

Weronika Maria Helbin, Klaudia Polakowska, Jacek Międzobrodzki*

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa, 30-387 Kraków

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wpływ bakteriofagów na wirulencję gatunku *Staphylococcus aureus*. 3. Gronkowcowe wyspy patogenności SaPIs (staphylococcal pathogenicity islands). 4. Wpływ antybiotyków na odpowiedź SOS i indukcję bakteriofagów. 5. Podsumowanie

Phage-related virulence factors of *Staphylococcus aureus*

Abstract: Mobile genetic elements play fundamental role in the emergence of new pathogens and in the adaptation of all bacteria species to the environment. It is believed that the horizontal gene transfer has a major impact on genome structure of *Staphylococcus aureus* which of both commensal and major pathogen of humans and warm-blooded animals. Bacteriophages via lysogenic conversion are source of the major staphylococcal virulence factors, contribute to strain diversity and enable rapid changes in host specificity. Bacteriophages have also close connection to other kind of mobile genetic elements, known as staphylococcal pathogenicity islands, SaPIs. SaPIs excision from chromosome and replication is possible only after infection of a particular phage and the islands are able to leave the host cell inside hijacked capsids. Horizontal transfer of SaPIs which occurs through a modified transduction may be responsible for spread of toxic-shock syndrome toxin TSST-1, and other superantigens among *S. aureus* strains, and possibly from *S. aureus* to other species. Recently it has been reported that β -lactam and fluorochinolone antibiotic in subinhibitory concentration promote SOS-mediated prophage induction, replication of SaPIs in its host cells and consequently the further spread of SaPIs, and lysogenic conversion genes in pathogenic bacteria. Further understanding of phage and phage-dependent mobile genetic elements can provide insight into staphylococcal virulence and help in the development of efficient treatment of *S. aureus* infections.

1. Introduction. 2. Effect of bacteriophages on the virulence of *Staphylococcus aureus*. 3. Staphylococcal pathogenicity islands SaPIs. 4. Antibiotic dependent SOS response and the induction of prophages. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakteriofagi, konwersja lizogeniczna, mobilne elementy genetyczne, SaPI, *Staphylococcus aureus*

Key words: bacteriophages, lysogenic conversion, mobile genetic elements, SaPI, *Staphylococcus aureus*

1. Wprowadzenie

Prowadzone od wielu lat badania nad strukturą i dynamiką zmienności genomów bakteryjnych dowodzą, iż są one strukturami wysoce plastycznymi oraz charakteryzującymi się szybszym tempem ewolucji, niż spotykamy w obrębie genomów organizmów eukariotycznych. Mechanizmami warunkującymi ogromną zmienność Prokariota są tak samo jak u Eukariota rearanżacje w obrębie DNA oraz pokoleniowe nagromadzenie mutacji punktowych. Przede wszystkim jednak główną siłą napędową ewolucji bakteryjnej jest horyzontalny transfer informacji genetycznej, HGT (*horizontal gene transfer*) pozwalający na nabycie wielu genów podczas jednego zdarzenia rekombinacyjnego.

Proces ten jest stosunkowo łatwo zauważalny gdy geny czynników wirulencji kodowane są w tzw. mobilnych elementach genetycznych MGE (*mobile genetic elements*) takich jak plazmidy, transpozony i bakteriofagi [16, 26]. Wyróżnia się trzy główne mechanizmy lateralnego transferu informacji genetycznej pomiędzy komórkami bakteryjnymi – transformację, koniugację oraz transdukcję bakteriofagową. W skrócie: transfor-

macja polega na pobraniu przez komórkę materiału genetycznego ze środowiska, integracji z własnym genomem i następnie jego ekspresji w tej komórce, zwanej odtąd biorcą lub transformantem. Niektóre gatunki bakterii wykazują stałą zdolność do transformacji, zwaną „kompetencją”, natomiast inne są w stanie pobrać wolny DNA tylko w określonych warunkach. Koniugacja jest bezpośrednim transferem DNA z komórki do komórki zachodzącym za pośrednictwem kanału zwanego mostkiem koniugacyjnym, pilusem, który tworzy połączenie między dawcą i biorcą. Geny kodujące aparat koniugacyjny znajdują się często na przekazywanej nici DNA, a w komórce przyjmuje ona najczęściej formę cykliczną zwaną plazmidem. Transdukcja odnosi się do transferu DNA do komórki za pośrednictwem cząstek wirusowych. Jest to złożone zjawisko występujące w bardzo wielu formach. Niektóre wirusy przenoszą zawsze te same sekwencje genomu gospodarza do kolejnych komórek, co określane jest transdukcją specyficzną. Natomiast inne wirusy, zwane w przypadku bakterii bakteriofagami mogą przenosić losowe fragmenty DNA pobrane z komórki, w której przebiegała ich replikacja i składanie [5, 7].

