

Genetyczne podstawy kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez bakterie rodzaju *Campylobacter*

ELŻBIETA KATARZYNA JAGUSZTYN-KRYNICKA, ANNA GRABOWSKA,
KSENIA SZYMANEK, AGNIESZKA WYSZYŃSKA

Zakład Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii Wydziału Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Jagusztyn-Krynicka E. K., Grabowska A., Szymanek K., Wyszynska A.

Colonization of the chick gastrointestinal tract by *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis

Summary

Campylobacter spp, gramnegative microorganisms, are currently recognized as a major cause of human acute bacterial enteritis. This bacterium frequently promotes a commensal lifestyle in the gastrointestinal tracts of many animals including birds. The main route of human infections is through improperly handled or undercooked poultry meat. This review article intends to present up-to-date research regarding knowledge of how the bacterium establishes commensalism. To date only a few genes that apparently contribute to avian-gut colonization have been identified by standard genetic techniques such as isogenic mutant construction by gene replacement methodology. The post-genomic era has resulted in new instruments for analyzing virulence and commensalism-related mechanisms. The review outlines some currently conducted *Campylobacter* transcriptome and proteome analyses aimed at the explanation of the adaptation of the bacterium to different environments. The last part of the review concentrates on mechanisms which regulate the chicken gut colonization process, mainly the new, recently described, two-component signal transduction systems.

Keywords: *Campylobacter*, commensalism, transcriptome

Ogólna charakterystyka rodzaju *Campylobacter*

Bakterie rodzaju *Campylobacter*, mikroaerofilne, spiralne, Gram-ujemne mikroorganizmy zaliczane do domeny Bacteria, typu Proteobacteria, klasy Epsilonproteobacteria, są aktualnie najczęściej izolowanym czynnikiem etiologicznym ludzkich stanów zapalnych przewodu pokarmowego. W ostatnim dziesięcioleciu liczba przypadków zakażeń mikroorganizmami rodzaju *Campylobacter* znacząco wzrosła w krajach uprzemysłowionych, ponad dwukrotnie przewyższając liczbę objawowych infekcji przypisywanych bakteriom rodzaju *Salmonella* (3).

Z 19 jak dotąd opisanych gatunków drobnoustrojów należących do rodzaju *Campylobacter* ludzkie infekcje wywoływane są głównie przez *C. coli* i *C. jejuni* (22). Kliniczna manifestacja infekcji bywa bardzo różnorodna i waha się od przypadków asymptomatycznych do ostrych stanów zapalnych jelit, którym towarzyszy długotrwała, krwawa i śluzowata biegunka (22). W większości przypadków choroba ogranicza się do stanu zapalnego jelit i wykazuje tendencje do samowyleczenia. U ludzi z niesprawnie działającym układem immunologicznym zakażenie *Campylobacter* jest często przyczyną systemowych infekcji oraz posocznicy. Infekcja *Cam-*

pylobacter czasami prowadzi do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych, z których najgroźniejszą jest tzw. syndrom Guillain-Barré (GB), zapalenie wielokorzeniowe obwodowego układu nerwowego. Wystąpienie powikłań ze strony układu nerwowego uwarunkowane jest zarówno genotypem patogenu, jak i genotypem organizmu gospodarza (17).

Poważny problem medyczny stanowi wzrastająca liczba ludzkich zakażeń szczepami *C. coli* i *C. jejuni* opornymi na powszechnie stosowane w terapii antybiotyki (makrolidy, chinolony, tetracyklina), co spowodowane jest niewłaściwym stosowaniem antybiotyków w leczeniu ludzi oraz zbyt częstym stosowaniem tych substancji w hodowli zwierząt (1).

