharydów. W proteomie dojrzałej błony biologicznej *E. coli* pojawiają się białka stresowe, regulujące translację i replikację.

Spośród bakterii Gram-dodatnich, a zwłaszcza patogennych, najwięcej badań dotyczy rodzajów: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. W przypadku *S. epidermis* tworzenie i dojrzewanie biofilmu stymulowane jest wytwarzaniem wspomnianej już adhezyny PIA, która jest cząsteczką linearną,

asocjującą do powierzchni. DUNNE (2002) wykazał pozytywny wpływ jonów Mg^{2+} oraz negatywny jonów Zn^{2+} na tworzenie biofilmu przez te bakterie. W agregacji międzykomórkowej oraz adhezji do podłoża pewną rolę odgrywa również czynnik sigma b (jeden z czynników odpowiedzialnych za rozpoznanie sekwencji zgodnej promotora; potrzebny do inicjacji transkrypcji). Szczepy posiadające mutację genu kodującego ten czynnik oddziałują między sobą dużo łatwiej niż szczepy dzikie.

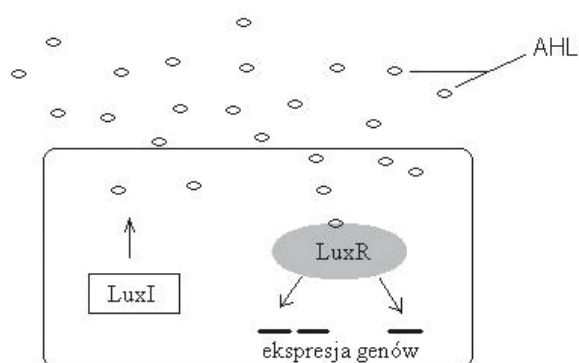
Szczep Gram-dodatnich bakterii *Bacillus cereus* DL5 zbadano w kierunku zmian

proteomu podczas tworzenia i dojrzewania biofilmu na wacie szklanej. Profile białkowe dojrzałego biofilmu i jego początkowych etapów powstawania różniły się. Sekwencjonowano osiem frakcji białek charakteryzujących biofilm. Były wśród nich: dehydrogenaza pirogronianowa (E1), dehydrogenaza mleczanowa (LctE), karbamylotransferaza ornitynowa (cOTCase), białko YhbH. Pojawienie się takich białek enzymatycznych było odpowiedzią na pogorszenie warunków, np. tlenowych, w utworzonym biofilmie (OOSTHUIZEN i współaut. 2001, 2002).

FUNKCJE NISKOCZĄSTECZKOWYCH ZWIĄZKÓW SYGNAŁOWYCH ORAZ ICH ENZYMATYCZNA DEGRADACJA

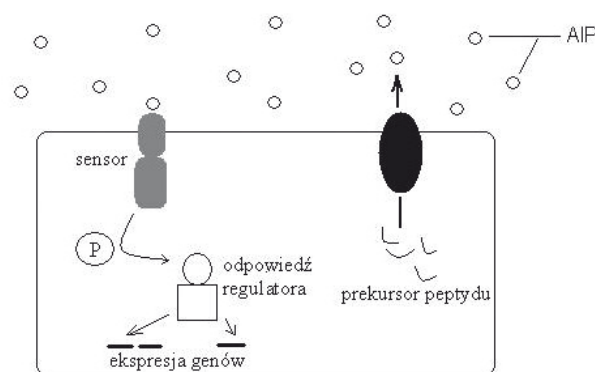
Za koordynację procesów fizjologicznych i metabolicznych drobnoustrojów w obrębie biofilmu odpowiedzialne są cząsteczki sygnałowe, nazywane autoinduktorami, z pomocą których komórki komunikują się między sobą. Sygnalizator zagęszczenia (ang. quorum sensing, QS) jest mechanizmem regulacji ekspresji genów zależnym od zagęszczenia komórek bakteryjnych w populacji (Ryc. 1, 2). W ten sposób regulowane są także inne procesy, takie jak: sporulacja, różnicowanie komórek, biosynteza metabolitów wtórnych (antybiotyków, toksyn), przekazywanie plazmidów, wirulencja, bioluminescencja, replikacja DNA, produkcja enzymów i toksyn (CZAJKOWSKI i JAFRA 2006). W mechanizmie