* Autor korespondencyjny: e-mail: jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Postuluje się, iż proces HGT ma szczególne znaczenie dla ewolucji i struktury genomu gatunku *Staphylococcus aureus*, którego specyficzne uwarunkowania genetyczne czynią go zarówno komensalem jak i potencjalnym patogenem człowieka [8, 37, 59]. Bakterie te, znane pod polską nazwą gronkowiec złocisty, są wszechobecne w biosferze. Jednakże ich rezerwuarem są ludzie i zwierzęta, gdyż gronkowce mogą namnażać się jedynie w wyższych organizmach. U ludzi zdrowych stanowią one główny składnik mikroflory prawidłowej skóry i błon śluzowych, ale mogą być również przyczyną zakażeń endogennych lub egzogennych u ludzi o obniżonej odporności immunologicznej. Gatunek *S. aureus* stanowi również obecnie jeden z głównych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych oraz jest bardzo ważnym pod względem ekonomicznym patogenem zwierząt hodowlanych. Liczne szczepy tego gatunku, wyposażone są bowiem w geny oporności na antybiotyki oraz wiele czynników wirulencji odpowiedzialnych za objawy kliniczne obserwowane podczas przebiegu infekcji. Największym atutem gronkowców jest zdolność adaptacji pozwalająca im przetrwać niesprzyjające warunki oraz kolonizować nowe środowiska [39]. Analizy genomów gronkowcowych wykazały, iż horyzontalny transfer genomów ma fundamentalne znaczenie dla różnicowania w obrębie gatunku *S. aureus*: nawet do 22% genomowego DNA stanowiły sekwencje zmienne składające się z mobilnych, lub niegdyś mobilnych, elementów genetycznych [33]. W wyniku infekcji bakteriofagowej, głównie pod postacią profagów uzyskanych zostało około 2% całości gronkowcowego DNA [29]. Obok bakteriofagów konwersji lizogennej niosących geny kodujące determinanty patogenności, również fagi transdukcji ogólnej, jak na przykład $\phi 11$, są prawdopodobnie odpowiedzialne za większość ogółu horyzontalnego transferu elementów genetycznych pomiędzy szczepami *S. aureus* [25]. Wysoki wpływ fagów na ewolucję gronkowców może mieć swoje źródło w niskiej naturalnej kompetencji tego gatunku do przyjmowania wolnego DNA ze środowiska [8, 19, 42]. Należy również podkreślić, iż znaczenie profagów nie ogranicza się tylko do skokowego transferu dużych bloków informacji genetycznej. Wykazano, iż profagi mogą uczestniczyć również w samym zjawisku patogenezy podczas trwania infekcji bakteryjnej [59].

2. Wpływ bakteriofagów na wirulencję gatunku *Staphylococcus aureus*

Wszystkie bakteriofagi, czyli wirusy specyficznie atakujące bakterie, podzielić można na trzy zróżnicowane grupy: lityczne, lizogeniczne i chroniczne. Dla każdej z nich wnikięcie bakteriofaga do komórki bakteryjnej może mieć różne następstwa. Podczas infekcji litycznej

dochodzi do replikacji cząstek faga aż do wyczerpania zasobów metabolicznych komórki a następnie jej lizy z uwolnieniem nowych bakteriofagów do środowiska. Fagi lityczne należą przede wszystkim do rodziny *Myoviridae* i wykorzystywane są w terapii fagowej ze względu na swoją wysoką specyficzność [29, 40]. Bakterie zainfekowane fagami chronicznymi zachowują zdolność do wzrostu i podziału pomimo replikacji wirusów i ich ciągłego uwalniania do środowiska.

Fagi lizogeniczne należą do rodziny *Siphoviridae* a ich wpływ na ewolucję bakterii nie polega jedynie na „wyciągu zbrojeń” jak to ma miejsce dla ich litycznych odpowiedników. Infekcja lizogeniczna również może skończyć się propagacją faga i lizą gospodarza, lecz przeważnie genom wirusa integruje do chromosomu bakteryjnego gdzie w postaci profaga ulega utajeniu [37]. Genomika bakteryjna wykazała, iż lizogenizacja jest bardziej zasadą niż wyjątkiem, a wiele gatunków bakterii zawiera w swoim genomie więcej niż jednego profaga [9]. Szczep *S. aureus* NCTC 8325 był jednym z pierwszych gronkowców, dla których została opracowana fizyczna mapa genomu. Zawiera on 3 sekwencje bakteriofagowe natomiast u innych przedstawicieli rodzaju *Staphylococcus* spotyka się dwie lub pojedyncze takie sekwencje. Porównanie genomu wyżej wspomnianego szczepu NCTC 8325 z genomem MSSA-476 wykazało, iż to bakteriofagi są główną przyczyną różnic. Natomiast w przypadku szczepów N315 i NW2 odmienność wprowadzały transpozony, sekwencje insercyjne i wyspy patogenności [2]. Obecność sekwencji bakteriofagowych nie jest jednak regułą w obrębie rodzaju *Staphylococcus*. Warto zaznaczyć, iż genom szczepu *S. epidermidis* ATCC 12228 nie zawiera ani jednego profaga [10].

