

Molekularne aspekty chorobotwórczości *Listeria monocytogenes*

KATARZYNA DMOWSKA, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Dmowska K., Osek J.

Molecular aspects of *Listeria monocytogenes* pathogenicity

Summary

Listeria monocytogenes is a Gram-positive facultative intracellular pathogen. It is commonly found in environments such as surface water, soil, plant and animal tissues. *L. monocytogenes* is also widely distributed in food, especially in meat, smoked fish, raw milk, cheese, eggs and raw vegetables. These bacteria are able to survive in conditions of processes related to food production, e.g. cooling temperature. That capacity makes contaminated food the main source of human infections. The number of consumed bacteria in food and the health of the human influence the course of the infection. People with intact immune systems usually show harmless symptoms: abdominal pains, diarrhea and increased body temperature. In the case of people with deficient immunity, especially pregnant women and elderly, infection can lead to a serious disease called listeriosis. In the last years listeriosis has become one of the most dangerous food-borne diseases with a high mortality rate: 20-30%. According to the EFSA report the number of cases of the disease in the European Union in 2007 was 1,558. *L. monocytogenes* is able to produce various virulence factors linked to the pathogenesis that allow the bacteria to avoid or significantly reduce the effects of the host immune responses. Mechanisms responsible for the pathogenic properties of bacteria are objects of research interest. The results of these studies will create more effective ways of preventing and treating the disease, e.g. by producing inhibitory substances for controlling bacteria growth in foods or identifying targets for new antimicrobial agents. Despite molecular biological tools that have contributed to significant progress in research on genes related to the pathogenesis of *L. monocytogenes* infections several aspects of the disease still need to be researched to understand its processes.

Keywords: *L. monocytogenes*, listeriosis, virulence factors

Listeria monocytogenes jest bakterią wykazującą dwa odrębne sposoby bytowania: saprofityczny w glebie oraz pasożytniczy w tkankach ssaków i ptaków (22). Komórki *L. monocytogenes* są niewielkimi ($0,5 \times 0,5-2 \mu\text{m}$), Gram-dodatnimi pałeczkami. Nie tworzą otoczek ani endospor, wykazują ruchliwość tylko w przedziale temperaturowym 10-25°C. Bakterie te są fakultatywnie tlenowe, wytwarzają katalazę, nie produkują oksydazy. Mają zdolność wzrostu w zakresie temperatur 0-45°C i pH 4,4-9,6. Są powszechnie występującymi w przyrodzie drobnoustrojami, obecnymi w wodach powierzchniowych, ściekach, glebie, tkankach roślinnych i zwierzęcych. Rok 1924 uważany jest za datę odkrycia *L. monocytogenes*, gdy Murray i wsp. wyizolowali bakterię, która wywołała posocznicę u królików i świnek morskich wykorzystywanych do badań w ich laboratorium (24).

Bakterie są zdolne przeżywać w warunkach procesów technologicznych związanych z produkcją żywności, między innymi tolerują dużą koncentrację soli

i niskie pH. Są w stanie namnażać się w temperaturze chłodniczej w zakresie od 1°C do 4°C. Zdolność ta sprawia, że głównym źródłem zakażenia człowieka jest zanieczyszczona żywność, zwłaszcza mięso, wędzone ryby, surowe mleko, sery, jaja i surowe warzywa (9).

Ogólna charakterystyka listeriozy

Schorzenia wywoływane przez *L. monocytogenes* u ludzi i zwierząt określane są nazwą listerioza. Pierwszy potwierdzony klinicznie przypadek tej choroby u ludzi opisano w 1929 r. w Danii. Przez wiele lat podłoże choroby pozostawało niezbadane, ze względu na trudności w pozyskaniu izolatów bakteryjnych. W 1983 r. odnotowano serie zachorowań na listeriozę w Ameryce Północnej i Europie, co sprawiło, że zaczęto postrzegać chorobę jako realne zagrożenie epidemiologiczne. *L. monocytogenes* była obiektem zainteresowań naukowców jeszcze zanim zaliczono ją do grupy czynników chorobotwórczych niebezpiecz-

nych dla ludzi. Wykorzystywano ją bowiem do badań immunologicznych jako prototyp wewnątrzkomórkowego patogenu. Modelowe infekcje *L. monocytogenes* prowadzone na myszach pozwoliły zrozumieć mechanizmy występujące podczas odpowiedzi immunologicznej, np. udział przeciwciał w zwalczaniu zakażeń wywołanych wewnątrzkomórkowymi patogenami czy też znaczenie makrofagów w eliminacji bakterii z organizmu (24).