sygnalizatora zagęszczania, będącego formą chemicznej komunikacji między mikroorganizmami w błonie biologicznej, najważniejszą rolę odgrywają niskocząsteczkowe związki sygnałowe (cząsteczki sygnalizacyjne) (HOLDEN i WILLIAMS 2001, PAWLIK i KUCZEK 2002, SHIRTLIFF i współaut. 2002). Ich stężenie w środowisku biofilmu jest ściśle związane z ilością komórek drobnoustrojów (ich zagęszczeniem). Cząsteczki te wydzielane są do środowiska na drodze dyfuzji lub wskutek aktywnego transportu z cytoplazmy do wnętrza struktury biofilmu. W momencie przekroczenia wartości progowej (tzw. wartość quorum) przez stężenie cząsteczek sygnałowych, następuje indukcja ekspresji genów i wywoływany jest efekt metaboliczny we wszystkich komórkach danej populacji. Niskocząsteczkowe związki sygnałowe wykazują pewne cechy



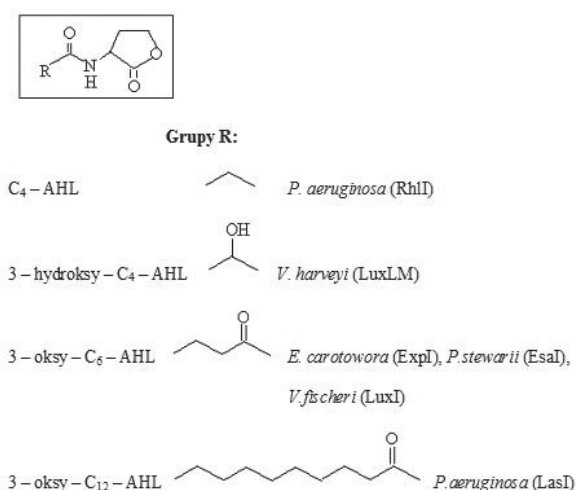
Ryc. 1. Regulacja mechanizmu wrażliwości progowej QS u bakterii Gram-ujemnych.

LuxI – białko katalizujące syntezę AHL (laktonu homoseryny); LuxR – białko wiążące cząsteczkę AHL i kontrolujące ekspresję genów; AHL – acylowane laktony homoseryny (wg TAGA i BASSLERA 2003, zmodyfikowana).



Ryc. 2. Regulacja mechanizmu wrażliwości progowej QS u bakterii Gram-dodatnich.

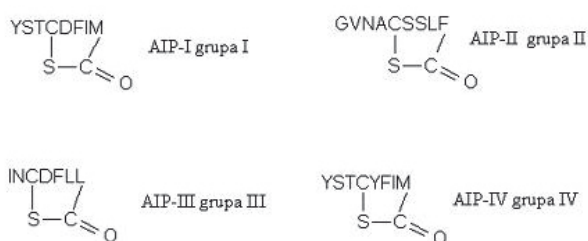
P – fosforylacja; AIP – oligopeptydy. (wg TAGA i BASSLERA 2003, zmodyfikowana).



Ryc. 3. Cząsteczki sygnałowe (autoinduktory) bakterii Gram-ujemnych – N-acylowane laktony homoseryny.

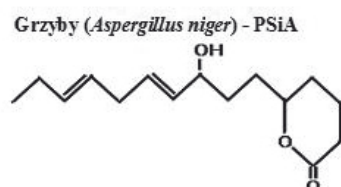
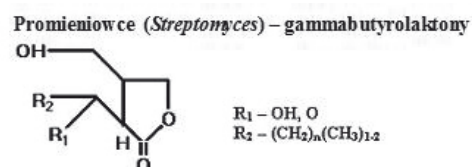
(wg SHIRTLIFFA i współaut. 2002, zmodyfikowana).