Źródła infekcji, transmisja patogenu, profilaktyka anty-*Campylobacter*

Do ludzkich infekcji *Campylobacter* (w krajach rozwiniętych) dochodzi najczęściej przez spożycie nieodpowiednio przygotowanego drobiu, nie pasteryzowanego mleka lub zanieczyszczonej pałeczkami patogenu wody (7). Niewątpliwie głównym źródłem zarazka są kurczęta ulegające kolonizacji około 2.-3. tygodnia życia. W pierwszych tygodniach życia przed infekcją pta-

ki chroni wysoki poziom specyficznych przeciwciał matczynych (21). Mechanizm zapoczątkowania infekcji kurcząt na farmach pozostaje niewyjaśniony, lecz niezależnie od źródła zakażenia drobnoustroj rozprzestrzenia się w stadach kurcząt bardzo szybko. Chociaż poziom kolonizacji jelit kurcząt jest bardzo wysoki (maksymalnie 10^{10} jtk/g zawartości jelit) nie wywołuje to u ptaków objawów chorobowych. Fakt ten uniemożliwia eliminację ze stad osobników zainfekowanych. Do dalszego zanieczyszczenia tusz kurcząt pałeczkami *Campylobacter* dochodzi w rzeźniach, tak że około 80% tusz kurcząt znajdujących się na rynku zawiera duże ilości tego drobnoustroju. Ponieważ dawka infekcyjna dla człowieka jest stosunkowo niska (10^2 jtk), do zakażeń ludzi dochodzi stosunkowo łatwo i często.

Identyfikacja genów warunkujących zdolność *Campylobacter* do kolonizacji jelit drobiu

Dotychczas najpowszechniej stosowaną metodą badania funkcji genów była mutageneza ukierunkowana (insercyjna lub delecyjna), przeprowadzana techniką wymiany alleli, umożliwiającą unieczynnienie konkretnych genów i następnie analizę fenotypową otrzymanych mutantów. Badania prowadzone w wielu laboratoriach wykazały złożoność procesu kolonizacji przewodu pokarmowego drobiu przez pałeczki *C. jejuni* i udowodniły, że jest on determinowany aktywnością licznych genów. Można je zaliczyć do kilku klas, które zostaną omówione w dalszym tekście.

Geny warunkujące ruchliwość. Rzęska u *Campylobacter* jest strukturą komórkową warunkującą zdolność mikroorganizmu do ruchu. W procesie budowy flagellum bierze udział około 50 genów. Pozbawienie bakterii możliwości poruszania się znacznie obniża ich potencjał kolonizacyjny. Aktywne przemieszczanie się mikroorganizmu odgrywa kluczową rolę w pierwszych etapach inwazji, zanim dotrze on do właściwej dla siebie niszy ekologicznej. Mutanty w genach *maf* (motility accessory factor) oraz *fla* w szczepie *C. jejuni* 11168H charakteryzują się 100-krotnie obniżoną zdolnością zasiedlenia jelit kurcząt w porównaniu ze szczepem dzikim (13).

Geny uczestniczące w procesie glikozylacji białek. Glikozylacja jest jednym z powszechnych systemów modyfikacji białek. Do niedawna uznawano ten typ modyfikacji za typowy wyłącznie dla organizmów eukariotycznych. W ostatnich latach występowanie O-glikozylacji stwierdzono również w komórkach wielu gatunków bakterii, a N-glikozylacji w komórkach dwu rodzajów mikroorganizmów (*Campylobacter* i *Wolinella*) (20). N-glikozylacja białek polega na przyłączaniu krótkich łańcuchów węglowodanowych do asparaginy sekwencji NXS/T. *Locus* (17 kb) genów odpowiedzialnych za ten proces u *Campylobacter* został nazwany *pgl* (protein glycosylation pathway) i obejmuje 13 genów. Geny kodujące białka będące celem działania protein Pgl (ponad 30 protein) rozrzucone są wzdłuż całego genomu tej bakterii (24). Unieczynnienie procesu N-glikozylacji prowadzi do zaburzeń wielu procesów. Testy kolonizacji z użyciem mutantów *pglH::kan/11168H* przeprowadzone na 2-tygodniowych oraz *pglH::kan/81116* na 1-dniowych kurczętach udokumentowały rolę transferazy

N-acetylogalaktozoaminy w ustanawianiu komensalistycznych relacji między mikroorganizmem a gospodarzem.

Geny warunkujące wytworzenie polisacharydowych otoczek. Kluczowym czynnikiem kolonizacyjnym są także produkty genów *kps* (capsular proteins syntetase) odpowiadające za wytworzenie otoczek CPS (capsular polysaccharide) warunkujących serotyp szczepu. Mutanty *kpsM::kan/11168H* nie zasiedlały jelit 2-tygodniowych kurcząt. Doświadczenia przeprowadzone *in vivo* na fretkach oraz testy *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych, także wykazały znaczący udział CPS w procesach kolonizacji i inwazji *Campylobacter* (4).

