

## QUORUM SENSING – KOMUNIKOWANIE SIĘ KOMÓREK W POPULACJACH BAKTERII PRZY UDZIALE CHEMICZNYCH CZĄSTECZEK SYGNAŁOWYCH

QUORUM SENSING – BACTERIAL CELL - TO - CELL  
COMMUNICATION USING CHEMICAL SIGNAL MOLECULES

Adam JAWORSKI, Liliana SERWECIŃSKA, Paweł STĄCZEK

Zakład Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego

*Streszczenie:* Ogromna zmienność genetyczna i fizjologiczna pozwala bakteriom zasiedlać różnorodne nisze ekologiczne oraz umożliwia szybką adaptację do zmiennych warunków środowiska. Jednym z ważnych mechanizmów umożliwiającym komórkom bakterii regulację ważnych funkcji życiowych i aktywności fizjologicznych w sposób globalny i wysoce zsynchronizowany jest bakteryjny system *quorum sensing* (QS). Niezwykle ważne wyniki uzyskane w ostatnich latach w badaniach tego systemu, definiowanego jako sposób wewnątrz- i międzygatunkowego komunikowania się komórek bakterii przy udziale chemicznych sygnałów wskazują, że większość gatunków bakterii, o ile nie wszystkie, wykształciło do tych celów wyspecjalizowane szlaki syntezy dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych oraz białka receptorowe jako specyficzne sensory tych sygnałów chemicznych, a także systemy ich transmisji na białka efektorowe i docelowe geny. Globalna regulacja przy udziale systemu QS obejmuje wiele podstawowych procesów życiowych i aktywności bakterii, takich jak: symbioza, wirulencja, kompetencja, koniugacja, produkcja antybiotyków, sporulacja, tworzenie biofilmów, wzrost rozpełzliwy. Funkcję chemicznych cząsteczek sygnałowych, specyficznych autoinduktorów (AI) u bakterii Gram-ujemnych pełnią acylowane laktony homoseryny, zaś u bakterii Gram-dodatnich oligopeptydy. Przyjmuje się, że system QS u współcześnie żyjących bakterii jest pewnym odzwierciedleniem wczesnego etapu w ewolucji organizmów wielokomórkowych.

*Słowa kluczowe:* *quorum sensing*, cząsteczki sygnałowe, ekspresja genów.

*Summary:* Due to the great genetic and physiological variability bacteria are able to colonize different ecological niches and rapidly adapt to the changing environmental conditions. Bacterial *quorum sensing* system (QS) represents one of the important mechanisms allowing bacterial cells to regulate physiological activities on the global, highly synchronized level. This system is defined as a method of intra- and interspecies communication of bacterial cells. Significant advances in the analyses of quorum sensing components show that most if not all bacterial species have developed specialized pathways for synthesis of diffusible signal molecules and receptor proteins serving as

specific receptors for such signals, as well as systems for transmission of the signals onto effector proteins and, ultimately, target genes. Global regulation using QS system regulates many basic activities of bacteria such: symbiosis, virulence, competence, conjugation, antibiotics production, sporulation, biofilms formation, swarming. In Gram-negative bacteria, acyl homoserine lactones act as signal molecules, whereas in Gram-positive bacteria this role is played by oligopeptides. There are hypotheses that QS system in presently living bacteria represents early stages of multicellular organisms evolution.

*Key words:* quorum sensing, signal molecules, gene expression.