charakterystyczne odróżniające je od metabolitów wtórnych. Wynikają one z faktu, że ich działanie biologiczne obserwowane jest przy niskiej koncentracji w środowisku, proporcjonalnie do liczby bakterii, a ekspresja genów zachodzi w ściśle określonych warunkach (SHIRTLIFF i współaut. 2002). Te drobnocząsteczkowe związki charakterystyczne są dla poszczególnych grup mikroorganizmów, jednak pojedynczy szczep może wytwarzać kilka rodzajów cząsteczek sygnałowych, a poszczególne rodzaje cząsteczek mogą być wytwarzane przez różne szczepy. U bakterii Gram-ujemnych najczęściej spotykane są acylowe pochodne laktonu homoseryny AHL (ang. acyl, homoserine lactones), np. N-(3-oksooktanoylo)-AHL u *Agrobacterium tumefaciens*, czy N-(3-okso-dodekanylo)-AHL u *P. aeruginosa* (Ryc. 3). U bakterii Gram-dodatnich funkcjonują: oligopeptydy (*B. subtilis*), cykliczne oktapeptydy (*S. aureus*) (Ryc. 4), butyrolaktony (*S. griseus*), siderofory (*Bacillus sp*), białka (*Micrococcus luteus*). Promieniowce *Streptomyces* wytwarzają gammabutyrolaktony (czynniki A) (Ryc. 5). Pomiędzy bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi funkcjonuje autoinduktor 2 (AI 2) (Ryc. 6). Grzyby *A. niger* wydzielają do środowiska cykliczne cząsteczki PSiA, natomiast u innych Eukariota cząsteczki powstające na bazie furanonu (Ryc. 5). Algi morskie, *Delisea pulchra*, produkują pochodną furanonu (5Z)-4-

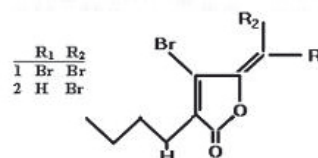


Ryc. 4. Cząsteczki sygnałowe (autoinduktory) bakterii Gram-dodatnich – tioestry oktapeptydów.

(wg SHIRTLIFFA i współaut. 2002, zmodyfikowana).



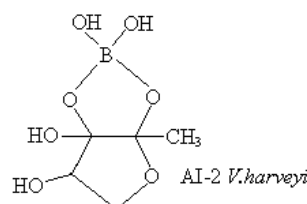
Delisea pulchra (alga morska) – struktura furanonu



Ryc. 5. Cząsteczki sygnałowe promieniowców oraz komórek eukariotycznych.

(wg SHIRTLIFFA i współaut. 2002, zmodyfikowana).

faciens, czy N-(3-okso-dodekanylo)-AHL u *P. aeruginosa* (Ryc. 3). U bakterii Gram-dodatnich funkcjonują: oligopeptydy (*B. subtilis*), cykliczne oktapeptydy (*S. aureus*) (Ryc. 4), butyrolaktony (*S. griseus*), siderofory (*Bacillus sp*), białka (*Micrococcus luteus*). Promieniowce *Streptomyces* wytwarzają gammabutyrolaktony (czynniki A) (Ryc. 5). Pomiędzy bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi funkcjonuje autoinduktor 2 (AI 2) (Ryc. 6). Grzyby *A. niger* wydzielają do środowiska cykliczne cząsteczki PSiA, natomiast u innych Eukariota cząsteczki powstające na bazie furanonu (Ryc. 5). Algi morskie, *Delisea pulchra*, produkują pochodną furanonu (5Z)-4-



Ryc. 6. Cząsteczka autoinduktora 2 (AI-2) – uniwersalna jednostka sygnałowa bakterii.

(wg SHIRTLIFFA i współaut. 2002, zmodyfikowana).

bromo-5-(bromometyleno)-3-butylo-2(5H)-furanon (fur1). Częsteczki furanonu, oprócz właściwości sygnałowych, posiadają zdolność hamowania mechanizmu wrażliwości progowej (ang. quorum sensing) u bakterii *E. coli* oraz *V. harveyi*, bez hamowania ich wzrostu (HOLDEN i WILLIAMS 2001, TAYLOR i współaut. 2004).

N-acylowane laktony homoseryny tworzą rodzinę cząsteczek różniących się długością łańcucha bocznego (C_4 - C_{14}) oraz stopniem utlenienia. Dotychczas wyizolowano i opisano 14 rodzajów AHL, różniących się długością i obecnością podstawników w bocznym łańcuchu acylowym. Syntetyzowane są w formie aktywnej, a następnie wydzielane do środowiska. Częsteczki o krótszych łańcuchach swobodnie dyfundują przez błonę i ścianę komórkową (dyfuzja prosta). Sygnalizatory dłuższe niż osiem atomów węgla są transportowane do środowiska zewnętrznego przez specyficzne systemy transportu wykorzystujące hydrolizę ATP (pompa MexAB-OprM dla *P. aeruginosa*). Przy odpowiednim stężeniu, poprzez autoindukcję, zdolne są do kontroli ekspresji genów regulatorowych w systemie *las* i *rhl*, przy wiodącej roli mechanizmu pierwszego (HOLDEN i WILLIAMS 2001, TAYLOR i współaut. 2004). AHL funkcjonują zarówno w biofilmach mono-, jak i wielogatunkowych, tworzonych na powierzchniach abiotycznych przez bakterie *P. aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum*, *Yersinia* sp. i inne. Substratami w syntezie AHL są: S-adenozylometionina (SAM) oraz grupa acylova przenoszona na cząsteczkę laktonu przez białko ACP (ang. acyl carrier protein). Acylowy podstawnik pochodzi z przemian kwasów tłuszczowych, a pierścień laktonu homoseryny jest dostarczany przez S-adenozylometioninę. SAM przyłącza się do centrum aktywnego enzymu syntazy AHL, a następnie grupa acylova zostaje przyłączona do SAM wiązaniem amidowym. Ostatnim etapem tworzenia cząsteczki AHL jest utworzenie wiązania estrowego w homoserynie. Produktem ubocznym tych przemian jest 5'-metylotioadenozyna (MTA) (CZAJKOWSKI i JAFRA 2006).