Niektóre fagi lizogeniczne niosą dodatkowe geny zwane „moronami” lub LCG, genami konwersji lizogennej (*lysogenic conversion genes*), które po integracji z chromosomem gospodarza ulegają ekspresji zmieniając jego fenotyp [5]. Zjawisko to znane jest pod nazwą konwersji lizogennej/lizogenicznej. Ze zjawiskiem lizogenii została powiązana ponad 40 lat temu produkcja niektórych toksyn przez gatunek *S. aureus* gdy odkryto, że poprzez infekcję fagową można uzyskać szczep z ekspresją alfa-hemolizyny [3]. Od tego czasu opisano wiele bakteryjnych determinant patogenności kodowanych w genomie bakteriofagów. Te dodatkowe geny ulegają ekspresji po integracji z chromosomem zmieniając fenotyp gospodarza. Jest to zjawisko zwane pozytywną konwersją lizogeniczną. Geny typu LGC mogą znacząco wpływać na dostosowanie bakterii do środowiska oraz jak w przypadku patogenów, warunkować określone objawy kliniczne oraz specyficzność względem gospodarza [21, 31]. Poniżej zostaną przedstawione gronkowcowe czynniki wirulencji o najważniejszym znaczeniu klinicznym, których źródłem była transmisja bakteriofagowa.

Tabela I

Wybrane czynniki wirulencji *Staphylococcus aureus* zależne od bakteriofagów

Toksyna/determinanta patogenności (<i>gen</i>)	MGE	Opis/Mechanizm/Objawy chorobowe	Piśmien- nictwo
Białko odpowiedzialne za powstawanie biofilmu (<i>bap</i>)	SaPIbov	Powstawanie biofilmu we wnętrzu krowiego wymienia, zaangażowane w objawy <i>mastitis</i>	[19, 54, 57]
Białko wiążące czynnik von Willebranda (vWBps) wariant swoisty względem gospodarza (<i>vwb_{ps}</i>)	SaPIbov2, SaPIbov4, SaPIbov5, SaPIeq1, SaPIov2	Wariant genomowego białka vWBp, Koagulacja osocza bydłęcego lub końskiego	[20, 21, 61]
CHIPS, gronkowcowe białko inhibitorowe chemotaksji (<i>chip</i>)	φ13, φtp310-3, φ252B, φMu3A, φN315, φNM3, φSa3JH1, φSa3mw, φSa3 ms, φSa3JH9, φSa3USA300, φβC-USA300_TCH1516	Obniża aktywność receptorów C5AR1 i FPR1 neutrofilii w stosunku do składników dopełniacza C5a i formylowanych peptydów	[45, 49, 59, 62]
Eksfoliatyna A (<i>eta</i>)	ΦETA	Toksyna odpowiedzialna za objawy towarzyszące gronkowcowemu złuszcżającemu zapaleniu skóry	[6, 30]
Enterotoksyna A (<i>sea</i>)	ΦSa3ms, ΦSa3mw, Φ252B, ΦNM3, ΦMu50a	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna B (<i>seb</i>)	SaPI1, SaPI3	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna C (<i>sec</i>)	SaPIIn1, SaPIIm1, SaPIImw2, SaPIbov1	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna K (<i>selk</i>)	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPIbov1, SaPI5	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna L (<i>sell</i>)	SaPIIn1, SaPIIm1, SaPIImw2, SaPIbov1	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna P (<i>selp</i>)	ΦN315, ΦMu3A	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna Q (<i>selq</i>)	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI5	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
PVL, leukocydyna Pantona-Valentina, dwupodjednostkowa toksyna (<i>lukS</i> i <i>lukF</i>)	ΦSA2pvl, ΦSLT, ΦPVL, ΦSA2MW, ΦSA2usa	Powoduje liżę ssaczyc leukocytów, stymuluje nadmierną produkcję czynników prozapalnych prowadzącą do nekrozy tkanek	[15, 17, 27, 63]
SCIN, gronkowcowy inhibitor dopełniacza (<i>scn</i>)	φ13, φN315, φ252B, φNM3, φMu50A, φSa3JH1, φSa3 ms, φSa3mw, φSa3JH9, φMu3A, φtp310-3, φSa3USA300, φβC-USA300_TCH1516	Ingeruje w proces opsonizacji komórek bakteryjnych poprzez inhibicję konwertazy C3bBb dopełniacza	[47, 49, 59]
Stafylokinaza (<i>sak</i>)	ph13, ph42D, phφC, φN315, φMu50A	Zakłóca fagocytozę komórek bakteryjnych, fibrynolizyna której jest składnikiem ułatwia penetrację komórek gronkowca do tkanek i ich proteolityczny rozkład	[4, 5, 46]
Toksyna 1 zespołu szoku toksycznego, TSST-1 (<i>tstH</i>)	SaPI1, SaPI2, SaPIbov1, SaPI3	Główna toksyna odpowiedzialna za wystąpienie zespołu szoku toksycznego, stymuluje wydzielanie prozapalnych cytokin przez komórki epitelialne	[19, 50, 51]