## 1. WPROWADZENIE

Wyniki opisywane w rosnącej liczbie prac doświadczalnych oraz w innych artykułach i opracowaniach publikowanych w ostatnich latach dowodzą, że bakterie w drodze ewolucyjnego rozwoju wykształciły wyspecjalizowane systemy sygnałów chemicznych oraz molekularne mechanizmy komunikowania się komórek i koordynowania ważnych procesów życiowych w populacjach żyjących w różnych niszach środowiskowych. Angielski termin *quorum sensing* (QS) opisuje się w literaturze przedmiotu najogólniej jako mechanizm regulacji ekspresji genów w populacjach bakterii, w odpowiedzi na zmiany liczby komórek (gęstości populacji) żyjących w określonej niszy. Molekularny mechanizm tej regulacji obejmuje wytwarzanie przez komórki bakterii cząsteczek sygnałowych i ich akumulację w środowisku wzrostu, rozpoznawanie tych sygnałów przez wyspecjalizowane białka receptorowe będące bakteryjnymi sensorami, a w końcowym efekcie globalną, skoordynowaną odpowiedź komórek populacji w postaci zmiany ekspresji różnorodnych genów kontrolujących ważne szlaki metaboliczne i procesy życiowe. Komórki wielu gatunków bakterii zarówno Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich mają zdolność syntezy dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych, zwanych autoinduktorami (AI), których stężenie w środowisku wzrostu rośnie w miarę rozwoju hodowli i wzrostu gęstości komórek w danej populacji. Bakterie rozpoznając precyzyjnie zarówno naturę chemicznych sygnałów, jak i ich progowe stężenia w środowisku wzrostu są w stanie monitorować liczbę komórek w danej niszy oraz kontrolować aktywność fizjologiczną całej populacji. Dowiedziono, że ten wyspecjalizowany sposób komunikowania się komórek bakterii w populacjach, w celu koordynacji określonych szlaków metabolicznych, odgrywa bardzo istotną rolę w tak ważnych procesach życiowych, jak: bioluminescencja, wirulencja, kompetencja, koniugacja, sporulacja, synteza antybiotyków, ruchliwość, tworzenie biofilmu, wzrost rozpełzliwy.

Okazało się, że bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie wykształciły zarówno odmienne systemy autoinduktorów, jak i odmienne mechanizmy regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na takie sygnały. Funkcję cząsteczek sygnałowych u bakterii Gram-ujemnych spełniają acylowane laktony homoseryny (ang. *acyl-HSL*, *acyl-homoserine lactones*), zaś bakterie Gram-dodatnie porozumiewają się zwykle za pomocą sygnałów oligopeptydowych. Co więcej, te specyficzne autoinduktory wykorzystywane są do komunikowania się komórek w populacjach określonych szczepów czy gatunków, a zupełnie inna cząsteczka sygnałowa (AI-2) jest wykorzystywana do komunikowania

się komórek w mieszanych, międzygatunkowych populacjach bakterii. Podnosi się, że ten sposób globalnej, skoordynowanej regulacji ważnych procesów życiowych w całej populacji komórek pozwolił bakteriom osiągnąć niektóre właściwości organizmów wielokomórkowych, stąd autoinduktory określa się niekiedy jako *hormone like molecules*. Nie brak w literaturze przedmiotu także głosów, że bakteryjny system QS można traktować jako odzwierciedlenie wczesnych etapów filogenezy organizmów wielokomórkowych.

Nie ulega dzisiaj wątpliwości, że komórki bakterii potrafią w populacjach synchronizować ważne procesy i aktywności, wykorzystując do tego celu zarówno system uniwersalnych autoinduktorów do komunikacji międzygatunkowej, jak również wysoce specyficznych do komunikacji wewnątrzgatunkowej. Z drugiej strony, szereg organizmów prokariotycznych i eukariotycznych wykształciło mechanizmy hamowania bakteryjnego systemu QS. Jednym ze sposobów przeciwdziałania tak zmobilizowanym populacjom bakterii jest synteza i sekrecja enzymów degradujących bakteryjne autoinduktory, drugim zaś synteza antagonistycznych związków chemicznych. Na podstawie gromadzonej wiedzy o bakteryjnych autoinduktorach i właściwościach enzymów zdolnych do ich degradacji oraz o naturze chemicznej związków antagonistycznych, podjęto bardzo intensywne i obiecujące badania, których celem jest opracowanie zupełnie nowej, antybakteryjnej terapii, która polegałaby na skutecznym hamowaniu bakteryjnego systemu QS.