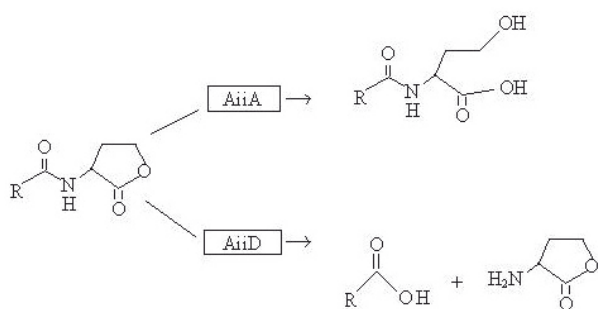
Cząsteczki autoinduktorów peptydowych AIPs (ang. autoinducing polypeptides) stanowią oligopeptydy zawierające od 7 do 9 reszt aminokwasowych oraz pierścienie tiolaktonowe zawierające cysteinę w miejscu 5 od C-końca łańcucha oligopeptydowego. Syntetyzowane są w cytozolu w postaci prekursorów, a następnie modyfikowane i wydzielane pozakomórkowo. Cząsteczki te przyłączają

się do zewnętrznej domeny kinazy białkowej związanej z błoną komórkową, gdzie ulegają fosforylacji. Cząsteczki AIPs regulują m.in. przetrwalnikowanie u *B. subtilis* oraz wirulencję u *S. aureus* i *E. faecalis*. Specyficzność mechanizmu QS u *S. aureus* zdeterminowana jest przez interakcje zachodzące pomiędzy cząsteczkami sygnałowymi a kinazą białkową usytuowaną w błonie komórkowej. AIPs produkowane przez *S. aureus* aktywują nie tylko geny odpowiedzialne za ich własną wirulencję, ale również innych mikroorganizmów (TAGA i BASSLER 2003).

Jedynym niespecyficznym gatunkowo autoinduktorem są cząsteczki AI-2, które określa się mianem „uniwersalnych” w regulacji mechanizmu wrażliwości progowej zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych (Ryc. 6). Cząsteczki te kontrolują geny odpowiedzialne za bioluminescencję *V. harveyi*, ekspresję genów odpowiedzialnych za wirulencję *E. coli*, *V. cholerae* i *C. perfringens*, produkcję antybiotyków przez *Porphyrromonas gingivalis*, ruchliwość *Campylobacter jejuni* oraz formację biofilmu w mieszanej kulturze *P. gingivalis* i *S. gordinii* (TAGA i BASSLER 2003).

Niektóre Gram-dodatnie bakterie zdolne są do wytwarzania enzymów degradujących cząsteczki AHL bakterii Gram-ujemnych. Wyróżnia się dwie grupy bakterii, z których jedne produkują acylazy-amidohydrolazy (np.: AiiD), odrywające łańcuch boczny cząsteczki, produkowane przez bakterie *Ralstonia* sp., oraz laktonazy (np. AiiA), które rozkładają wiązania estrowe w pierścieniu laktonowym homoseryny, wytwarzane są przez niektóre gatunki *Bacillus* (Ryc. 7) (D'ANGELO-PICARD i współaut. 2005). Te hydrolityczne enzymy pośrednio zaburzają transkrypcję, a w dalszej kolejności formowanie biofilmu, co może mieć wykorzystanie terapeutyczne w odniesieniu do bakterii chorobotwórczych (KIM i współaut. 2005). W wielu badaniach potwierdza się, że ingerencja w mechanizmy QS daje możliwość opracowania nowych metod zmniejszania lub zahamowania infekcyjności wielu patogenów.