- Białko inhibitorowe chemotaksji, czyli **CHIPS** (*chemotaxis inhibitory protein*) wiąże się do receptorów C5AR1 i FPR1 neutrofilii obniżając ich aktywność w stosunku do odpowiednio składników dopełniacza C5a oraz formylowanych peptydów [46, 50, 60, 63].
- Gronkowcowy inhibitor dopełniacza, **SCIN** (*staphylococcal complement inhibitor*) o działaniu przeciwfagocytarnym kodowany przez gen *scn*. Inhibitor SCIN zakłóca proces opsonizacji komórek bakteryjnych przez wiązanie oraz inhibicję konwertazy C3bBb dopełniacza [48, 50, 60].
- Leukocydyna Pantona-Valentina, **PVL** (*the Panton-Valentine leukocidin*) jest toksyną dwupodjednostkową będącą produktem genów *lukS* i *lukF* kodowanych na bakteriofagu PVL. Białka LukS i LukF tworzą razem kanały w poprzek błony ssaczyc leukocytów powodując ich liżę. Podczas infekcji ekspresja PVL stymuluje neutrofile do podniesionej produkcji czynników prozapalnych [35]. Tak wywołana ostra odpowiedź zapalna prowadzi ostatecznie do nekrozy tkanek. Toksyna PVL uważana jest za jeden z najgroźniejszych gronkowcowych czynników wirulencji ponieważ

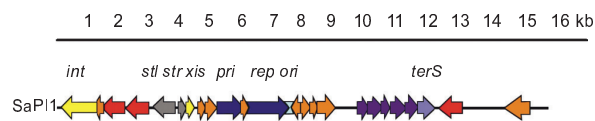
wiąże się z podniesionym ryzykiem transmisji, komplikacji leczenia i hospitalizacji [15, 17, 27, 64].

- **Stafylokinaza** będąca produktem genu *sak* jest odpowiedzialna za usuwanie na drodze cięcia proteolitycznego przeciwciał IgG oraz C3b dopełniacza z powierzchni komórki bakteryjnej kolidując z procesem fagocytozy [47]. Powstanie kompleksu stafylokinazy z plazminogenem prowadzi do powstania aktywnej fibrylizyny, enzymu proteolitycznego o szerokim spektrum działania, ułatwiającego penetrację komórek gronkowca do sąsiednich tkanek oraz ich destrukcję podczas infekcji [4].
- **Eksfoliatyna A** (*exfoliative toxin A*) jest wydzielaną zewnątrzkomórkowo toksyną odpowiedzialną za występowanie objawów towarzyszących gronkowcowemu złuszcżającemu zapaleniu skóry, w skrócie SSSS (*staphylococcal scalded skin syndrome*) [6, 30].
- **Enterotoksyny P** (*sep*), **A** (*sea*), **K** (*sek*), **K2** (*sek2*) i **G** (*seg*) to toksyny, posiadające właściwości superantygenu, zaangażowane w występowanie objawów gronkowcowego zatrucia pokarmowego [1].

Lizogenizacja może powodować utratę ekspresji funkcjonalnych białek jeśli bakteriofag integruje w obrębie sekwencji kodujących na chromosomie, co nazywane jest negatywną konwersją lizogeniczną. Przykładem może być występowanie fenotypów z brakiem produkcji lipazy lub β -toksyny po integracji odpowiednio profagów L54a i ϕ 13, do chromosomu *S. aureus* [12]. Profag transdukujący gen kodujący CHIPS, czyli *chp*, zawiera również w swoim genomie geny dla stafylokinazy (*sak*), enterotoksyny A (*entA*) oraz eliminuje ekspresję β -hemolizyny (*Hlb*) poprzez inaktywację insercyjną genu [63]. Zjawisko równoczesnej konwersji lizogenicznej pozytywnej i negatywnej opisano również dla fenotypu *sak+*, *entA+* przy braku p-lizyny [13]. Podsumowując, większość czynników wirulencji rozprzestrzenia się w obrębie rodzaju *Staphylococcus* na drodze specyficznej transdukcji bakteriofagowej. Dopiero niedawno odkryto bezpośredni związek między transdukcją ogólną a specyficznym rozprzestrzenianiem się chromosomowych determinant patogenności [53, 59].

3. Gronkowcowe wyspy patogenności SaPIs (*staphylococcal pathogenicity islands*)

Gronkowcowe wyspy patogenności, SaPIs, stanowią dużą i stosunkowo spójną rodzinę elementów genetycznych o wielkości od 15-kpz do 27-kpz, których przedstawiciele odkryto pierwotnie w gatunku *S. aureus*. Jednakże znajdują się również w genomach innych Gram-dodatnich bakterii z rodzajów *Staphylococcus* oraz *Lactococcus* [43, 49]. Wyspy patogenności, PI (*pathogenicity island*) są często oskrzydłone przez sekwencje repetytywne takie jak elementy insercyjne (IS). Mogą



Rys. 1. Schemat organizacji genetycznej gronkowcowej wyspy SaPI1.

Poszczególnym genom nadano kolory i orientację zgodnie z ich funkcją. Geny odpowiedzialne za wycięcie i integrację *int* i *xis* (żółte), regulatory transkrypcji (szare), geny odpowiedzialne za replikację (granatowe), początek startu replikacji (turkusowy), geny wpływające za enkapsydację (ciemnofioletowe), mała podjednostka terminazy *terS* (jasnofioletowy), superantygenu oraz inne geny konwersji lizogenicznej (czerwone), geny o nieznannej funkcji (pomarańczowe).

także zawierać geny o sekwencji podobnej do genu *int*, kodującego fagową integrację.