## 2. RYS HISTORYCZNY BADAŃ BAKTERYJNEGO SYSTEMU *QUORUM SENSING*

Pierwsze doniesienia o możliwości komunikowania się komórek bakterii w populacjach pojawiły się w literaturze światowej 25 lat temu, kiedy to Nealson i Hastings opisali po raz pierwszy wyniki na ten temat uzyskane w badaniach morskich bakterii *Vibrio fischeri* zdolnych do luminescencji [26]. Okazało się, że komórki tych bakterii mają zdolność emitowania światła wówczas, gdy jako symbionty rozwijają się w wyspecjalizowanych organach zwierząt morskich – kałamarnicy *Euprymna scolopes* i ryby *Monocentris japonicus*. Tracą natomiast zdolność luminescencji jako komórki wolnożyjące w wodzie morskiej. Zauważono, że u podstaw tego zjawiska leżą dwa zasadnicze uwarunkowania. Po pierwsze, dostępność bogatych źródeł węgla i energii w wyspecjalizowanych tkankach gospodarza umożliwia bakteriom szybki wzrost i rozwój w ściśle określonej niszy, gdzie populacja komórek może osiągnąć dużą gęstość. Po drugie, syntetyzowane przez komórki i wydzielane do środowiska wzrostu cząsteczki sygnałowe mogą osiągnąć wysokie stężenie jedynie w skolonizowanym organie zwierzęcia. Ograniczona dostępność składników pokarmowych w wodzie morskiej uniemożliwia bowiem zarówno szybki wzrost i rozwój populacji wolnożyjących bakterii, jak również akumulację dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych. Nieco później dowiedziono, że zdolność do luminescencji *Vibrio fischeri* jest związana z aktywnością

kompleksu enzymatycznego lucyferazy, syntetyzowanego w komórkach pod kontrolą operonu *luxCDABE*. Emisja światła ma miejsce wówczas, gdy populacja bakterii w skolo-nizowanym organie gospodarza osiągnie odpowiednio dużą gęstość, a tym samym stężenie akumulowanych cząsteczek sygnałowych osiągnie wartość progową, zapewniającą indukcję syntezy kompleksu lucyferazy [17]. Dowiedziono, że za regulację procesu bioluminescencji u symbiotycznych bakterii *V. fischeri* odpowiedzialne są dwa białka regulatorowe LuxI oraz LuxR, z których pierwsze kontroluje syntezę autoinduktora, drugie zaś odpowiedzialne jest za przyłączenie autoinduktora do operonu lucyferazy i indukcję transkrypcji strukturalnego genu lucyferazy. W miarę wzrostu liczby komórek bakterii w tkankach gospodarza i rozwoju populacji rośnie również stężenie syntetyzowanego dyfuzyjnego autoinduktora. Gdy stężenie to osiągnie wartość 1–10 mikrogramów na 1 ml, autoinduktor tworzy kompleks z białkiem LuxR, które w tej postaci przyłącza się do promotora genu lucyferazy, inicjując proces transkrypcji i syntezy białka lucyferazy w komórkach całej populacji. Zatem w omawianym układzie symbiotycznym emisja światła jest w istocie bardzo precyzyjnie regulowana gęstością komórek bakterii w populacji, rozwijającej się w ściśle określonej niszy.

Pomimo tych odkryć dość powszechnie sądzono, że komunikowanie się komórek i organizmów przy udziale syntetyzowanych i wydzielanych do środowiska cząsteczek sygnałowych jest cechą organizmów eukariotycznych. Stąd, system autoregulacji bioluminescencji LuxI/LuxR *V. fischeri* był przez wiele lat uznawany, co prawda, za interesujący sposób komunikowania się komórek bakterii, ale ograniczony do bakterii morskich z rodzaju *Vibrio*. Inne, niezbyt liczne do niedawna i mniej znane przykłady komunikowania się bakterii opisywano dla populacji komórek promieniowca *Streptomyces* spp. syntetyzującego antybiotyki, koniugujących komórek *Enterococcus faecalis* oraz dla *Myxococcus xanthus* tworzących ciała owocowe [15, 16].

Pojęcie *quorum sensing* (QS) upowszechniło się w literaturze po 1994 roku, kiedy to Fuqua i współpracownicy po raz pierwszy użyli tego terminu dla określenia sposobu komunikowania się komórek bakterii w populacjach [18]. Ogromny postęp w tej dziedzinie, dokonany szczególnie w ostatnich 10 latach, dowodzi, że większość gatunków bakterii, o ile nie wszystkie, syntetyzuje i wydziela do środowiska wzrostu specyficzne cząsteczki sygnałowe, przy udziale których zachodzi międzykomórkowa komunikacja, umożliwiającą skoordynowaną odpowiedź komórek populacji na zmiany warunków w środowisku wzrostu.