Pierwsza grupa enzymów degradujących AHL to laktonazy, hydrolizujące pierścień laktonu nie naruszając wiązania pomiędzy laktonem a bocznym łańcuchem acylowym. W przypadku hydrolizy pierścienia cząsteczki sygnalizacyjnej, następuje około 1000-krotny spadek aktywności danej cząsteczki w mechanizmie QS. Enzymy te wyizolowano zarówno z bakterii Gram-dodatnich – *Bacillus* sp., jak



Ryc. 7. Enzymatyczna hydroliza laktonu AHL przez laktonazę (AiiA) pochodzącą z bakterii *Bacillus* sp. oraz przez acylazę (AiiD) pochodzącą z bakterii *Ralstonia* sp.

(wg CZAJKOWSKIEGO i JAFRA 2006, zmodyfikowana).

i Gram-ujemnych – *A. tumefaciens*, a geny kodujące laktonazy znajdują się na chromosomie bakteryjnym, w niektórych zaś przypadkach na plazmidach (*A. tumefaciens*).

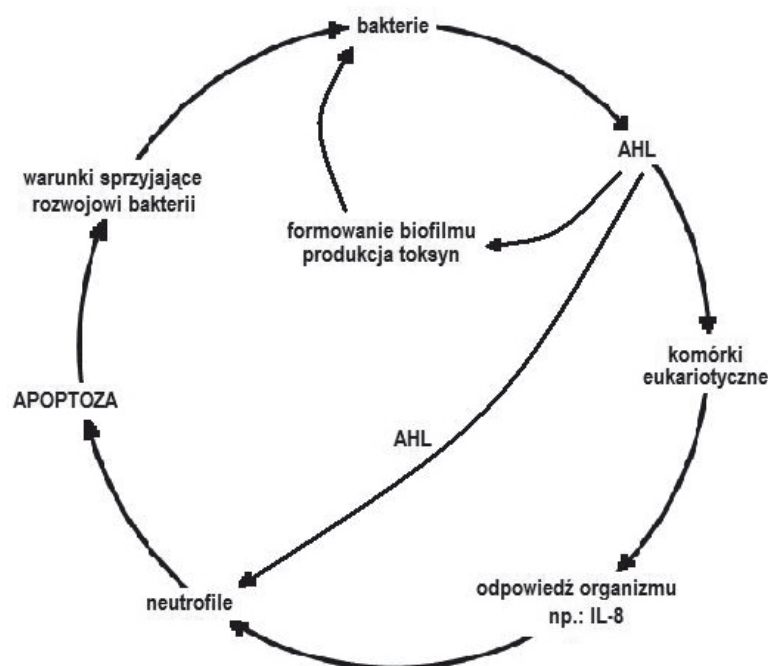
Jedną z lepiej poznanych laktonaz jest enzym pochodzący z rodzaju *Bacillus* sp. Oczyszczone białko AiiA, będące produktem genu *aiiA*, inaktywuje 3-oxo-C₆-AHL, 3-oxo-C₈-AHL oraz 3-oxo-C₁₀-AHL. AiiA uznana została za enzym działający wewnątrz komórki, w cytoplazmie, gdyż nie znaleziono hydrofobowego peptydu sygnałowego odpowiedzialnego za transport laktonazy do błony komórkowej (CZAJKOWSKI i JAFRA 2006). AiiA zawiera dwa motywy aminokwasowe spotykane dość powszechnie, z których pierwszy charakterystyczny jest dla glikozydazy II, acylosulfataz oraz metylo-β-laktamaz, drugi to motyw wiązania jonu Zn²⁺, występujący w tych enzymach. Obydwie sekwencje aminokwasowe są niezbędne do hydrolizy laktonu homoseryny przez AiiA. Ustalono również, że laktonaza AiiA jest enzymem o dużej specyficzności działania, gdyż nie hydrolizuje ona laktonów pozbawionych acylowego bocznego łańcucha i niecyklicznych estrów. Obecność podstawnika oraz pierścienia jest niezbędna do aktywności enzymu. Obniżenie pH poniżej wartości 5,0 powoduje dramatyczny spadek aktywności AiiA, jak również temperatura powyżej 37°C prowadzi do inaktywacji enzymu.

