

Molekularne podstawy chorobotwórczości *Listeria monocytogenes*

AGNIESZKA CICHOCKA, BOGUMIŁA SKOTARCZAK

Katedra Genetyki Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego, Al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin

Cichocka A., Skotarczak B.

Molecular base of pathogenicity of *Listeria monocytogenes*

Summary

L. monocytogenes is one of the most invasive intracellular bacteria known. *L. monocytogenes* break the intestinal barrier in hosts infected by the oral route, although the site of entry, i.e., the epithelial cells or the cells in the Peyer's patches, has yet to be elucidated. After this the bacteria are internalized by resident macrophages in which they can survive and replicate, and then are released to the cytosol after lysis of vacuole. Escape from the phagocytotic vacuole requires the expression of listeriolysin O encoded by *hlyA* and *lisA* gene.

The products of two genes from operon *plcA-prfA* play a complementary role in virulence. Among others, products of the genes *mpl*, *actA*, *plcB* and the protein p60 coded by the gene *iap* take part in the next cycle's stage after *L. monocytogenes* escape from vacuole.

Protein p60 is common among all species of the *Listeria* kind, but the sequence of repeated aminoacids in the middle sphere which does not exist in other species, is always present in the pathogenic species.

Keywords: *L. monocytogenes*, genes, pathogenicity analysis

Listeria monocytogenes jest modelowym organizmem w badaniach nad mechanizmami patogenyzy drobnoustrojów wewnątrzkomórkowych. Należy do grupy patogenów, które mają zdolność do ucieczki z obszaru wakuoli i bezpośredniego wzrostu wewnątrz cytoplazmy zainfekowanej komórki. *L. monocytogenes* dostaje się do organizmu gospodarza zwykle drogą pokarmową. Przetrwanie bakterii w środowisku o odczynie kwaśnym, jakże towarzyszy procesom trawienia i charakteryzuje warunki wewnątrz komórek makrofagów staje się bardzo istotnym czynnikiem wirulencji bakterii. W toku prowadzonych doświadczeń wykazano obecność σ^B proteiny kodowanej przez gen określany jako GSTF σ^B (General Stress Transcription Factor σ^B) (11). Otrzymane wyniki sugerują, że proteina σ^B nadaje *L. monocytogenes* właściwości tolerancji na działanie kwasów żołądkowych dzięki czemu bakteria może przetrwać pH od 2,0 do 3,0 przez około dwie godziny (25). Wykazano jednocześnie, iż brak ekspresji czynnika σ^B prowadzi jedynie do obniżenia, a nie utraty oporności *L. monocytogenes* na oddziaływanie środowiska o pH poniżej 7,0 (25). Po pokonaniu bariery, jaką stanowi błona śluzowa jelita, pałeczki *L. monocytogenes* wnikają do komórek nabłonka w kępkach Peyera lub tworzą na ich powierzchni biofilmy i ulegają sfagocytowaniu przez makrofagi (23). W ciągu 30 minut od zapoczątkowania procesu infekcji komórek gospodarza, 90% komórek bakteryjnych

ulega enkapsulacji. Następujące później połączenie fagosomu i lizosomów, mające spowodować strawienie „intruza” wywołuje u *L. monocytogenes* wydzielanie listeriolizyny O (hemolizyny) oraz innych enzymów sekrecyjnych, takich jak fosfolipazy B i C oraz proteazy, powodujących rozpuszczanie błony cytoplazmatycznej. Proces lizy błon wakuolarnych trwa około 30 minut (18, 23), prowadząc w konsekwencji do uwolnienia bakterii do cytoplazmy makrofagów oraz ich wielokrotnego podziału (1). Następnie dochodzi do enkapsulacji komórek bakteryjnych włókiemkami aktynowymi, które nadają możliwości ruchowe *L. monocytogenes*. Polimeryzacja włókienek aktynowych jest główną siłą napędową poruszających się bakterii i pozwala na przemieszczanie się drobnoustrojów w kierunku powierzchni makrofaga z prędkością 0,1-1 $\mu\text{m/s}$ (1, 23). Powstała struktura nosi nazwę „komety listeryjnej” (1, 23). *L. monocytogenes* przenika do sąsiedniej komórki otaczając się jednocześnie podwójną błoną cytoplazmatyczną (komórki macierzystej i komórki nowo zakażonej), podczas gdy włókienka aktynowe pozostają w cytoplazmie komórki macierzystej. Błona ta po pewnym czasie zostaje w wielu miejscach przerwana, a pałeczka *L. monocytogenes* przedostaje się do cytoplazmy. Trwający około 5 godzin cykl ulega powtórzeniu (1, 21, 23).