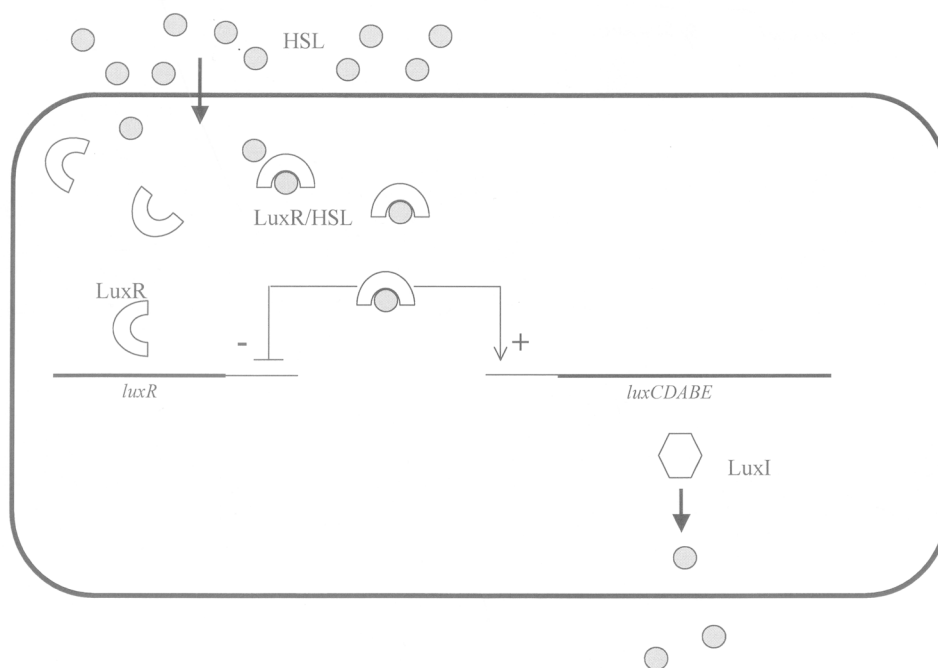
Obecnie w literaturze przedmiotu opisano co najmniej 30 gatunków bakterii, dla których bez żadnych wątpliwości zidentyfikowano system QS, określane jako typ LuxI/LuxR. Do najlepiej scharakteryzowanych pod tym względem gatunków należy zaliczyć: *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* i *Erwinia carotovora* [1, 2, 11, 51, 58, 71, 97]. W latach 1995–2004 ukazało się wiele prac dowodzących, że komórki licznych gatunków bakterii Gram-dodatnich, w tym *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, mają zdolność syntetyzowania i rozpoznawania w środowisku wzrostu dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych, umożliwiających międzykomórkową komunikację również w populacjach tej grupy bakterii. Bakterie Gram-dodatnie wykształciły jednakże inne systemy QS i wykorzystują odmienne związki chemiczne jako autoinduktory (oligopeptydy), a także




inne białka komórkowe jako sensory tych sygnałów [40, 42, 55]. W ostatnich latach dokładniej poznano złożony, dwuskładnikowy system QS wolnożyjących bakterii morskich *Vibrio harveyi*, który łączy cechy charakterystyczne zarówno dla bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Co więcej, okazało się, że komórki *V. harveyi*, syntetyzują i wykorzystują dla tego celu odmienną cząsteczkę sygnałową, zwaną AI-2, którą zidentyfikowano także w komórkach wielu innych gatunków bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich [5, 51, 82, 84, 85, 86].

Badania systemów QS nabierają szczególnego znaczenia w świetle narastającej wiedzy na temat roli, jaką spełniają one w regulacji ekspresji czynników odpowiedzialnych za chorobotwórczość wielu groźnych patogenów człowieka, takich jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella enterica* serotyp *Typhi*, *Burkholderia cepacia*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans* [13, 81, 97].

### 3. ROLA BIAŁEK UKŁADU LUXI/LUXR ORAZ ACYLOWANYCH LAKTONÓW HOMOSERYNY (ACYL-HSL) W SYSTEMIE QS U BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