Na podstawie dostępnych informacji zakłada się, że efekt kliniczny zakażenia *L. monocytogenes* jest zależny od: liczby komórek bakterii, jakie dostają się do organizmu np. wraz z żywnością, właściwości patogennych szczepu oraz statusu immunologicznego organizmu żywiciela. W przypadku osób z poprawnie funkcjonującym układem odpornościowym niewielka ilość bakterii obecna w spożytym pokarmie zwykle nie wywołuje żadnych objawów klinicznych. W innych warunkach zmiany chorobowe zależą od właściwości chorobotwórczych *L. monocytogenes* i przejawiają się najczęściej bólami brzucha, biegunką, podwyższoną ciepłotą ciała. Pierwsze objawy są widoczne po około 12 godzinach od zakażenia. Inne w skutkach są infekcje osób z obniżoną odpornością (24). Listerioza jest szczególnie niebezpieczna dla kobiet w ciąży, noworodków oraz osób w podeszłym wieku (16). Może także wystąpić u osób z osłabionym układem odpornościowym na skutek chorób nowotworowych, hemodializ, niewydolności wątroby, cukrzyca, zakażenia wirusem HIV (13). W tych przypadkach często występują ciężkie objawy chorobowe, do których należą: zapalenie opon mózgowych, poronienia u kobiet w ciąży, posocznica u noworodków (9). *L. monocytogenes* wykazuje różne powinowactwo do tkanek gospodarza i na podstawie klinicznych form listeriozy stwierdzono, że szczególnie tropizm posiada do macicy, płodu oraz ośrodkowego układu nerwowego. Bakterie przedostają się do płodu za pośrednictwem łożyska, w efekcie czego może dojść do przedwczesnych porodów czy poronień. Natomiast infekcja centralnego układu nerwowego objawia się przede wszystkim jako zapalenie opon mózgowych, w przebiegu którego obserwuje się często obecność ognisk zapalnych w pniu mózgu (24). U ludzi 96% przypadków choroby wywoływane jest przez 3 serotypy *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 4b (16). Z tej grupy najwięcej zachorowań powoduje serotyp 4b, co może sugerować jego większą zjadliwość niż pozostałych (14).

Listerioza jest stosunkowo rzadko występującą chorobą odzwierzęcą, jednak z uwagi na wysoką śmiertelność, która waha się w granicach 20-30%, poświęca jej dużo uwagi (23). Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), zajmując się monitorowaniem czynników zakaźnych występujących w żywności w Europie, w swoim raporcie z 2007 r. podał, że liczba przypadków listeriozy w państwach Unii Europejskiej wyniosła 1558, a współczynnik zachorowań wyniósł 0,3 w przeliczeniu na 100 000 osób (25). Pod

względem liczby zachorowań *L. monocytogenes* znalazła się na 5. miejscu za *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* i *Escherichia coli* O157:H7 (25, 26). W Polsce stwierdzono w tym czasie 43 potwierdzone laboratoryjnie przypadki choroby. Państwami europejskimi, gdzie zaobserwowano największą liczbę zachorowań w 2007 r. były Niemcy (356 zachorowań), Francja (319 przypadków) i Wielka Brytania (261 zachorowań). Głównym źródłem zakażeń człowieka jest żywność, dlatego bardzo ważne są wiarygodne informacje na temat obecności *L. monocytogenes* w różnego rodzaju środkach spożywczych. Żywność, w której zawartość bakterii nie przekracza 100 komórek/g nie jest zwykle zagrożeniem dla zdrowego organizmu. W 2007 r. odsetek przebadanych próbek, w których *L. monocytogenes* znalazła się powyżej tego limitu wahał się od 0% do 2,2%. Największą grupę produktów zanieczyszczonych tymi bakteriami stanowią ryby wędzone i produkty rybne gotowe do spożycia. Przekroczenia granicy bezpieczeństwa były także obserwowane w odniesieniu do innych produktów spożywczych, takich jak mięso i sery. Środki te zostały uznane przez EFSA za najbardziej niebezpieczne, jeśli chodzi o możliwość zakażenia *L. monocytogenes*, zarówno w 2006, jak i 2007 r. (25, 26).