Geny warunkujące oddziaływania między komórkami mikroorganizmu a enterocytami. Technika dysrupcyjnej mutagenezy ukierunkowanej oraz testy fizjologiczne pozwoliły scharakteryzować, jako ważny czynnik wirulencji/kolonizacji, także gen *cadF* (*Campylobacter* adhesion to Fn) kodujący 37 kDa, zlokalizowane w błonie zewnętrznej białko, odpowiedzialne za wiązanie *C. jejuni* z fibronektyną. Mutanty *C. jejuni* F38011 w genie *cadF* utraciły całkowicie zdolność do kolonizacji jelit ptaków, choć odnajdywane były w wolu (25). Mutageneza przeprowadzana techniką wymiany alleli pozwoliła zidentyfikować jako czynnik uczestniczący w procesie kolonizacji także gen *ciaB* o nieokreślonej do końca funkcji. Jego produkt uruchamia szereg zdarzeń prowadzących do wydzielenia białek sekrecyjnych Cia, które umożliwiają wniknięcie komórek bakterii w testach *in vitro* do niefagocytujących komórek gospodarza (15).

Globalne metody analizy genomów i transkryptomów bakteryjnych

W ostatnich latach obserwuje się wyraźną zmianę jakościową metodyki badania procesów patogenezy; od identyfikacji i funkcjonalnej charakterystyki pojedynczych genów w kierunku eksperymentalnej analizy globalnej – genomów, transkryptomów, proteomów czy integromów komórek bakteryjnych.

Analiza *in silico* – charakterystyka genomów *Campylobacter*. Do niedawna znana była sekwencja nukleotydowa genomu jednego szczepu bakterii rodzaju *Campylobacter*, a mianowicie *C. jejuni* NCTC 11168 (ludzki izolat kliniczny z roku 1977 r.) (19). W styczniu 2005 roku zsekwencjonowano genomy czterech innych szczepów oznaczonych: *C. jejuni* RM1221, *C. coli* RM2228 (naturalne izolaty od kurcząt) oraz *C. lari* RM2100 i *C. upsaliensis* RM3195 (ludzkie izolaty) (9). Genom bakterii rodzaju *Campylobacter* stanowi kolistą cząsteczka DNA (1,641-1,778 Mb) o wielkości zbliżonej do wielkości chromosomu bakterii spokrewnionego rodzaju *Helicobacter* (~1,667 Mb) a około trzy razy mniejsza od genomu *Escherichia coli* K12. Materiał genetyczny *Campylobacter* mogą stanowić również elementy pozachromosomalne, choć nie są one obecne we wszystkich szczepach (9).

Pomiędzy pięcioma analizowanymi genomami zaobserwowano różnice strukturalne. Genom szczepu *C. jejuni* RM 1221 jest synteniczny w stosunku do genomu *C. jejuni* NCTC 11168, choć zawiera cztery wintegrowane elementy (profagi/wyspy genomowe). Także po-

równanie genomów *C. jejuni* i *C. coli* wykazało pewien poziom syntenii, podczas gdy genomy *C. lari* i *C. upsaliensis* posiadają zupełnie odmienną organizację. Przeprowadzona analiza porównawcza nie wykazała znaczących różnic pomiędzy wymienionymi powyżej genomami w odniesieniu do regulacji procesów transkrypcji. Wszystkie kodują trzy czynniki sigma RNAP oraz podobną liczbę białek układów dwuskładnikowych; pięć z nich wydaje się konserwatywnych wśród przedstawicieli różnych gatunków rodzaju *Campylobacter* (9).

Zawartość par (GC) w chromosomach analizowanych szczepów waha się od 29,6% do 34,5%. Jednak ich rozmieszczenie w materiale genetycznym nie jest równomierne. Cechą charakterystyczną obszarów kodujących jest nawet dwukrotnie wyższa liczba par GC (37%) niż w rejonach niekodujących, gdzie wynosi ona około 19% (9, 19). Analizowane genomy rodzaju *Campylobacter* charakteryzują się wysoką gęstością genów – dla *C. jejuni* sekwencje kodujące stanowią 94,3% (8).

Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych w genomach dwóch szczepów *C. jejuni* i jednego *C. coli* zidentyfikowano 1634-1835 otwartych ramek odczytu (ORF), kodujących zarówno funkcjonalne białka, jak i pseudogeny (7-47). Porównywanie sekwencji nukleotydowych genów *Campylobacter* z dostępnymi w internetowych bazach danych pozwoliło określić funkcję ponad 75% protein. Reszta ORF posiada w bazach danych homologi o nieudokumentowanej funkcji lub są to tzw. geny sieroce.

Genomy bakterii rodzaju *Campylobacter* cechuje niewielka liczba sekwencji insercyjnych (elementów IS brak w genomach *C. jejuni*, a w genomie *C. coli* zidentyfikowano ich zaledwie 5) oraz niska częstość występowania sekwencji repetytywnych. Opublikowaniu sekwencji nukleotydowej genomu *C. jejuni* szczepu NCTC 11168 towarzyszyło stwierdzenie wyjątkowej rzadkości występowania funkcjonalnych operonów w stosunku do genomów większości znanych organizmów prokariotycznych.

Wiele genów, zwłaszcza tych zaangażowanych w proces kolonizacji, jest silnie konserwatywnych. Występują we wszystkich przebadanych szczepach *Campylobacter*. Są to geny strukturalne rzęsek (region fla), geny uczestniczące w regulacji aparatu motorycznego (racR/S), warunkujące oddziaływanie z komórkami eukariotycznymi (cadF, ciaB), kodujące adhezyny (jlpA, peb1, cjaA) jak również kodujące podjednostki cytotoksyny (cdt). Podobnie procesy metaboliczne wydają się przebiegać podobnie z pewnymi różnicami dotyczącymi cyklu kwasów trójkarboksylowych, podczas gdy geny warunkujące lekooporność oraz odpowiedzialne za biosyntezę LPS-u, LOS-u i CPS-u wykazują wysoki stopień różnicowania między szczepami (9).

Mutagenesa transpozonowa, różnicująca hybrydyzacja. Strategia STM (signature-tagged mutagenesis) umożliwia na drodze różnicującej hybrydyzacji identyfikację w jednym eksperymencie wielu genów, których aktywność jest niezbędna do przeżycia bakterii patogennych w organizmie gospodarza. Ponieważ jak dotąd nie opracowano techniki mutagenesy transpozonowej *in vivo* skutecznej w odniesieniu do komórek rodzaju *Campylobac-*

ter, Hendrixson i DiRita w celu identyfikacji genów *C. jejuni* 81176 zaangażowanych w proces kolonizacji jelit ślepych u 1-dniowych kurcząt, wykorzystali transpozon eukariotyczny, a proces transpozycji przeprowadzili *in vitro* stosując oczyszczony DNA chromosomalny (12). Tak przygotowany preparat DNA wykorzystano do transformacji komórek *C. jejuni* 81176. Dalsze etapy techniki STM przebiegały standardowo i doprowadziły do identyfikacji 29 mutantów w 22 różnych genach potencjalnie warunkujących zdolność do zasiedlenia przewodu pokarmowego kurcząt. Inaktywacja ponad połowy z nich (12 genów) objawiała się fenotypowo brakiem zdolności mikroorganizmu do ruchu. Zidentyfikowano wiele uprzednio scharakteryzowanych genów warunkujących ruchliwość oraz kilka nowych dotychczas niebadanych. Są to: fliA (koduje podjednostkę σ^{28} polimerazy RNA); fliR (jego produkt uczestniczy w biosyntezie białek strukturalnych flagellum); motA i motB (kodują białka motoryczne aparatu ruchu); rpoN (gen podjednostki σ^{54} polimerazy RNA); cheY (nadrzędny regulator procesów chemotaktycznych); flgK i pflA (ich produkty to proteiny strukturalne rzęski) oraz geny oznaczone numerami Cj0248, Cj0454, Cj0618, Cj0883, które nie posiadają odpowiedników w dostępnych, komputerowych bazach danych. Mutanty we wszystkich genach wykazywały obniżoną zdolność zasiedlenia jelit (10-100 razy) w porównaniu ze szczepem dzikim *C. jejuni* 81176. Szczepy defektywne w pozostałych dziesięciu genach, zidentyfikowane w tym eksperymencie, zachowały zdolność do poruszania się, ale również kolonizowały jelita kurcząt na niższym poziomie, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje, że aktywne przemieszczanie się, choć jest istotnym czynnikiem wirulencji *Campylobacter*, nie odgrywa krytycznej roli w procesie kolonizacji jelit ptaków. Do tej grupy należały mutanty w genach uczestniczących w procesie N-glikozylacji białek (plgE, plgF i plgH), które zasiedlały przewód pokarmowy kurcząt na poziomie około 100-1000 razy niższym niż szczep dziki. Podobny fenotypowy efekt inaktywacji genu obserwowano w przypadku mutantów cj0903- i cj1019- (livJ). Produkty tych genów, których funkcja nie była jak na razie badana eksperymentalnie, wykazują wysoki stopień homologii do białek systemu transportu typu ABC, uczestniczących w wiązaniu i przenoszeniu aminokwasów do wnętrza komórki bakterii. Aminokwasy dla komórek *Campylobacter* nieposiadających genu kodującego fosfofruktokinazę stanowią ważne źródło nie tylko azotu, ale także węgla i energii (19). W obrębie analizowanej grupy genów na szczególną uwagę zasługują cj0019c i cj0020c, dwa zachodzące, prawdopodobnie ko-transkrybowane geny, których inaktywacja objawia się obniżeniem potencjału kolonizacyjnego nawet 1 milion razy. Nazwano je odpowiednio docA i docB (determinant of chick colonization). Pierwszy koduje białko homologiczne do protein grupy MCP (metyl-accepting chemotaxis protein), a drugi potencjalną peryplazmatyczną peroksydazę cytochromu c.