Właśnie z powodu sąsiedztwa sekwencji powtórzonych oraz obecności homologów integrazy przypuszczano, iż wyspy patogenności można zaliczyć do MGE. Jednakże do tej pory cechę mobilności udało się w pełni przypisać jedynie kilku ze znanych wysp gronkowcowych, których horyzontalny transfer zachodzi na drodze transdukcji bakteriofagowej. Najdokładniej opisaną ruchomą gronkowcową wyspą patogenności spośród siedemnastu odkrytych, jest jak do tej pory SaPI1 [43]. W obrębie sekwencji wysp SaPI opisano również geny kodujące czynniki wirulencji, oto ich krótkie charakterystyki:

- **Toksyna zespołu szoku toksycznego 1**, TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin-1*) jest najczęstszą przyczyną etiologiczną zespołu szoku toksycznego. To potencjalnie śmiertelne ostre zatrucie charakteryzuje się wysoką temperaturą, zaburzeniem czynności wielu narządów wewnętrznych, spadkiem ciśnienia tętniczego krwi oraz złuszczeniem naskórka w fazie rekonwalescencji. Białko TSST-1 podobnie jak inne wydzielane zewnątrzkomórkowo gronkowcowe superantygenu stymuluje wydzielanie prozapalnych cytokin przez komórki epitelialne [19, 51, 54].
- **Enterotoksyna B** (*seb*), **enterotoksyna C** (*sec*), **enterotoksyna Q** (*seq*) oraz **enterotoksyna K** (*sek*) zaangażowane w wystąpienie objawów gronkowcowego zatrucia pokarmowego [1].
- **Białko odpowiedzialne za powstawanie biofilmu** (*bap*) we wnętrzu krowiego wymienia rozprzestrzenianie na gronkowcowych wyspach SaPIbov zidentyfikowanych w szczepach bydłowych [19, 55, 58].
- **Swoiste względem gospodarza białko wiążące czynnik von Willebranda**, vWBp (*von Willebrand binding protein*). W nowo opisanej gronkowcowej wyspie patogenności SaPIbov2 oraz trzech innych SaPIs, wyizolowanych z bydłowych i końskich szczepów klonalnego kompleksu CC133, zidentyfikowano sekwencję białek vWBps będących wariantem genomowego genu białka vWBp. Obecność wyspy SaPI kodującej wariant vWBp pozwala komórkom gronkowcowym na koagulację osocza bydłowego lub końskiego zgodnie

z rodzajem gospodarza, z którego dany szczep został wyizolowany [20, 21, 62].

Mechanizm wycięcia kasety SaPIs z chromosomu, przebiegający na drodze specyficznej rekombinacji pomiędzy towarzyszącymi im sekwencjami repetytywnymi jest analogiczny z procesem uwolnienia profaga z genomu jego lizogenu. Do takiego wycięcia może dojść w trzech sytuacjach: po indukcji profaga „pomocniczego” za pośrednictwem systemu SOS, po wnikięciu do komórki bakteriofaga „pomocniczego” nie będącego lizogenem danego szczepu zawierającego SaPI na chromosomie oraz po wnikięciu do komórki bakteryjnej cząstek SaPI i jej faga „pomocniczego” [43]. Ustalono również, iż SaPI mogą zostać uwolnione z chromosomu, lecz nie replikowane, w obecności niektórych fagów gronkowcowych, a dla innych podobne procesy nie mają w ogóle miejsca [49]. Wycięty fragment bakteryjnego genomu jest następnie replikowany z wykorzystaniem aparatu molekularnego faga z bardzo wysoką wydajnością. Powstaje dużo więcej kopii SaPI niż genomu wirusa. W przypadku infekcji fagiem 80α nosiciela wyspy SaPI1, zaobserwowano powstawanie dwóch typów cząstek transdukcyjnych, o średnicy główek 48 μm, będących w stanie generować lysinki oraz cząstek o główkach średnicy 35 μm, które własności takiej nie posiadają. Dowiedziono, iż oba te rodzaje zbudowane są z takich samych kapsomerów, kodowanych przez genom fagowy [53, 54, 55]. Przypuszcza się, iż to geny znajdujące się w obrębie gronkowcowej wyspy patogenności są w stanie kierować na swoją korzyść przebiegiem replikacji DNA oraz dopasowywać rozmiar kapsydów do długości przenoszonego materiału genetycznego, co zapewnia to genomowi wyspy znaczną przewagę w ekspansji [54]. Ponadto wysoki odsetek nowo zreplikowanych cząstek SaPI1 nie zostaje nigdy spakowany do kapsydów i po lizie komórki zostaje uwolniony do środowiska, skąd jako wolny DNA teoretycznie może zostać pobrany przez komórki bakteryjne na drodze transformacji. Wydaje się jednak, iż cząsteczki SaPI, które po amplifikacji znajdują się w multimerycznej formie zwanej linearnym konkatamerem, mogą uzyskać funkcjonalność dopiero po monomeryzacji i spakowaniu do kapsomerów przez fagowy moduł pakujący [56].