Proces patogenezy

Podczas inwazji tkanek żywiciela *L. monocytogenes* włącza mechanizmy, które pozwalają jej uniknąć lub znacznie ograniczyć efekty odpowiedzi immunologicznej gospodarza, dzięki czemu jest w stanie wydostać się z fagosomu do cytoplazmy, tam namnażać i rozprzestrzeniać do sąsiednich komórek (20). Przewód pokarmowy stanowi drogę wejścia patogenu do organizmu człowieka (24). Bakterie, które przetrwały kontakt z kwasowym środowiskiem żołądka, enzymami proteolitycznymi, a także innymi czynnikami stresowymi na swojej drodze dokonują inwazji tkanek żywiciela za pośrednictwem nabłonka jelitowego (17). Po przekroczeniu bariery jelitowej rozprzestrzeniają się przez krew i limfę. W badaniach przeprowadzonych na dożylnie zainfekowanych myszach zaobserwowano, że bakterie są dosyć szybko usuwane z krwioobiegu przez makrofagi, a następnie, w około 90%, są akumulowane w wątrobie. Istnieją dwa sposoby, na drodze których *Listeria* może dostać się do wątroby. Może to zrobić za pomocą komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego – komórek Kupfflera lub też przez bezpośrednią inwazję hepatocytów przez przestrzeń Dissego. Dzięki swoim zdolnościom część bakterii przeżywa pierwszy kontakt z makrofagami gospodarza. Głównym miejscem namnażania się drobnoustrojów są hepatocyty. Bezpośrednie przejście bakterii z hepatocytu do hepatocytu prowadzi do powstania ogniska infekcji. *Listeria* rozprzestrzenia się w wątrobie nie narażona na kontakt z przeciwciałami gospodarza, co wyjaśnia, dlaczego nie odgrywają one znaczącej roli w odpowiedzi immunologicznej. Jeśli in-

fekcja nie zostanie opanowana na etapie wstępnego namnażania się *Listeria* w komórkach wątroby, to dochodzi do uwolnienia bakterii do krwiobiegu, skąd przedostają się one do organów docelowych, np. macicy czy ośrodkowego układu nerwowego (24).

Mechanizm patogenezы listeriozy można podzielić na 4 etapy: adhezja do komórek gospodarza, proces wnikania, ucieczka z pęcherzyka fagocytarnego do cytoplazmy, namnażanie i rozprzestrzenianie się do innych komórek (10).

Adhezja. *Listeria* jest w stanie dokonać inwazji zarówno komórek fagocytujących, jak i pozbawionych tej zdolności, np. komórek nabłonkowych, dendrytycznych, fibroblastów czy hepatocytów (20). Rozpoznanie przez bakterie odpowiednich komórek gospodarza i adhezja do nich zapoczątkowują proces patogenezы schorzenia. Przyczepność ta jest możliwa dzięki temu, że *Listeria* wykazuje powinowactwo do różnych receptorów obecnych na komórkach eukariotycznych. W procesie adhezji biorą udział m.in. białka należące do grupy internalin, jak również białko p60 (24).

Wnikanie. Po etapie przyczepiania się do komórek gospodarza bakterie przedostają się do ich wnętrza w postaci pęcherzyka fagocytarnego. W zależności od tego, jaki rodzaj komórki jest celem ataku *Listeria*, możemy mówić o procesie fagocytozy naturalnej i indukowanej. W pierwszym przypadku jest ona przeprowadzana przez makrofagi, natomiast w komórkach nie fagocytujących proces ten jest indukowany za pośrednictwem białek powierzchniowych obecnych na komórkach gospodarza. W jego wyniku dochodzi do rozwoju zmian w cytoszkielecie komórki i do reorganizacji struktury ściany komórkowej, a następnie wchłonięcia bakterii (20).

Ucieczka z fagosomu. Kolejnym etapem w cyklu rozwojowym patogenu w organizmie jest ucieczka z pęcherzyka fagocytarnego. Stwierdzono, że już po 30 minutach od zamknięcia bakterii w fagosomie zaczynają one niszczyć jego błonę, a po dwóch godzinach od momentu przedostania się do komórki połowa bakterii znajduje się już poza nim (24). Ucieczkę z fagosomu umożliwiają enzymy wytwarzane przez *L. monocytogenes* m.in. listeriozyna i fosfolipazy (20).