Inną techniką wykorzystywaną do analizy porównawczej genomów jest różnicująca hybrydyzacja. Jeden z jej wariantów polega na porównaniu metodą hybrydyzacji genomów różnych szczepów o różnych właściwościach

fenotypowych. Ahmed i wsp. porównywali chromosomalny DNA dwóch szczepów: *C. jejuni* 81116 (18) i *C. jejuni* NCTC 11168 (2, 19). Przeprowadzone testy kolonizacji wykazały, że izolat z 1983 r. (*C. jejuni* 81116) roku zasiedla jelita jednodniowych kurcząt na dużo wyższym poziomie niż szczep NCTC 11168. Analiza hybrydyzacyjna pozwoliła zidentyfikować fragmenty DNA charakterystyczne dla szczepu 81116 i nieobecne w genomie szczepu zsekwencjonowanego, tym samym umożliwiła podjęcie prób wyjaśnienia różnic w ich potencjale kolonizacyjnym. Zidentyfikowano 23 klonów zawierające sekwencje nukleotydowe unikatowe dla szczepu *C. jejuni* 81116 (2). Poznanie indywidualnej funkcji genów tych fragmentu DNA wymaga bardziej szczegółowych badań.

Globalna analiza procesów transkrypcji szczepów *Campylobacter*. Badania transkryptomów przeprowadzono dla szczepów *C. jejuni*, korzystając z faktu zsekwencjonowania w 2000 r. genomu szczepu *C. jejuni* NCTC 11168 (19). Szczep ten został zamrożony i jest przechowywany w kolekcji ATCC pod numerem 700819. Klon, którego genom zsekwencjonowano, był wielokrotnie pasażowany w laboratorium na sztucznych podłożach. Porównywano profile transkrypcyjne dwu szczepów, NCTC 11168-V1 i NCTC 11168-V26 (6). NCTC 11168-V1 stanowił pobrany w 2000 r. z kolekcji ATCC pierwotny izolat kliniczny, a NCTC 11168-V26 – poddawany wielokrotnym pasażom laboratoryjnym od momentu pierwotnej izolacji w 1977 r. Warianty te wykazywały istotne różnice fenotypowe. Jedną z nich dotyczyła poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt. Wariant V1 okazał się dużo bardziej agresywnym kolonizatorem.