Analiza sekwencji nukleotydowej genu *aiiA* *B. thuringensis* pozwoliła ustalić wysoki stopień podobieństwa enzymu z tego mikroorganizmu do laktonazy AiiA innych bakterii z rodzaju *Bacillus* sp. Wynosiło ono 89–95% dla sekwencji nukleotydów i 90–96% dla se-

kwencji aminokwasowych. Odnalezienie enzymów hydrolizujących laktony u *B. thuringensis* stwarza możliwości wykorzystania tej bakterii w biokontroli nie tylko owadów, ale też w zwalczaniu patogenów bakteryjnych roślin. Sekwencję homologiczną do sekwencji genu *aiiA* stwierdzono również dla gatunków *B. anthracis*, *B. cereus* i *B. mycoides*.

Drugą grupą enzymów degradujących acylowane laktony homoseryny są acylazy, które hydrolizują wiązanie amidowe pomiędzy laktonem a acylowym podstawnikiem bocznym cząsteczki sygnałowej. W wyniku tej reakcji pozostaje nienaruszona struktura laktonu homoseryny. Są to enzymy izolowane z komórek bakterii Gram-ujemnych, m.in. *P. aeruginosa*, *Ralstonia solanaceum* i *V. paradoxus*. Sekwencje genów kodujących acylazy AHL są słabo poznane (CZAJKOWSKI i JAFRA 2006). Enzym o aktywności acylazy AHL bakterii *P. aeruginosa* jest produktem genu *pvdQ* i wykazuje podobieństwo w 38–40% do acylazy AiiD wyizolowanej z *Ralstonia eutropha* na poziomie sekwencji aminokwasowej. Enzym ten rozkłada wiązania amidowe w cząsteczkach C₈-AHL, C₁₀-AHL, C₁₂-AHL i C₁₄-AHL. Podobnie jak laktonaza, acylaza AiiD z *Bacillus* sp. jest enzymem wysoce specyficznym – nie wykazuje aktywności względem cząsteczek sygnałowych o krótszych łańcuchach bocznych (mniej niż osiem atomów węgla). W wyniku degradacji cząsteczki AHL przez acylazy powstają kwasy tłuszczowe i homoseryna, która może być toksyczna dla mikroorganizmu. Kwasy tłuszczowe wykorzystywane są przez komórkę jako źródło energii, natomiast homoseryna rozkładana jest do CO₂, NH₃ oraz H₂O.

Cząsteczki sygnałowe bakterii mogą uczestniczyć w apoptozie, która jest programowaną śmiercią komórek, ściśle regulowaną genetycznie. Proces ten jest niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Głównymi komponentami tego procesu są kaspazy, zaliczane do proteaz cysteinowych. W ostatnich latach zebrano dużo danych eksperymentalnych świadczących o udziale bakteryjnych cząsteczek sygnalizacyjnych w stymulacji apoptozy w zainfekowanych komórkach eukariotycznych. Przykładem mogą być bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, które dzięki wydzielaniu specyficznych metabolitów modulują odpowiedź immunologiczną w zainfekowanych tkankach. Bakterie *P. aeruginosa* zdolne są do wytwarzania i wydzielania dwóch rodzajów cząsteczek sygnalizacyjnych N-3-oksodo-



Ryc. 8. Rola 3-okso- C_{12} -AHL w patogenezie komórek węzłów chłonnych wywoływanej przez rodzaj *Pseudomonas*.

(wg TATEDY i współaut. 2003, zmodyfikowana).

dekanol laktonu homoseryny oraz N-butyrylolaktonu homoseryny. Pierwszy z nich stymuluje komórki epitelialne oraz fibroblasty do wzmożonej produkcji różnych substancji, takich jak: interleukina 8 (IL-8), enzymu cyklooksygenazy, hormonu tkankowego pro-

staglandyny oraz gamma interferonu w komórkach T. Badania przeprowadzone przez TATEDA i współaut. (2003) wykazały również stymulację przez cząsteczkę 3-okso- C_{12} -AHL apoptozy komórek makrofagów oraz neutrofili (Ryc. 8).