Proliferacja i rozprzestrzenianie. Znajdujące się w cytoplazmie bakterie zaczynają się namnażać i w ciągu godziny podwajają swoją liczbę. Jak wykazały badania, *in vivo* proces ten odbywa się 3 razy wolniej niż ma to miejsce *in vitro* na podłożu bogatym we wszystkie składniki odżywcze. Bakterie powstałe po proliferacji są szybko otaczane przez filamenty aktywne, które na jednym biegunie tworzą ogon aktywny o długości około 40 μm . Element ten zbudowany jest z dwóch rodzajów filamentów: długich, ułożonych osiowo oraz krótkich, rozmieszczonych przypadkowo. Struktury te umożliwiają przemieszczanie się bakterii wewnątrz komórek gospodarza z prędkością 0,3 $\mu\text{m/s}$. Drobnoustroje przedostają się następnie do sąsiednich komórek w postaci pęcherzyka fagocytarnego. W cią-

gu kolejnych 5 minut patogen uwalnia się z fagosomu do cytoplazmy, gdzie inicjuje kolejną rundę podziałów wewnątrzkomórkowych. W formowaniu się filamentów i przemieszczaniu się bakterii z komórki do komórki pośredniczy białko powierzchniowe ActA (24).

Czynniki wirulencji i geny odpowiedzialne za ich ekspresję

L. monocytogenes jest w stanie wytworzyć szereg czynników chorobotwórczości, odgrywających ważną rolę w procesie patogenezы listeriozy.

Internalina A to białko o masie 88 kDa, które jest produktem ekspresji genu *inlA* wchodzącego w skład operonu *inlAB* (15). Receptorem powierzchniowym dla internaliny A jest glikoproteina transbłonowa E-katheryna, obecna w różnych komórkach makroorganizmu. Podczas kontaktu bakterii z komórkami makroorganizmu białko rozpoznaje zewnątrzkomórkową domenę E-katheryny, efektem czego jest powstanie kompleksu bakteria–komórka receptorowa. W konsekwencji struktura przestrzenna glikoproteiny zmienia się, a cytoszkielet komórki gospodarza ulega reorganizacji i bakterie zostają wchłonięte do wnętrza (20).

Internalina B jest białkiem o masie cząsteczkowej 65 kDa, kodowanym przez gen *inlB* (17). Receptorem dla tego białka na komórkach ssaków jest transbłonowy czynnik wzrostu hepatocytów c-Met, który posiada aktywność kinazy tyrozynowej. Innym miejscem adhezji internaliny B jest glikoproteina *gC1q-R*. Internalina B jest białkiem odpowiedzialnym za indukowanie fagocytozy w komórkach, które nie posiadają normalnie tej zdolności, np. komórkach nabłonka, śródbłonka czy hepatocytach. W miarę postępu badań nad modelem patogenezы listeriozy opisywane są kolejne białka należące do tej rodziny, posiadające cechy wzbudzania fagocytozy w komórkach gospodarza; do tej pory odkryto ich około 25 (20).

Białko p60 inaczej nazywane białkiem Cwh A (cell wall hydrolase A) jest kodowane przez gen *iap* (invasion associated protein). Występuje ono w podobnej formie we wszystkich szczepach *Listeria* (24). Zakłada się, że ze względu na charakter zasadowy białka jego receptor na powierzchni komórki eukariotycznej ma charakter kwasowy. Oprócz funkcji adhezyjnej posiada też zdolność hydrolizowania mureiny. Na podstawie badań prowadzonych na mysim modelu infekcji *L. monocytogenes* stwierdzono, że delecja genu odpowiedzialnego za ekspresję białka p60 skutkuje znacznym obniżeniem zdolności adhezyjnych bakterii, m.in. przez zaburzenie dystrybucji internaliny A. Podobnym do wyżej wymienionego białka jest proteina Ami, która również bierze udział w adhezji i hydrolizie mureiny komórek gospodarza (20).

Białko Auto jest produktem genu *aut*. Jak wykazały ostatnie badania, nie ma ono właściwości adhezyjnych, a jego funkcja polega na kontroli struktury ściany komórkowej podczas procesu wnikania *Listeria* do ko-

mórek organizmu. Białko Auto jest czynnikiem wpływającym na zwiększoną zjadliwość bakterii. Jego obecność jest wymagana podczas wnikania bakterii do komórek, które nie są zdolne do fagocytozy. Na podstawie badań prowadzonych na myszach i świnkach morskich, którym podano *L. monocytogenes* pozbawione aktywności genu *aut*, zaobserwowano znacznie mniejszą zjadliwość takich bakterii dla organizmu w porównaniu do drobnoustrojów z prawidłowo funkcjonującym genem *aut* (5).

Białko FbpA ma masę cząsteczkową 55,3 kDa i jest produktem ekspresji genu *fbpA*. Wykazuje ono powinowactwo do fibronektyny komórek ludzkich, z którą łączy się *in vivo*, zapewniając adhezję powierzchniową komórek *L. monocytogenes*. Stwierdzono również, że białko FbpA pełni funkcję regulacyjną w stosunku do listeriozyny i internaliny B, która polega na stabilizacji i ochronie białek przed degradacją podczas ich transportu i wydzielania.