W odróżnieniu od genomów obu szczepów NCTC 11168, które nie wykazywały znaczących różnic, porównanie ich transkryptomów ujawniło znaczne zróżnicowanie ich profilów transkrypcyjnych. Dotyczyło ono głównie poziomu ekspresji genów związanych z syntezą wici, toksyny, katalazy, białek wiążących żelazo oraz genu *pse*, którego produkt wpływa na proces glikozylacji flagelliny. Wszystkie te geny, niewątpliwie odgrywające rolę w procesie kolonizacji, ulegały ekspresji na wyższym poziomie w szczepie V1. Podobne obserwacje poczyniono analizując metodą dwukierunkowej elektroforezy i spektrometrii mas proteomy badanych dwu wariantów szczepu *C. jejuni* NCTC 11168 (6).

Analogiczne eksperymenty przeprowadzili Gaynor i wsp., stosując do badań dwa szczepy *C. jejuni* NCTC 11168: 11168-O (zamrożony, oryginalny szczep) i jego pochodną nazwaną 11168-GS (szczep wielokrotnie pasażowany w warunkach laboratoryjnych). Podobnie jak w wyżej omówionych eksperymentach, te dwa warianty, choć nierozróżnialne przy zastosowaniu molekularnych metod genotypowania, takich jak AFLP, PFGE, czy różnicująca hybrydyzacja, wykazywały wiele różnic fenotypowych (ruchliwość, poziom kolonizacji kurcząt, morfologia, inwazyjność). Przebadanie profili transkrypcyjnych wariantu 11168-GS i 11168-O metodą mikropaneli ujawniło, że poziom ekspresji wielu genów i operonów, głównie związanych z procesami oddechowymi i glukoneogenezą oraz ruchliwością, istotnie różnił dwa warianty szczepu *C. jejuni* NCTC 11168.

Regulacja ekspresji genów uczestniczących w kolonizacji przewodu pokarmowego drobiu – dwuskładnikowe układy regulacyjne

Dwuskładnikowe układy regulacyjne, TCSTS (two-component signal transduction system), stanowią istotne mechanizmy regulacji ekspresji genów *Campylobacter*, zwiększające adekwatność odpowiedzi bakterii na napływające ze środowiska specyficzne sygnały. Systemy te w najprostszym układzie składają się z dwóch białek: kinaz histydynowych (białek transbłonowych, pełniących rolę sensorów) i regulatorów transkrypcji – białek cytoplazmatycznych, będących efektorami układu. Aktywacja elementu sensorowego, polegająca na jego autofosforylacji, zachodzi poprzez oddziaływanie bodźców środowiskowych. Komunikacja sensora z efekto-rem odbywa się na drodze odwracalnej fosforylacji – przekazanie reszty fosforowej z histydyny białka sensorowego na asparaginę wykazujące powinowactwo do DNA efektora powoduje jego przejście w stan aktywny, w którym może regulować – wzmacniać lub osłabiać – proces transkrypcji.

W genomie *C. jejuni* NCTC 11168 zidentyfikowano dziewięć genów kodujących potencjalne białka regulatorowe i sześć kodujących białka sensorowe TCSTS. Podobna liczba tego typu białek regulatorowych występuje w proteomach czterech innych przedstawicieli rodzaju *Campylobacter* o zsekwencjonowanych genomach (9, 19). Jak dotąd trzy z tych układów były analizowane eksperymentalnie: *DccR/DccS* (diminished capacity to colonize) (16), *RacR/RacS* (reduced ability to colonize) (5) oraz *FlgR/FlgS* (flagella) (23).

Pierwszy wymieniony system białek, którego aktywność niezbędna jest do osiągnięcia optymalnego poziomu kolonizacji, został nazwany *DccR/DccS*. Składa się z dwu genów, *cj1223c* – *cj1222c*, tworzących jednostkę transkrypcyjną, kodujących odpowiednio białko regulatorowe i białko sensorowe. Aktywność tego systemu dwuskładnikowego nie wpływa na kilka przebadanych cech fenotypowych w warunkach *in vitro*, w przeciwieństwie do zachowania szczepu *in vivo* w organizmie gospodarza (16). Otrzymane na drodze wymiany alleli mutanty w genie *dccR*, niewytwarzające białka regulatorowego, wykazują znacząco obniżoną zdolność kolonizacji przewodu pokarmowego dwu gatunków zwierząt: kurcząt (1-dniowe ptaki) oraz myszy – szczep C3H I-LF (immunocompetent limited flora) i SCID-LF (severe combined immunodeficient limited flora). Dokładne badania transkryptomów szczepu zmutowanego oraz szczepu nadprodukującego białko regulatorowe umożliwiły identyfikację genów będących celem działania omawianego układu dwuskładnikowego. Odnaleziono trzy geny, których poziom transkrypcji był znacząco wyższy w szczepie nadprodukującym białko *DccR* w porównaniu z izogenicznym mutantem. Wszystkie trzy niezależnie transkrybowane geny (*cj0200c*, *cj1626c* oraz *cj1356c*) to geny sieroce, kodujące pozacytoplazmatyczne białka o nieznanym celu. Sygnał rozpoznawany przez układ dwuskładnikowy *DccR/DccS* pozostaje jak dotąd nieznanym.