Po przedostaniu się do wnętrza komórki gronkowcowej, wyspa zostaje wbudowana w swoistym dla siebie miejscu att_c w chromosomie z udziałem kodowanego przez siebie homologa integrazy [49]. Horyzontalny transfer wyspy SaPI1 zachodzący z wysoką wydajnością na drodze zmodyfikowanej transdukcji oraz transformacji może być przyczyną postępującego rozprzestrzenienia genów toksyn szoku toksycznego, np. TSST-1 i superantygenów w obrębie gatunku *S. aureus* [52]. Ponadto SaPIbov1 może ulec transdukcji do gatunków innych gronkowców, a mianowicie do *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. xylosus* i *S. epidermidis* [45]. Zaobser-

wowano również transfer wysp SaPI1 i SaPIbov1 towarzyszący indukcji profagów z komórek bakterii *S. aureus* do gatunku *Listeria monocytogenes*, który zachodził spontanicznie w surowym krowim mleku [11]. Ten międzyrodzajowy transfer MGE niosących geny determinant patogenności jest zjawiskiem bardzo niepokojącym zarówno z punktu widzenia medycyny człowieka jak i medycyny weterynaryjnej. Jednakże podczas terapii infekcji bakteryjnych można także w inny sposób przyczynić się do rozprzestrzeniania się bakteriofagowych i bakteryjnych genów.

4. Wpływ antybiotyków na odpowiedź SOS i indukcję bakteriofagów

Wspomniano powyżej, iż gronkowcowe wyspy patogenności SaPI mogą ulec wycięciu z chromosomu po indukcji profagów przez system SOS. Jest to globalna odpowiedź komórki bakteryjnej na uszkodzenia DNA, prowadząca do podniesienia poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za procesy naprawcze oraz promujące przetrwanie komórki bakteryjnej w niesprzyjających warunkach [14]. Odpowiedź SOS odbywa się za sprawą dwóch białek LexA i RecA. Białko LexA jest represorem ekspresji genów regulujących odpowiedź SOS, wiążąc się z ich rejonami promotorowymi. Obecność uszkodzeń DNA jest czynnikiem aktywującym białko RecA, które stymuluje autokatalityczne trawienie proteolityczne w rejonie Ala-Gly białka LexA. Proces ten uniemożliwia dalsze wiązanie represora LexA z DNA i tym samym geny SOS mogą ulec transkrypcji i translacji. Gdy uszkodzenia materiału genetycznego ulegną naprawie, zostają zsyntetyzowane nowe cząsteczki białek LexA i RecA, które zatrzymują odpowiedź SOS [36]. Wykazano, iż w komórkach *E. coli* odpowiedź SOS indukowana jest zarówno przez antybiotyki zaburzające syntezę ściany komórkowej (β-laktamy) jak i przebieg replikacji DNA (fluorochinolony). Bakteriobójcze działanie antybiotyki z grupy β-laktamów wynika głównie z ich oddziaływania na transmembranowe białka wiążące penicylinę PBPs (*penicillin binding proteins* 3), które prowadzi do zatrzymania syntezy ściany komórkowej i utratę jej ciągłości [41]. Ponadto inaktywując produkt genu *ftsI*, którym jest białko nr 3 wiążące penicylinę, PBP3 aktywują odpowiedź SOS poprzez zwiększenie ekspresji dwu podjednostkowego systemu transkrypcyjnego DpiBA. Białko DpiA, będące efektem, odpowiada za prawidłowy przebieg transkrypcji oraz replikacji DNA, lecz jego nad-produkcja w komórce prowadzi do generowania mutacji, zaprzestania replikacji materiału genetycznego i tym samym do indukcji systemu SOS [41]. Antybiotyki florochinolone po przedostaniu się do wnętrza komórki bakteryjnej hamują dwa kluczowe dla replikacji DNA enzymy: gyrazę oraz topoiizomerazę IV

odpowiedzialne za odpowiednio tworzenie/usuwanie superskrętów helisy oraz rozdział matczynej i potomnej nici DNA po replikacji [24]. Następujące w efekcie uszkodzenia materiału genetycznego i zatrzymanie podziału komórki prowadzą bezpośrednio do uruchomienia systemu SOS, a ostatecznie jeśli systemy naprawcze zawiodą do śmierci komórki.

Zastosowanie antybiotyków z grupy β -laktamów oraz fluorochinolonów indukując odpowiedź SOS promuje jednocześnie wyjście profagów ze stanu utajenia. Dochodzi do replikacji genomu wirusowego oraz tym samym amplifikacji kodowanych na nim genów, w tym genów konwersji lizogenicznej [34, 44]. Zastosowanie antybiotyków z grupy fluorochinolonów w terapii syndromu hemolityczno-mocznicowego, spowodowanego produkcją toksyny Shiga przez szczep *E. coli* H57:0157 [22], poważnie pogarsza objawy i może doprowadzić do śmierci pacjenta [34, 44, 61]. Podobne zjawisko zaobserwowano dla gronkowcowych szczepów niosących na chromosomie wyspy SaPII, SaPIbov1 oraz SaPIbov3, które poddane były wpływowi ampicyliny, penicyliny (β -laktamy), cyprofloksacyny (fluorochinolon) lub mitomycyny C w stężeniach podprogowych (*subinhibitory concentration*) [23, 57]. Jak do tej pory brak doniesień by kuracja antybiotykowa pogarszała stan pacjentów z syndromem szoku toksycznego lub innymi objawami powodowanymi przez geny kodowane na SaPIs, lecz nie można wykluczyć takiej możliwości.