Sortaza A jest białkiem o masie cząsteczkowej 24 kDa, kodowanym przez gen *strA*. Rozpoznaje ono charakterystyczny fragment w cząsteczce białka, wchodzi z nim w interakcje i przez to bierze udział w wydzielaniu i stabilizacji internalin w ścianie komórki bakteryjnej (20).

Listeriozyna O (LLO) jest enzymem należącym do hemolizyn zależnych od cholesterolu, tzn. rozkładających błony biologiczne, zawierające w swoim składzie cholesterol. Jest to białko o masie cząsteczkowej 58 kDa, będące produktem ekspresji genu *hly*. Opracowano model listeriozyny, który zawiera cztery domeny: jedna z nich ma za zadanie wiązać się z błoną komórek makroorganizmu, a pozostałe biorą udział w tworzeniu w niej porów. Oddziaływanie listeriozyny z cholesterolem powoduje zmiany w strukturze białka: z hydrofilowego staje się hydrofobowe. Cząsteczki toksyny fragmentami zakotwiczone w błonie komórkowej zaczynają polimeryzować między sobą, formując struktury porów. Zamknięcie bakterii w fagosomie obniża pH, co pociąga za sobą aktywację listeriozyny. Po wydostaniu się bakterii z pęcherzyka jego zawartość miesza się z cytoplazmą, powodując wzrost pH i inaktywację toksyny. Badania *in vitro* wskazują, że listeriozyna O nie jest cytotoksyczna dla komórek, w których wnętrzu się znajduje. Dla potwierdzenia właściwości i funkcji listeriozyny na poziomie komórkowym użyto m.in. mikroskopu elektronowego i stwierdzono, że bakterie posiadające gen *hly* są w stanie wydostać się z fagosomu, w przeciwieństwie do drobnoustrojów nie mających tego markera genowego (15).

Fosfolipaza A, enzym biorący udział w ucieczce bakterii z fagosomu, jest kodowany przez gen *plcA*. Jego masa cząsteczkowa wynosi 33 kDa. Fosfolipaza A charakteryzuje się dużą specyficznością substratową, wykazuje najsilniejsze powinowactwo do fosfatydyloinozytolu. Enzym ten wspomaga listeriozynę O w czasie ucieczki z fagosomu. Podobnie jak listeriozyna, fosfolipaza A także działa w kwaśnym pH (15).

Fosfolipaza B jest to enzym katalizujący hydrolizę wiązania glicerolo-fosforanowego w cząsteczce fosfolipidów. Koduje ją gen *plcB*. Wyniki badań *in vitro* wskazują na fosfolipazę B jako kolejny czynnik wpływający na dezintegrację ścian fagosomu. Fosfolipaza B, w przeciwieństwie do odmiany A, wykazuje szerokie spektrum działania i ma zdolność reakcji z kilkoma substratami komórkowymi. Enzym ten powstaje w komórkach *L. monocytogenes* w formie nieaktywnej, a za przekształcenie proenzymu we właściwy enzym odpowiedzialna jest metaloproteaza, będąca produktem genu *mpl*. Aktywność metaloproteazy zależy od stężenia jonów wodorowych we wnętrzu komórki gospodarza. Niskie pH powoduje aktywację metaloproteazy, która indukuje przemianę proenzymu w aktywną formę fosfolipazy B (15).

Deacetylaza peptydoglikanu, enzym kodowany przez gen *pgdA*, stanowi kolejny czynnik wpływający na przeżycie *L. monocytogenes* w komórkach organizmu gospodarza. Jak wykazały badania *in vitro*, enzym ten pośredniczy w deacetylacji N-acetyloglukozaminy wchodzącej w skład peptydoglikanu budującego ścianę komórkową bakterii (8). Deacetylaza istotnie wpływa na właściwości chorobotwórcze bakterii. W wyniku modyfikacji peptydoglikanu ich ściana komórkowa staje się bardziej oporna na działanie lizozymu, powstającego w efekcie reakcji obronnej układu immunologicznego gospodarza. Stwierdzono, że bakterie, które zostały pozbawione aktywności genu *pgdA*, były niezwykle wrażliwe na działanie lizozymu, a w konsekwencji szybko niszczone przez makrofagi. Deacetylacja peptydoglikanu jest bardzo skutecznym mechanizmem wykorzystywanym przez *L. monocytogenes* w celu uniknięcia nieswoistych mechanizmów obronnych organizmu, zwłaszcza związanych z fagocytozą (3).

Dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD) jest enzymem kodowanym przez gen *sod*. Podobnie jak poprzednie białko, również dysmutaza przyczynia się pośrednio do wzrostu liczby komórek bakteryjnych, które przeżyły nieswoiste odczyny obronne organizmu. W reakcjach metabolicznych w komórkach gospodarza powstają reaktywne formy tlenu, np. anionorodniki tlenu, tlen singletowy, nadtlenki. Są one mediatorami w destrukcyjnej dla drobnoustrojów działalności fagocytów, a ich ograniczenie ilościowe jest ważnym elementem w dalszym przebiegu patogenezy listeriozy. Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję dysmutacji (równoczesne utlenianie jednych i redukcji innych cząsteczek tej samej substancji) dwóch cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru rozkładanego następnie przez katalazy i peroksydazy. Stwierdzono, że delecja genu kodującego MnSOD w komórkach *L. monocytogenes* spowodowała wzrost liczby bakterii unieszkodliwionych przez makrofagi makroorganizmu, co sugeruje, że zdolność do przeciwdziałania aktywnym formom tlenu jest poważnym elementem

biorącym udział w patogenezie schorzeń na tle *L. monocytogenes* (1).

Białko ActA, kodowane przez gen *actA*, odpowiada za przemieszczanie się bakterii w obrębie komórek gospodarza. Ruch ten możliwy jest m.in. dzięki polimeryzacji filamentów aktynowych. Badania potwierdzające kluczową rolę białka ActA w procesie ruchu *L. monocytogenes* polegały m.in. na transfekcji genu *actA* do komórek pochodzących od ssaków, w których następnie obserwowano formowanie się filamentów aktynowych. Inne doświadczenia obejmowały niepatogenne szczepy *Listeria innocua*, które po transfekcji były w stanie produkować białko ActA, zyskując jednocześnie zdolność do ruchu. W mechanizm przemieszczania się *L. monocytogenes* zaangażowane są również inne białka np. VASP, które zajmuje miejsce między ActA a monomerami aktyny. Jest ono odpowiedzialne za pobudzanie aktyny do polimeryzacji i determinowanie kierunku formowania się kompleksu lokomotorycznego. Innym czynnikiem odgrywającym pewne funkcje w procesie patogenezы listeriozy jest kompleks białkowy Arp2/3, który powoduje gromadzenie się filamentów aktyny na powierzchni bakterii. Składa się on z 7 białek, z których dwa mogą odgrywać rolę pierwszych monomerów podczas formowania się ogona aktynowego. Znana z udziału w przemieszczaniu się bakterii wewnątrz komórek, jak też między komórkami gospodarza, jest także profilina, która przyspiesza ruch oraz kofalina o bliżej nieokreślonej funkcji (7).

Bakterie, przedostając się do makroorganizmu, napotyka często na czynniki, które wymagają od nich podjęcia działań umożliwiających przeżycie w warunkach stresowych. Kwasowe środowisko żołądka, sole żółciowe, niskie pH, a także podwyższona osmotyczność wymuszają na drobnoustrojach produkcję różnych czynników, które zapewnią im przetrwanie. Oporność komórki bakteryjnej na działanie kwasów żółciowych warunkuje system Bile (bile exclusion). Początkowo uważano, że produkty genów nazywanych *lmo* 1421 i *lmo* 1422 są składnikami biorącymi udział w regulacji osmotyczności. Jednak, jak wykazały badania *in vitro*, system ten ma raczej związek z neutralizacją środowiska kwasowego gospodarza, w jakim znajdują się bakterie. Z tego też powodu wyżej wymienione geny nazwano zgodnie z pełnią funkcją *bile*. Inną formą obrony bakterii przed środowiskiem kwasowym jest ich aktywność hydrolityczna, mająca na celu neutralizację kwasów żółciowych. Aktywność ta jest warunkowana ekspresją genu *bsh* (bile salt hydrolaze). Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że białko kodowane przez ten gen bierze udział w patogenezы listeriozy na etapie kolonizacji przewodu pokarmowego przez *L. monocytogenes*.