W procesach powodujących skuteczną inwazję komórek gospodarza bierze udział wiele czynników ge-

netycznych i środowiskowych. Wszystkie znane geny wirulencji *L. monocytogenes* zlokalizowane są na chromosomie bakteryjnym o długości 3150 ± 50 par zasad (20). W obszarze pomiędzy genem dehydrogenazy mleczanowej a genem syntetazy fosforybozylu wyróżnia się trzy operony: operon *plcA-prfA*, operon *hly* i operon lecytynazy, których produkty (*plcA*, *prfA*, *hly*, *mpl*, *actA* i *plcB*) są niezbędne do prawidłowego przebiegu cyklu życiowego *L. monocytogenes*. Równie duże znaczenie dla właściwości inwazyjnych bakterii mają produkty genu *iap* i genów wchodzących w skład operonu *inlA-inlB*, leżących w innym rejonie genomu (1, 23).

Dwa z genów wchodzących w skład operonu *inlA-inlB* prawdopodobnie warunkują inwazję *L. monocytogenes* do określonych typów komórek (23). Gen *inlA* koduje internalinę – białko złożone z 800 aminokwasów, o masie 88 kDa. Umożliwia ona wzrost wewnątrzkomórkowy w komórkach nabłonkowych (8). Sekwencja C-terminalnego odcinka internaliny jest homologiczna do sekwencji białka M i przypuszczalnie niezbędna do wiązania internaliny ze ścianą komórkową *L. monocytogenes* (1, 6, 23). Produkt drugiego z genów operonu – *inlB* to powierzchniowe białko złożone z 630 aminokwasów. Białko *InlB* ma właściwości podobne do internaliny, nie ma jednak charakterystycznego dla niej C-terminalnego odcinka. *InlB* jest niezbędne do kolonizacji hepatocytów (6, 9, 23).

Niewątpliwie najważniejszą właściwością, odgrywającą kluczową rolę w procesie infekcji komórek gospodarza przez pałeczki *L. monocytogenes* jest możliwość wytwarzania listeriolizyny O (LLO) (1-4, 10, 19). Białko to zakotwiczone na powierzchni komórek *L. monocytogenes*, o masie 58 kDa warunkuje lizę wakuoli w komórkach gospodarza i pośrednio wzrost wewnątrzkomórkowy (1, 3, 12). Mutanty *hly* nie wytwarzające hemolizyny są awirulentne i niezdolne do wewnątrzkomórkowego wzrostu w hodowlach tkankowych (1). LLO jest kodowana przez gen *hly* (*hlyA*, *lisA*) leżący w operonie *hly* (19). Liza błon komórkowych rozpoczyna się od przyłączenia LLO do błony cytoplazmatycznej otaczającej wakuolę w miejscach zawierających cholesterol. Po adsorpcji oligomery toksyny zaczynają tworzyć stosunkowo duże pory, przez które następuje ucieczka płynu komórkowego, powodująca w konsekwencji fragmentację błony białkowo-lipidowej.