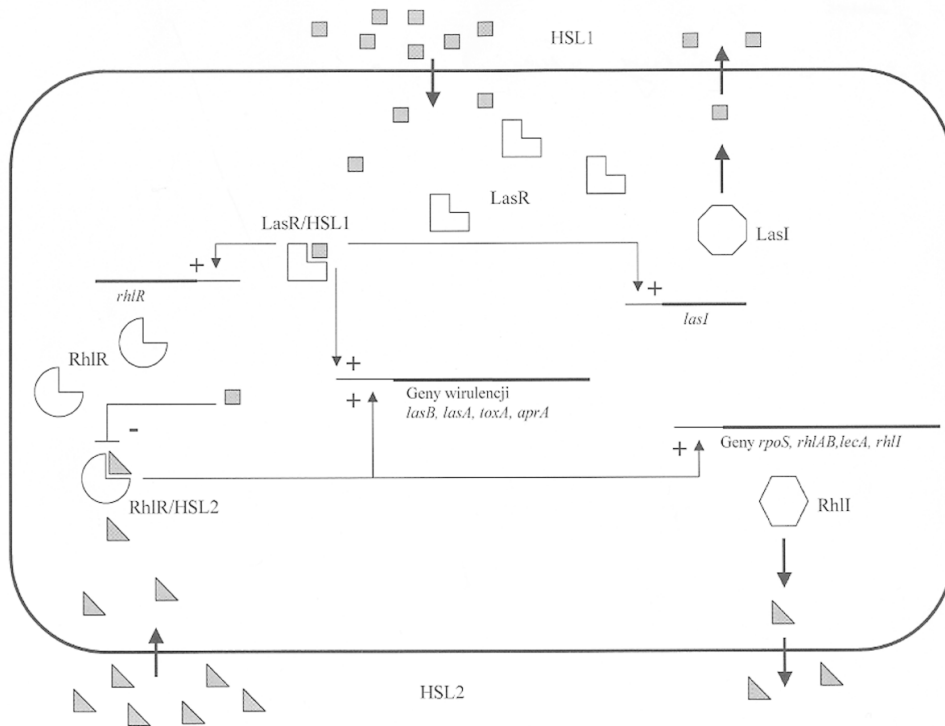
Na rycinie 1 przedstawiono schemat systemu QS bakterii Gram-ujemnych na przykładzie symbiotycznych bakterii *Vibrio fischeri* zdolnych do bioluminescencji. Jak wspomniano wcześniej, emisja światła w omawianym systemie jest ściśle skorelowana z gęstością populacji bakterii, których liczba w skolonizowanym organie zwierzęcia może osiągnąć wartość  $10^{11}/1$  ml. Komórki *Vibrio fischeri* syntetyzują i wydzielają do środowiska wzrostu cząsteczki laktonu N-3-okso-heksanoilo- homoseryny, spełniającego w hodowli tego gatunku funkcję autoinduktora, którego stężenie rośnie w miarę wzrostu liczby komórek w populacji i może osiągnąć wartość końcową nawet do  $10 \mu\text{g}/1\text{ml}$ . Acylowane laktony homoseryny łatwo dyfundują przez osłony komórkowe, stąd ich stężenie w komórkach bakterii oraz w środowisku wzrostu jest praktycznie jednakowe [37]. Komórki bakterii emitują światło w wyniku indukcji syntezy białek kompleksu enzymatycznego lucyferazy, kodowanych przez pięć genów strukturalnych luxCDABE, które są częścią operonu luxICDABE [17, 19, 50]. Gen kodujący syntezę białka regulatorowego LuxR jest transkrybowany w odwrotnym kierunku niż przylegające do niego geny operonu luxICDABE. Ekspresja białek kompleksu lucyferazy jest kontrolowana przez dwa białka regulatorowe LuxI i LuxR. Pierwsze z nich jest syntetazą odpowiedzialną za syntezę autoinduktora acyl-HSL, drugie zaś rozpoznaje autoinduktor i wiąże się z nim, gdy jego stężenie w środowisku wzrostu bakterii osiągnie wartość  $1-10 \mu\text{g}/1\text{ml}$ . Interakcja białka LuxR i autoinduktora, coraz silniejsza w miarę wzrostu stężenia HSL, zmienia konformację przestrzenną białka LuxR, odsłaniając jego domenę wiążącą. Tak zmienione białko regulatorowe może rozpoznać i połączyć się z promotorem operonu luxICDABE, indukując w ten sposób transkrypcję wszystkich