5. Podsumowanie

Podsumowując, bakteriofagi bezpośrednio drogą konwersji lizogennej oraz pośrednio uczestnicząc w rozprzestrzenianiu wysp patogenności przyczyniają się do powstawania zmienności oraz powstawania wysoce wirulentnych szczepów gronkowca złocistego. Niedawne doniesienie o pojawieniu się szczepu z ekspresją zarówno toksyn TSST-1 oraz leukocydyny Pantona-Valentina potwierdza wyżej postawioną tezę [32]. Oprócz czynników patogenności bakteriofagi i inne MGE silnie wpływają na dostosowanie gatunku *S. aureus* do gospodarza zarówno ludzkiego jak do zwierząt domowych i gospodarskich poprzez dostarczenie nowych informacji genetycznych lub ułatwienie utraty DNA zbędnego w nowej niszy ekologicznej [18, 38]. Śledzenie dynamiki koewolucji gronkowców oraz infekujących je wirusów na pewno pozostanie jeszcze długo jednym z największych zadań współczesnej mikrobiologii i epidemiologii.

Podziękowanie

Publikacja została przygotowana podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, NCN nr N N401 017740.

Piśmiennictwo

- Argudín M.A., Mendoza M.C., Rodicio M.R.: Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, **2**, 1751–1773 (2010)
- Baba T., K. Hiramatsu i wsp.: Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **359**, 1819–1827 (2002)
- Blair J. E., Carr M.: Lysogeny in staphylococci. *J. Bacteriol.* **82**, 984–993 (1961)
- Bokarewa M.I., Jin T., Tarkowski A.: *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 504–509 (2006)
- Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D.: Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 560–602 (2004)
- Bukowski M., Władyka B., Dubin G.: Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, **2**, 1148–1165 (2010)
- Bushman F., Lateral DNA Transfer. Cold Spring Harbor. New York: CSH Laboratory Press, 2002
- Canchaya C., Fournous G., Brüssow H.: The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol. Microbiol.* **53**, 9–18 (2004)
- Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.L., Brüssow H.: Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 417–424 (2003)
- Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brüssow H.: Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 238–276 (2003)
- Chen J., Novick R.P.: Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science*, **323**, 139–141 (2009)
- Coleman D., Knights J., Russell R., Shanley D., Birkbeck T.H., Dougan G., Charles I.: Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* β -toxin by bacteriophage phi 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the phi 13 genome. *Mol. Microbiol.* **5**, 933–939 (1991)
- Coleman D.C., Sullivan D.J., Russell R.J., Arbuthnot J.P., Carey B.F., Pomeroy H.M.: *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1679–1697 (1989)
- Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P.O., Hanawalt P.C.: Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, **158**, 41–64 (2001)
- Diep B.A., Otto M.: The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* **16**, 361–369 (2008)
- Feng Y., Chen C.J., Su L.H., Hu S., Yu J., Chiu C.H.: Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 23–37 (2008)
- Finck-Barbançon V., Duportail G., Meunier O., Colin D.A.: Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1182**, 275–282 (1993)
- Fitzgerald J.R.: Human origin for livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio.* **3**, e00082–12 (2012)
- Fitzgerald J.R., Monday S.R., Foster T.J., Bohach G.A., Hartigan P.J., Meaney W.J., Smyth C.J.: Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* **183**, 63–70 (2001)