Aktywacja LLO u patogennych szczepów *L. monocytogenes* podlega co najmniej dwóm mechanizmom regulującym: genetycznemu, oraz regulacji poprzez czynniki środowiska i związki chemiczne. Aktywatorami chemicznymi tej toksyny bakteryjnej są m.in.: 2-merkptoetanol, ditiotreitól, tioglikolan sodowy oraz cysteina (1, 2). Ważną rolę w aktywacji LLO odgrywa pH środowiska, w jakim znajduje się bakteria. Maksymalną aktywność LLO wykazuje przy pH 5,0 natomiast jej niska aktywność przy pH neutralnym lub zasadowym zapobiega degradacji błon komórkowych,

gdzie *L. monocytogenes* znajduje się w cytoplazmie gospodarza (23).

Sekwencję genu *hly* ustalono jednocześnie w kilku laboratoriach (4), ale funkcja LLO w procesie patogenyzy została ostatecznie określona i udowodniona przez Bieleckiego i wsp. (1, 3). W badaniach do niehemolitycznego szczepu popularnej bakterii glebowej *Bacillus subtilis* wprowadzono i ekspresjonowano gen strukturalny LLO. Powstał w ten sposób nowy szczep *B. subtilis* posiadający zdolność hemolityczną, co pozwoliło na potwierdzenie tezy, iż pojedynczy produkt genu *hly* warunkuje hemolityczne właściwości badanych bakterii (3, 5). Specyficzność i unikalność sekwencji genu *hly* sprawia, że jest on powszechnie wykorzystywany jako marker genetyczny w badaniach *L. monocytogenes* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (13).

Dopełniającą rolę, jaką odgrywa LLO podczas procesu lizy błony wakuolarnej ma fosfolipaza C (PI-PLC) (1, 22). Badania wykazały, że brak aktywności fosfolipazy C uniemożliwia *L. monocytogenes* wydostanie się z pułapki podwójnej błony. Enzym ten jest produktem pierwszego genu w operonie *plcA-prfA* – genu *plcA* (ORF U) (23). Substratem dla fosfolipazy C są białka powierzchniowe zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej kompleksem fosfatydinilo inozytolu z glikanami (PI-glikanowym) (23). Mutanty *plcA*⁻ nie są zjadliwe i brak im zdolności do wzrostu w hodowlach tkankowych (23). Również drugi gen z operonu *plcA-prfA* odgrywa znaczącą rolę będąc regulatorem ekspresji genów wirulencji *L. monocytogenes* (1, 12, 23). Gen *prfA* koduje białko *PrfA* złożone z 237 aminokwasów, o masie 27 kDa. Wykazano doświadczalnie, iż produkt genu *prfA* w szczepach *B. subtilis* bezpośrednio aktywuje transkrypcję genu strukturalnego *hly* (1, 23). Ponadto u spontanicznych mutantów niehemolitycznych, u których stwierdzono delecję w promotorowym obszarze genu *hly*, poziom transkrypcji tego genu był bardzo niski. Wzrastał natomiast gwałtownie po komplementacji delecji plazmidem zawierającym sekwencję genu *prfA*. Jednocześnie obserwowano wzrost transkrypcji genów *plcA*, *plcB* i *mpl* (1). Ekspresja genów podlegających kontroli przez *PrfA* może być w mniejszym lub w większym stopniu regulowana przez czynniki środowiskowe. Największy wpływ wśród nich ma temperatura. Maksymalna ekspresja występuje przy 37°C, spada natomiast wraz z jej obniżeniem. Gen *prfA* jest obecny we wszystkich patogennych szczepach *L. monocytogenes* niezależnie od ich serotypowej przynależności (1).

W etapach cyklu życiowego, które następują po wydostaniu się komórki bakteryjnej z wakuoli i przedostaniu się do cytoplazmy biorą udział oprócz genu *hly* inne geny operonu lecytynazy (*mpl*, *actA*, *plcB*) (1, 20, 21), oraz produkty genu *iap* (1, 23).