Drugi z systemów TCSTS, istotny dla wzrostu, a prawdopodobnie także przeżywalności *C. jejuni* w jego naturalnym środowisku jelita, to dwuelementowy układ RacR/RacS (5). Komórki mutantu racR, które nie wytwarzają funkcjonalnego regulatora, tworzą mniejsze kolonie od bakterii szczepu dzikiego, zarówno w temperaturze 37°C, jak i 42°C. Ponadto mutant wykazywał znacząco obniżoną zdolność kolonizacji jelita kurcząt. Na podstawie porównania profilu białek mutantu i szczepu dzikiego zidentyfikowano co najmniej 11 genów, których ekspresja podlega regulacji, pozytywnej lub negatywnej, przez białko RacR. Układ RacS/RacR odpowiada za regulację transkrypcji w odpowiedzi na zmiany temperatury.

Trzeci, najdokładniej przeanalizowany eksperymentalnie dwuskładnikowy system regulacyjny, to układ FlgS/FlgR, odpowiedzialny za regulację ekspresji regulonu fla, związanego z tworzeniem wici komórek *Campylobacter* (23). W komórkach bakterii Gram-ujemnych geny kodujące białka strukturalne budujące aparat wici ulegają ekspresji w hierarchicznym porządku, w kolejności zgodnej z sekwencją ich włączania do powstającego organellum. Wic *Campylobacter* zbudowana jest głównie z białka FlaA, choć w niewielkiej ilości występuje w niej także białko FlaB. W procesie biogenezy wici uczestniczą produkty ponad 50 genów zlokalizowanych w 32 loci, co sugeruje złożoność mechanizmu kontroli regulonu fla (11). Nadrzędną rolę w kaskadzie zjawisk regulacyjnych pełni białko układu dwuskładnikowego FlgS/FlgR, w którym FlgS jest sensorową kinazą, a FlgR (homolog NtrC) – białkiem regulatorowym indukującym transkrypcję genów zależnych od RpoN. Badania Carrillo i współpracowników wykazały dodatkową regulacyjną funkcję białka FlhA, które nie tylko tworzy aparat sekrecyjny, ale także kontroluje poziom transkrypcji genów regulonu fla zarówno tych zależnych od czynnika sigma-54, jak i od czynnika sigma-28 (6). Testy kolonizacji przewodu pokarmowego 1-dniowych kurcząt wykazały 10-krotnie obniżoną zdolność zasiedlania jelit drobiu przez mutanty defektywnych w systemie FlgR/S (23).

Podsumowanie

Przedstawione dane dotyczą jednych z pierwszych eksperymentów analizujących zjawisko komensalizmu. Różnorodnymi metodami, zarówno na drodze inaktywacji poszczególnych genów, jak też analizując genomy i transkryptomy kilku szczepów *C. jejuni/coli* starano się ustalić zestaw genów i sekwencję zdarzeń prowadzących do zasiedlenia jelit kurcząt przez te mikroorganizmy. Niewątpliwie jest to proces złożony wymagający aktywności wielu białek. Wykazano, że zdolność do ruchu jest czynnikiem ułatwiającym, ale niewystarczającym do zasiedlenia tej niszy ekologicznej przez pałeczki *Campylobacter*. Bezsprzecznie w kolonizacji bierze udział co najmniej kilka białek podlegających procesowi N-glikozytacji. W procesie kolonizacji odgrywają rolę zarówno geny metabolizmu podstawowego (transport aminokwasów), jak i „typowe” geny wirulencji odpowiedzialne za oddziaływanie patogenu z komórkami eukariotycznymi.