20. Guinane C.M., J.R. Fitzgerald i wsp.: Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* **2**, 454–466 (2010)
21. Guinane C.M., Penadés J.R., Fitzgerald J.R.: The role of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Virulence*, **2**, 241–243 (2011)
22. Gyles C.L.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* **85** (13 Suppl), E45–62 (2007)
23. Hastings P.J., Rosenberg S.M., Slack A.: Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* **12**, 401–404 (2004)
24. Hooper, D. C.: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* **7**, 337–341 (2001)
25. Iandolo J.J., V. Worrell i wsp.: Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene* **289**, 109–118 (2002)
26. Jagustyn-Kryniecka E. K., Molekularne podstawy bakteryjnej patogeny (w) *Biologia molekularna bakterii*, (red.) Baj J., Markiewicz Z., PWN, Warszawa 2005.
27. Kaneko J., Kimura T., Narita S., Tomita T., Kamio Y.: Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*, **215**, 57–67 (1998)
28. Kropinski A.M.: Phage Therapy – Everything Old is New Again. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **17**, 297–306 (2006)
29. Kuroda M., T. Ohta.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225–1240 (2001)
30. Ladhani S., Joannou C.L., Lochrie D.P., Evans R.W., Poston S.M.: Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 224–242 (1999)
31. Le Maréchal C., le Loir Y. i wsp.: Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One*, **6**, e27354 (2011)
32. Li Z., Stevens D.L., Hamilton S.M., Parimon T., Ma Y., Kearns A.M., Ellis R.W., Bryant A.E.: Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. *PLoS One*, **6**, e2724 (2011)
33. Lindsay J., Holden M.T.G.: *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends microbiol* **12**, 378–385 (2004)
34. Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn G.: Bacteriophages carrying Shiga toxin genes: genomic variations, detection and potential treatment of pathogenic bacteria. *Future Microbiol.* **6**, 909–924 (2011)
35. Ma X., Chang W., Zhang C., Zhou X., Yu F.: Staphylococcal panton-valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. *PLoS One*, **7**, e34970 (2012)
36. Maiques E., Ubeda C., Campoy S., Salvador N., Lasa I., Novick R.P., Barbé J., Penadés J.R.: β -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 2726–2729 (2006)
37. Małachowa N., DeLeo F.R.: Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3057–3071 (2010)
38. McCarthy A.J., Witney A.A., Gould K.A., Moodley A., Guardabassi L., Voss A., Denis O., Broens E.M., Hinds J., Lindsay J.A.: The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country. *Genome Biol. Evol.* **3**, 1164–1174 (2011)
39. Międzybrodzki J., Małachowa N., Markiewski T., Białecka A., Kasprówcz A.: Różnicowanie izolatów *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **62**, 322–327 (2008)
40. Międzybrodzki R., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **61**, 461–465 (2007)
41. Miller C.L., L.E. Thomsen i wsp.: SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science (New York, N.Y.)* **305**, 1629–1631 (2004)
42. Morikawa K., Inose Y., Okamura H., Maruyama A., Hayashi H., Takeyasu K., Ohta T.A.: New staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Gen. Cell.* **8**, 699–712 (2003)
43. Novick R.P., Christie G.E., Penadés J.R.: The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 541–551 (2008)
44. Panos G.Z., Betsi G.L., Falagas M.E.: Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**, 731–742 (2006)
45. Poliakov A., Chang J.R., Spilman M.S., Damle P.K., Christie G.E., Mobley J.A., Dokland T.: Capsid size determination by *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 involves specific incorporation of SaPI1 proteins into procapsids. *J. Mol. Biol.* **380**, 465–475 (2008)
46. Postma B., M.J. Poppelier.: Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* **172**, 6994–7001 (2004)
47. Rooijackers S. H., van Kessel K. P., van Strijp J.A.: Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol.* **13**, 596–601 (2005)
48. Rooijackers S.H., Ruyken, M. et al.: Immune evasion by astaphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Natl. Immunol.* **6**, 920–927 (2005)
49. Ruzin A., Lindsay J., Novick R.P.: Molecular genetics of SaPI1 – a mobile pathogenicity island of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 365–377 (2001)
50. Serruto D., Rappuoli R., Scarselli M., Gros P., van Strijp J.A.G.: Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Natl. Rev. Microbiol.* **8**, 393–399 (2010)
51. Schaefer M.M., L.M. Breshears i wsp.: Epithelial Proinflammatory Response and Curcumin-Mediated Protection from Staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin-1. *PLoS One*, **7**, e32813 (2012)
52. Subedi A., Ubeda C., Adhikari R.P., Penadés J.R., Novick R.P.: Sequence analysis reveals genetic exchanges and intraspecific spread of SaPI2, a pathogenicity island involved in menstrual toxic shock. *Microbiology*, **153**, 3235–3245 (2007)
53. Tallent S.M., Langston T.B., Moran R.G., Christie G.E.: Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 7520–7524 (2007)
54. Tormo M.A., Ferrer M.D., Maiques E., Ubeda C., Selva L., Lasa I., Calvete J.J., Novick R.P., Penadés J.R.: *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J. Bacteriol.* **190**, 2434–2440 (2008)
55. Tormo-Más M.A., Mir I., Shrestha A., Tallent S.M., Campoy S., Lasa I., Barbé J., Novick R.P., Christie G.E., Penadés J.R.: Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature*, **465**, 779–782 (2010)
56. Ubeda C., Barry P., Penadés J.R., Novick R.P.: A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14182–14188 (2007)
57. Ubeda C., Maiques E., Knecht E., Lasa I., Novick R.P., Penadés J.R.: Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol. Microbiol.* **56**, 836–844 (2005)

58. Úbeda C., M.A. Tormo i wsp.: Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol.* **49**, 193–210 (2003)
59. Wagner P.L., Waldor M.K.: Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immunol.* **70**, 3985–3993 (2002)
60. Wamel W. J.B.V., Rooijackers S.H.M., Ruyken M., Kessel K.P.M., van Strijp J.A.G.: The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *J Immunol.* **188**, 1310–1315 (2006)
61. Wong C.S., Jelacic S., Habeeb R.L., Watkins S.L., Tarr P.I.: The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1930–1936 (2000)
62. Viana D., J.R. Penadés i wsp.: Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol. Microbiol.* **77**, 1583–1594 (2010)
63. Veldkamp K. E., Heezius H.C., Verhoef J., van Strijp J.A., van Kessel K.P.: Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect. Immunol.* **68**, 5908–5913 (2000)
64. Voyich J.M., M. Otto i wsp.: Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis.* **194**, 1761–1770 (2006)