W operonie lecytynazy leży gen *plcB* kodujący drugą fosfolipazę biorącą udział w późnych etapach cyklu komórkowego *L. monocytogenes* – lecytynazę

(PC-PLC) złożoną z 28 aminokwasów. Bierze ona udział w trawieniu podwójnej błony cytoplazmatycznej powstałej podczas międzykomórkowego przenikania bakterii (1). Substratem dla lecytynazy jest fosfatydylocholina (lecytyna, PC). Szczepy *plcB*⁻ są co prawda zdolne do podziałów, ale kumulują się wewnątrz otoczonej podwójną błoną wakuoli bez możliwości uwolnienia się z niej (1). Lecytynaza jest aktywowana przez produkt genu *mpl* (ORF D, *prtA*), co potwierdziły badania na mutantach z insercją transpozonową w obrębie genu *mpl*. Mutanty te wytwarzały mniej lecytynazy i odznaczały się zmniejszoną wirulencją (1). W rejonie lecytynazy znajduje się również gen *actA* (*prtB*), którego ekspresja jest konieczna do nukleacji komórek *L. monocytogenes* wewnątrz cytoplazmy makrofaga. Produkt genu *actA* jest polipeptidem zbudowanym z 610 aminokwasów, którego masa cząsteczkowa wynosi 90 kDa, rozmieszczonym asymetrycznie na powierzchni komórek *L. monocytogenes* (1). Wzrost koncentracji ActA na jednym z biegunów komórki bakteryjnej pozwala na uzyskanie efektu „komety listeryjnej”, gdyż ActA grupuje włókienka aktynowe wokół własnych cząsteczek (1, 12, 23). Polimeryzacja włókienek aktynowych wyzwała ruch, będąc jednocześnie siłą napędową dla komórek znajdujących się w cytoplazmie makrofaga. Intensywność polimeryzacji wyznacza prędkość poruszania się bakterii. Mutanty *actA*⁻ nie wytwarzają lecytynaz, ani nie indukują procesów polimeryzacji włókienek aktynowych (1).

Gen *iap* (invasion-associated protein) koduje białko p60 o masie 60 kDa (1, 4, 23, 24). Polipeptyd ten jest składnikiem ściany komórkowej *L. monocytogenes* i jednocześnie jest wydzielany do podłoża (23). Mutanty spontaniczne o obniżonej sekrecji białka p60 nie tracą zdolności do wzrostu wewnątrzkomórkowego i łatwo ulegają rewersji (23). Natomiast mutacje insercyjne w regionie genu *iap* znacznie obniżają aktywność hemolityczną pałeczek *L. monocytogenes* (1, 4). Dokładna rola białka p60 nie jest znana, ale wiadomo, że bierze ono udział w inwazji nieprofesjonalnych komórek fagocytarnych (1) i fibroblastów (23), oraz pełni ważną rolę podczas podziałów komórkowych (1, 4). Występowanie białka p60 jest powszechne wśród wszystkich gatunków z rodzaju *Listeria*, ale u szczepów patogennych w domenie środkowej zawsze występuje sekwencja powtarzających się aminokwasów nieobecna u innych gatunków. Z cechą tą wiąże się możliwość wykorzystania genu *iap* jako markera w reakcji PCR. Udowodniły to liczne badania prowadzone m.in. przez Comi i wsp. (7), oraz Manzano i wsp. (14-17).