Innym czynnikiem, wytwarzanym przez chorobotwórcze *L. monocytogenes*, mającym wpływ na pokonanie bariery żołądkowo-jelitowej gospodarza, są dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD). Są to

enzymy powstające w wyniku ekspresji genów *gadA* i *gadB*, stwierdzone u większości patogennych szczepów *L. monocytogenes*. W wyniku reakcji katalizowanej przez te enzymy z glutaminianu powstaje kwas γ -aminomasłowy (GABA), który następnie wydalany jest na zewnątrz komórki, a do wnętrza wnika glutaminian. W czasie reakcji pochłaniane są protony znajdujące się w cytoplazmie, co skutkuje wzrostem pH. Wyniki badań sugerują, że produkty spożywcze bogate w glutaminiany mogą zwiększać zdolność *L. monocytogenes* do tolerowania niskiego pH. Wykazano również, że niektóre patogenne izolaty *L. monocytogenes* posiadały geny kodujące enzymy, umożliwiające przemianę argininy w ornitynę z uwolnieniem amoniaku. W efekcie tych reakcji również następuje wzrost pH w środowisku obecności bakterii, a tym samym zwiększa to szansę na ich przeżycie i rozwój schorzenia u ludzi.

Czynnikiem stresowym, z którym bakterie spotykają się w trakcie przejścia z żołądka do jelita cienkiego, jest także wysokie ciśnienie osmotyczne. W odpowiedzi na te warunki komórki *L. monocytogenes* wykształciły system transportu błonowego zwany OpuC (osmoprotectant uptake). W warunkach niekorzystnych dla bakterii, a takie są obecne w jelitach, układ ten wychwytuje niektóre substancje ze środowiska i magazynuje je w cytoplazmie, utrzymując równowagę osmotyczną i zapobiegając w ten sposób utracie wody z własnej komórki. Za mechanizm ten odpowiedzialne są obecne w błonie komórkowej białka transportujące BetL i Gbu kodowane przez geny *betL* i *gbu* (11).

Regulacja ekspresji genów wirulencji

Kluczowe dla procesu patogenezы listeriozy geny znajdują się w obrębie tzw. wyspy patogenności (LIPI; *Listeria pathogenicity island*) (24). Ekspresja poszczególnych genów regulowana jest przez białko o masie cząsteczkowej 27 kDa, określone jako PrfA – pozytywny regulator transkrypcji A (15, 24). Najważniejsze z punktu widzenia procesu patogenezы schorzenia geny, należące do wyspy patogenności, to: *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *mpl*, *hpt*, *inlA*, *inlB*, *inlC*. Białko PrfA odbiera sygnały pochodzące od bakterii oraz ze środowiska, dzięki czemu zapewnia odpowiednią ekspresję genów w cytoplazmie gospodarza, a zahamowanie w innym środowisku, które nie wymaga ich aktywności. Regulacja aktywności genów zależnych od PrfA opiera się m.in. na zmianie koncentracji PrfA w komórkach *L. monocytogenes*, a także jego aktywności warunkowanej obecnością kofaktorów (22).

Regulator PrfA może powstawać m.in. z transkryptu niosącego informację kodującą tylko jedno białko lub też zawierającego geny PrfA i fosfolipazy A. Promotorami dla *prfA* są P1*prfA* i P2*prfA*, których głównym zadaniem jest zapewnienie stałej obecności niewielkiej ilości transkryptów w cytoplazmie komórki bakteryjnej (20). Białko regulatorowe może występować w formie nisko lub wysoko aktywnej, a zmiany

jego aktywności są wynikiem przekształceń konformacyjnych zachodzących za pośrednictwem kofaktorów. Komórki *L. monocytogenes* obecne w środowisku, które nie indukuje ekspresji genów zjadliwości, np. w niskiej temperaturze i przy niewielkiej ilości kofaktorów, wytwarzają PrfA z transkryptów obecnych stale w cytoplazmie komórki bakteryjnej. Taka ilość białka jest wystarczająca, aby stymulować ekspresję genów hly i plcA jednak zbyt mała, by indukować ekspresję innych czynników wirulencji (22). Z drugiej strony, gdy bakterie znajdują się w odpowiednim środowisku i temperaturze, dochodzi do aktywacji regulatora PrfA, który indukuje ekspresję genów wyspy patogenności oraz genu odpowiedzialnego za produkcję samego białka PrfA (24). Regulacja markera prfA jest termozależna, tzn. pozwala na szybką syntezę PrfA w chwili przedostania się bakterii do środowiska o wyższej temperaturze, np. krwioobiegu gospodarza. W tych warunkach PrfA indukuje własną produkcję na zasadzie sprzężenia zwrotnego (22).