GENETYCZNA REGULACJA MECHANIZMU WRAŻLIWOŚCI PROGOWEJ QS U *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

U bakterii *P. aeruginosa* regulacja tworzenia jednogatunkowego biofilmu odbywa się poprzez system QS, który pozwala tym mikroorganizmom na monitorowanie własnej gęstości komórek. Mechanizm QS oraz regulacja ekspresji kontrolowane są przez dwa ściśle od siebie zależne, ale różne mechanizmy, a mianowicie system QS *las* oraz QS *rhl*. W przypadku systemu *las*, produkty genu *lasI* kontrolują bezpośrednio syntezę pozakomórkowej cząsteczki sygnałowej N-(3-oksododekanylo)-laktonu homoseryny (3-okso- C_{12} -AHL), wydzielanej w sposób aktywny na zewnątrz komórki. Gdy stężenie laktonu w otoczeniu komórek wzrasta, następuje jego pobranie do wnętrza mikroorganizmów i połączenie 3-okso- C_{12} -AHL z aktywatorem transkrypcji LasR. Powstały kompleks posiada zdolność aktywowania ekspresji wielu genów, w tym enzymów, np. *lasB* – elastazy, *lasA* – proteazy serynowej. Transkrypcja genu *lasR* jest indukowana stężeniem glukozy. Drugi system QS *P. aeruginosa* składa się z białka regula-

torowego RhlR oraz cząsteczki autoinduktora N-butyrylolaktonu homoseryny (C_4 -AHL), będącego produktem genu *rhlI*, mającego zdolność swobodnego przenikania przez błony komórkowe. Podobnie jak w pierwszym przypadku, gdy cząsteczka C_4 -AHL wydzielana na zewnątrz osiągnie odpowiedni poziom, następuje jej wnikięcie do komórki bakteryjnej i połączenie z Rhl, który jest aktywatorem transkrypcji. Powstały kompleks Rhl- C_4 reguluje między innymi operon odpowiedzialny za syntezę ramnolipidów (*rhlAB*), proteazy zasadowej czy *PAIL* – lektyny. Dominujący wpływ systemu *las* nad systemem *rhl* zaobserwowano w przypadku inhibicji 3-okso- C_{14} -AHL na łączenie się C_4 -AHL z aktywatorem transkrypcji RhlR. Oprócz omówionych cząsteczek sygnałowych, komórki *P. aeruginosa* syntetyzują jeszcze inne pochodne homoseryny (Ryc. 1). Działanie mechanizmu QS u tych patogenów regulowane jest na zasadzie autoindukowanego sprzężenia zwrotnego dodatniego (ang. up regulation) (KJELLEBERG i MOLIN 2002).

PODSUMOWANIE

Skupiska bakterii tworzących biofilmy, na skutek wzajemnych interakcji z udziałem cząsteczek sygnałowych, mogą w powstałej populacji koordynować procesy życiowe. Zjawisko to upodabnia je w pewnym stopniu do prymitywnych wielokomórkowych organizmów eukariotycznych. Efektem tego jest, między innymi, wysoka oporność mikroorganizmów w biofilmie jako zespole, na czynniki antymikrobiologiczne, co znacznie utrudnia ich zwalczanie. W powstałej niszy ekologicznej, jaką stanowią biofilmy, oprócz drobnocząsteczkowych autoinduktorów, zasadniczą funkcję spełniają składniki proteomu: białka regulujące transkrypcję lub represję

odpowiednich genów, białkowe adhezyny, enzymy, białka aglutyninopodobne i inne. Znajomość mechanizmów odpowiedzialnych za te procesy, umożliwia aplikację bakterii tworzących błony biologiczne, np. w procesach detoksykacji czy biodegradacji. Może też przyczynić się do większego ograniczenia ich patogenności lub szkodliwego działania w miejscach niepożądanych, co ma wymiar medyczny, ekologiczny i przemysłowy. Zdolność niszczenia autoinduktorów jednych mikroorganizmów (szczególnie patogennych) przez inne, może znaleźć wykorzystanie terapeutyczne a także w produkcji żywności.

MOLECULAR INTERACTIONS IN BACTERIAL BIOFILMS

Summary

Bacterial biofilm may be defined as a community of microorganisms embedded in an exopolysaccharide matrix and attached to a surface. Formation and maturation of biofilms is connected with production of extracellular polymeric substances. In this process, microorganisms also secrete specific, low molecular signaling compounds, proteins or polysaccharides and their derivatives. Structure of those compounds, synthesis regulation and the way of secretion are different for gram-negative and gram-positive bacteria. The quorum-sensing signal-

ing compounds for gram negative bacteria are acyl homoserine lactones, for gram positive – tioesters containing octapeptides and gamma-butyrolactones, while for eukaryotic cells – furanone derivatives. Molecular interactions between the bacteria themselves, the bacteria in biofilm and the surface, mechanisms of initial attachment, development and change of the biofilm phenotype, and genetic regulation, are important to elucidate the impact of biofilms on medical, industrial, environmental applications.