Piśmiennictwo

1. Bielecki J.: Molekularne podstawy mechanizmów patogenyzy *Listeria monocytogenes*. Post. Mikrobiol. 1994, 23, 85-105.
2. Bielecki J.: Insertions within *iap* gene of *Listeria monocytogenes* generated by plasmid pLIV are not lethal. Acta Microbiol. Polon. 1994, 43, 133-143.
3. Bielecki J.: Association of listeriolysin O with the cell surface of *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol. Pol. 1994, 43, 279-289.
4. Bielecki J., Youngman P., Connelly P., Portnoy D. A.: *Bacillus subtilis* expressing a hemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. Nature, 1990, 345, 175-176.
5. Bille J.: Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. W: Foodborne Listeriosis, red. Miller A. J., Smith J. L., Somkuti G. A., Elsevier, Amsterdam – New York – Oxford 1990, s.71-74.
6. Braun L., Ohayo H., Cossart P.: The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. Mol. Microbiol. 1998, 27, 1077-1087.
7. Comi G., Cocolin L., Cantoni C., Manzano M.: A RE-PCR method to distinguish *Listeria monocytogenes* serovars. FEMS Immun. Med. Microbiol. 1997, 18, 99-104.
8. Cooray K. J., Nishibori T., Xiong H., Matsuyama T., Fujita M., Mitsuyama M.: Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60, 3023-3026.
9. Cossart P.: Interaction of the Bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* with mammalian cells: bacterial factors, cellular ligands, and signalling. Folia Microbiol. 1998, 43, 219-303.
10. Datta A.R.: Gene probes for *Listeria monocytogenes*. W: Foodborne Listeriosis, red. Miller A. J., Smith J. L., Somkuti G. A., Elsevier, Amsterdam – New York – Oxford 1990, s.111-115.
11. Ericsson H., Stalhandske P.: PCR detection of *Listeria monocytogenes* in „gravad” rainbow trout. Int. J. Food Microbiol. 1997, 35, 281-285.
12. Hanawa T., Yamamoto T., Shigeru K.: *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the acid of proteins induced by environmental stresses. Infect. Immun. 1995, 63, 4595-4599.
13. Hill W. E.: The Polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. Critical Rev. Food Sci. Nutrition 1996, 36, 123-173.
14. Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G.: A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. Int. J. Food Microbiol. 1998, 42, 207-212.
15. Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G.: Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by a single-step PCR. Mol. Biotechnol. 1997, 7, 85-88.
16. Manzano M., Cocolin L., Ferroni P., Cantoni C., Comi G.: A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. J. Sci. Food Agric. 1997, 74, 25-30.
17. Manzano M., Cocolin L., Ferroni P., Gasparini V., Narduzzi D., Cantoni C., Comi G.: Identification of *Listeria* species by a semi-nested polymerase chain reaction. Res. Microbiol. 1996, 147, 637-640.
18. Marquis H., Goldfine H., Portnoy D. A.: Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol. 1997, 137, 1381-1392.
19. Mengaud J., Gormely E., Vicente M. F., Chenevert J., Baquero F., Perez-Diaz J. C., Cossart P.: Listeriolysin O gene: role in virulence and use as a DNA probe. W: Foodborne Listeriosis, red. Miller A. J., Smith J. L., Somkuti G. A., Elsevier, Amsterdam – New York – Oxford 1990, s.125-130.
20. Michel E., Cossart P.: Physical map of the *Listeria monocytogenes* chromosome. J. Bacteriol. 1992, 174, 7098-7103.
21. Niederhauser C., Candrian U., Höfelein C., Jermini M., Bühler H. P., Lüthy J.: Use of polymerase chain reaction for detection *Listeria monocytogenes* in food. Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 1564-1568.
22. Paziak-Domańska D., Bogusławska E., Więckowska-Szakiel M., Kotłowski R., Różalska B., Chmiela M., Kur J., Dąbrowski W., Rudnicka W.: Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 171, 209-214.
23. Rocout J., Jacquet C., Reilly A.: Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int. J. Food Microbiol. 2000, 20; 62, 197-209.
24. Saito A., Swada T., Ueda F., Hondo R.: Classification of *Listeria monocytogenes* by PCR – restriction enzyme analysis in the two genes of *hlyA* and *iap*. Microbiologica 1998, 21, 87-92.
25. Wiedmann M., Arvik T. J., Hurley R. J., Boor K.: General stress transcription factor σ^B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 1988, 180, 3650-3656.

Adres autora: dr hab. n. med. prof. US Bogumiła Skotarczak, Al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin; e-mail: bogumila_skotarczak@sus.univ.szczecin.pl