Podsumowanie

Wskaźnik śmiertelności ludzi w przypadku zachorowań na listeriozę jest znacznie wyższy niż przy innych chorobach bakteryjnych, będących efektem spożycia zanieczyszczonej żywności. Z uwagi na to, że proces patogenezy oraz biorące w nim udział czynniki chorobotwórczości *L. monocytogenes* nie są do końca wyjaśnione, w ostatnim okresie coraz więcej uwagi poświęca się molekularnym aspektom patogenności tych bakterii. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za adhezję do komórek gospodarza, przenikanie mikroorganizmów przez nabłonek jelitowy oraz sposób namnażania się w makroorganizmie może wpłynąć na opracowanie skuteczniejszych sposobów ochrony przed infekcjami. Genom *L. monocytogenes* wykazuje duże podobieństwo z materiałem genetycznym innych gatunków należących do *Listeria*. Z drugiej jednak strony, istnieją znaczne różnice w potencjale chorobotwórczym między poszczególnymi mikroorganizmami. Dodatkowo, również serotypy *L. monocytogenes* różnią się między sobą pod względem wirulencji, co może sugerować ich odmienny rozwój filogenetyczny (4).

Piśmiennictwo

1. Archambaud C., Nahori M. A., Pizarro-Cerda J., Cossart P., Dussurget O.: Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 31812-31822.
2. Biju J., Wemer G.: Life of *Listeria monocytogenes* in the host cell's cytosol. *Microbes Infect.* 2007, 9, 1188-1195.
3. Boneca I. G., Dussurget O., Cabanes D., Nahori M. A., Sousa S., Lecuit M., Psylinakis E., Bouriotis V., Hugot J. P., Giovannini M., Coyle A., Bertin J., Namane A., Rousselle J. C., Cayet N., Prevost M. C., Balloy V., Chignard M., Philpott D. J., Cossart P., Girardin S. E.: A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *PNAS* 2007, 104, 997-1002.
4. Buchrieser C.: Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes Infect.* 2007, 9, 1147-1155.
5. Cabanes D., Dussurget O., Dehoux P., Cossart P.: Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol. Microbiol.* 2004, 51, 1601-1614.
6. Chico-Calero I., Suárez M., González-Zorn B., Scortti M., Slaghuis J., Goebel W., Vázquez-Boland J. A.: Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *PNAS* 2002, 99, 431-436.
7. Cossart P.: Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002, 291, 401-409.
8. Cossart P., Toledo-Arana A.: *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 2008, 10, 1041-1050.
9. Farber J. M., Peterkin P. I.: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 1991, 55, 476-511.
10. Franciosa G., Maugliani A., Floridi F., Aureli P.: Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. *Immunol. Med. Microbiol.* 2005, 43, 431-439.
11. Gahan C. G., Hill C.: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98, 1345-1353.
12. Gouin E., Mengaud J., Cossart P.: The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immun.* 1994, 62, 3550-3553.
13. Goulet V., Hedberg C., Le Monnier A., De Valk H.: Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 734-740.
14. Jacquet C., Gouin E., Jeannel D., Cossart P., Rocourt J.: Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 616-622.
15. Jagielski T., Osińska O., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes* II. Czynniki wirulencji uczestniczące w wewnątrzkomórkowym etapie patogenezy: listeriolizyna O (LLO), fosfolipaza B (PlcB), metaloproteaza (Mpl), fosfolipaza A (PlcA) i białko ActA. *Post. Mikrobiol.* 2006, 45, 303-315.
16. Kreft J., Vázquez-Boland J. A.: Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2001, 291, 145-157.
17. Liu D.: Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55, 645-659.
18. Liu D., Lawrence M. L., Ainsworth A. J., Austin F. W.: Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 118, 101-115.
19. Machesky L. M.: Cell motility: complex dynamics at the leading edge. *Curr. Biol.* 1997, 7, 164-197.
20. Osińska O. A., Jagielski T., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes*. I. Patogeneza listeryjna. Czynniki wirulencji: białka powierzchniowe uczestniczące w adhezji do komórek gospodarza. *Post. Mikrobiol.* 2006, 45, 209-220.
21. Ramaswamy V., Cresence V. M., Rejitha J. S., Lekshmi M. U., Dharsana K. S., Prasad S. P., Vijila H. M.: *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2007, 40, 4-13.
22. Scortti M., Monzó H. J., Lacharme-Lora L., Lewis D. B., Vázquez-Boland J. A.: The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* 2007, 9, 1196-1207.
23. Swaminathan B., Gerner-Smidt P.: The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 2007, 9, 1236-1243.
24. Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14, 584-640.
25. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 2009, 223, 1-320.
26. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* 2007, 130, 1-352.

Adres autora: prof. dr hab. Jacek Osek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: josek@piwet.pulawy.pl