LITERATURA

- BAJ J., MARKIEWICZ Z., 2006. *Biologia molekularna bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- CZACZYK K., WOJCIECHOWSKA K., 2003. *Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań*. Biotechnologia 3, 180–192.
- CZAJKOWSKI R., JAFRA S., 2006. *Enzymatyczna degradacja laktonów acyl-L-homoseryny i jej potencjalne wykorzystanie w biokontroli i hamowaniu rozwoju infekcji*. Biotechnologia 2, 49–64.
- D'ANGELO-PICARD C., FAURE D., PENOT I., DESSAUX Y., 2005. *Diversity of N-acyl homoserine lactone – producing and degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere*. Environ. Microbiol. 7, 1796–1808.
- DAVEY M. E., O'TOOLE G. A., 2000. *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 64, 847–867.
- DONLAN R. M., 2002. *Biofilms: microbial life on surface*. Emerg. Infect. Dis. 7, 277–281.
- DUNNE W. M., 2002. *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* Clin. Microbiol. Rev. 15, 155–166.
- GUINA T., PURVINA S. O., YI E. C., ENG J., GOODLETT D. R., AEBERSOLD R., MILLER S. I., 2003. *Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis airways*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 2771–2776.
- HOLDEN M. T. G., WILLIAMS P., 2001. *Quorum Sensing*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, www.els.net.
- KIM M. H., CHOI W.-C., KANG H. O., LEE J. S., KANG B. S., KIM K.-J., DEREWENDA Z. S., OH T.-K., LEE C. H., LEE J.-K., 2005. *The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 17606–17611.
- KJELLEBERG S., MOLIN S., 2002. *Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?* Curr. Opin. Microbiol. 5, 254–258.
- MIHOUB F., MISTOU M. Y., GUILLOT A., LEVEAU J. Y., ABDELKADER B., BILLAUX F., 2003. *Cold adaptation of Escherichia coli: microbiological and proteomic approaches*. Int. J. Food Microbiol. 89, 171–184.
- MORIKAWA M., 2006. *Beneficial biofilm formation by industrial bacteria Bacillus subtilis and related species*. J. Biosci. Bioeng. 101, 1–8.
- O'TOOLE G. A., 2003. *To build a biofilm*. J. Bacteriol. 185, 2687–2689.
- O'TOOLE G. A., KOLTER R., 1998. *Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis*. Mol. Microbiol. 28, 449–461.
- OOSTHUIZEN M. C., STEYN B., LINDSAY D., BROZEL V. S., VON HOLY A., 2001. *Novel method for the pro-*

- teomic investigation of dairy – associated Bacillus cereus biofilm*. FEMS Microbiol. Lett. 194, 47–51.
- OOSTHUIZEN M. C., STEYN B., THERON J., COSSETT P., LINDSAY D., VON HOLY A., BROZEL V. S., 2002. *Proteome analysis reveals differential protein expression by Bacillus cereus during biofilm formation*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2770–2780.
- PAWLIK K., KUCZEK K., 2002. *Niskocząsteczkowe bakteryjne cząsteczki sygnałowe*. Biotechnologia 4, 165–175.
- PRATT L. A., KOLTER R., 1999. *Genetic analyses of bacterial biofilm formation*. Curr. Opin. Microbiol. 2, 598–603.
- SHIRTLIFF M. E., MADEY J. T., CAMPER A. K., 2002. *Molecular interactions in biofilms*. Chem. Biol. 9, 859–871.
- TAGA M. E., BASSLER B. L., 2003. *Chemical communication among bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 14549–14554.
- TATEDA K., ISHII Y., HORIKAWA M., MATSUMOTO T., MIYAIRI S., PECHERE J. C., STANDIFORD T. J., ISHIGURO M., YAMAGUCHI K., 2003. *The Pseudomonas aeruginosa autoinductors N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils*. Infect. Immun. 71, 5785–5793.
- TAYLOR M. W., SCHUPP P. J., BAILLIE H. J., CHARLTON T. S., DE NYS R., KJELLEBERG S., STEINBERG P. D., 2004. *Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4387–4389.
- VUONG C., GERKE C., SOMERVILLE G. A., FISCHER E. R., OTTO M., 2003. *Quorum Sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermis*. J. Infect. Dis. 188, 706–718.
- WATNICK P. I., KOLTER R., 2000. *Biofilm, city of microbes*. J. Bacteriol. 182, 2675–2679.