Piśmiennictwo

1. Aarestrup F. M., Wegener H. C.: The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 1999, 1, 639-644.
2. Ahmed I. H., Manning G., Wassenaar T. M., Cawthraw S., Newell D. G.: Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiology* 2002, 148, 1203-1212.
3. Altekruuse S. F., Stern N. J., Fields P. I., Swerdlow D. L.: *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5, 28-35.
4. Bacon D. J., Szymanski C. M., Burr D. H., Silver R. P., Alm R. A., Guerry P.: A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol. Microbiol.* 2001, 40, 769-777.
5. Bras A. M., Chatterjee S., Wren B. W., Newell D. G., Ketley J. M.: A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 3298-3302.
6. Carrillo C. D., Taboada E., Nash J. H., Lanthier P., Kelly J., Lau P. C., Verhulst R., Mykytczuk O., Sy J., Findlay W. A., Amoako K.: Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 20327-20338.
7. Corry J. E., Atabay H. I.: Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 2001, 96S-114S.
8. Eppinger M., Baar C., Raddatz G., Huson D. H., Schuster S. C.: Comparative analysis of four *Campylobacteriales*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 872-885.
9. Fouts D. E., Mongodin E. F., Mandrell R. E., Miller W. G., Rasko D. A., Ravel J., Brinkac L. M., DeBoy R. T., Parker C. T., Daugherty S. C.: Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol.* 2005, 3, e15.
10. Gaynor E. C., Cawthraw S., Manning G., MacKichan J. K., Falkow S., Newell D. G.: The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 503-517.
11. Guerry P., Alm R. A., Szymanski C. M., Trust T. J.: Structure, function, and antigenicity of *Campylobacter* flagella, [w:] Nachamkin I., Blaser M. J. (red.): *Campylobacter*. 2nd edition, American Society of Microbiology, Washington D.C. 2000, 405-421.
12. Hendrixson D. R., DiRita V. J.: Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol.* 2004, 52, 471-484.
13. Jones M. A., Marston K. L., Woodall C. A., Maskell D. J., Linton D., Karlyshev A. V., Dorrell N., Wren B. W., Barrow P. A.: Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 to high-level colonization of the avian gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 2004, 72, 3769-3776.
14. Karlyshev A. V., Everest P., Linton D., Cawthraw S., Newell D. G., Wren B. W.: The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* 2004, 150, 1957-1964.
15. Konkel M. E., Kim B. J., Rivera-Amill V., Garvis S. G.: Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol. Microbiol.* 1999, 32, 691-701.
16. MacKichan J. K., Gaynor E. C., Chang C., Cawthraw S., Newell D. G., Miller J. F., Falkow S.: The *Campylobacter jejuni* dccRS two-component system is required for optimal in vivo colonization but is dispensable for in vitro growth. *Mol. Microbiol.* 2004, 54, 1269-1286.
17. Nachamkin I., Allos B. M., Ho T.: *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 555-567.
18. Palmer S. R., Gully P. R., White J. M., Pearson A. D., Suckling W. G., Jones D. M., Ravess J. C., Penner J. L.: Water-borne outbreak of *Campylobacter gastroenteritis*. *Lancet* 1983, 1, 287-290.
19. Parkhill J., Wren B. W., Mungall K., Ketley J. M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R. M., Feltham T., Holt R. S.: The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 2000, 403, 665-668.
20. Power P. M., Jennings M. P.: The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 218, 211-222.
21. Sahin O., Luo N., Huang S., Zhang Q.: Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5372-5379.
22. Skirrow M. B., Blaser M. J.: Clinical aspects of *Campylobacter* infection, [w:] Nachamkin I., Blaser M. J. (red.): *Campylobacter*. American Society of Microbiology, Washington D.C. 2000, 69-89.
23. Wosten M. M., Wagenaar J. A., van Putten J. P.: The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 16214-16222.
24. Young N. M., Brisson J. R., Kelly J., Watson D. C., Tessier L., Lanthier P. H., Jarrell H. C., Cadotte N., St Michael F., Aberg E., Szymanski C. M.: Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 42530-42539.
25. Ziprin R. L., Young C. R., Stanker L. H., Hume M. E., Konkel M. E.: The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Dis.* 1999, 43, 586-589.