RYCINA 1. Schemat systemu regulacji quorum sensing *Vibrio fischeri*. Operon *luxCDABE* zbudowany z 5 genów strukturalnych kodujących ekspresję lucyferazy i odpowiedzialnych za bioluminescencję. LuxI i LuxR białka regulatorowe systemu, gdzie białko LuxI (  ) jest odpowiedzialne za syntezę autoinduktora HSL (  ), a białko LuxR (  ) za wiązanie autoinduktora i wytworzenie kompleksu LuxR/HSL, który aktywuje (+) transkrypcję operonu *luxCDABE* i równocześnie hamuje (-) transkrypcję operonu *luxR*

genów operonu. Następuje więc indukcja syntezy nie tylko białek kompleksu lucyferazy (LuxCDABE) odpowiedzialnych za świecenie, ale także białka syntetazy LuxI odpowiedzialnej za syntezę autoinduktora. Kompleks LuxR/HSL ma także zdolność rozpoznawania i łączenia się z promotorem genu *luxR*, ale w tym przypadku dochodzi do represji syntezy białka regulatorowego LuxR. Jest to zatem system kontroli negatywnej, który w warunkach silnej indukcji może hamować nadmierną produkcję białek z operonu *luxCDABE* [24].

Podobny, aczkolwiek nieco bardziej złożony mechanizm międzykomórkowej komunikacji, wykształciły oportunistyczne bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterie te syntetyzują dwie pary białek regulatorowych LasI/LasR oraz RhI/RhIR, które są homologami wyżej opisanych białek *Vibrio fischeri* LuxI i LuxR [4, 59]. Oba białka, LasI i RhII są syntetazami, odpowiedzialnymi za syntezę dwóch autoinduktorów, odpowiednio, N-3-okso-dekanolowego laktonu homoseryny i N-butyrylowego laktonu homoseryny [60]. Zatem dwa układy białek regulatorowych i dwa różne autoinduktory (nazwane w tym artykule dla wygody acyl-HSL1 i acyl-HSL2) kontrolują w populacjach



RYCINA 2. Dwuskładnikowy system regulacji quorum sensing *Pseudomonas aeruginosa*. Białko LasI (○) syntetyzuje autoinduktor HSL1 (■), zaś białko RhII (⬡) autoinduktor HSL2 (▲). Białko receptorowe LasR (L) wiąże autoinduktor HSL1, a wytworzony kompleks LasR/HSL1 indukuje (+) zarówno ekspresję genów wirulencji *lasB*, *lasA*, *toxA*, *aprA*, jak również syntezę drugiego białka receptorowego RhIR (C), które tworząc kompleks z autoinduktorem HSL2 wzmaga ekspresję wyżej wymienionych genów wirulencji zależnych od LasR, a także aktywuje ekspresję szeregu innych genów *rpoS*, *rhlAB*, *lecA*, *rhlI* (szczegółowe wyjaśnienie mechanizmu w tekście)

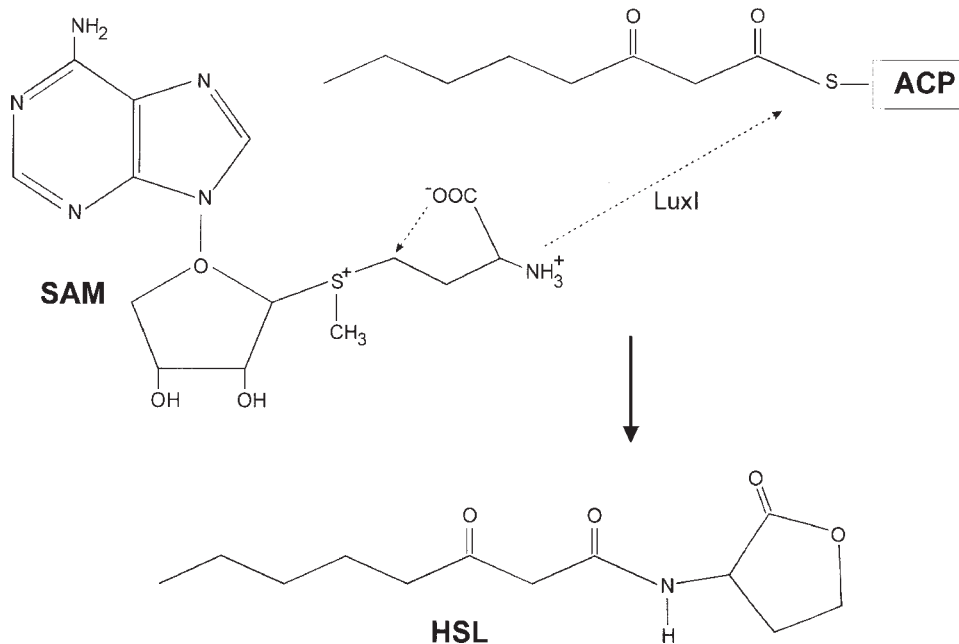
*P. aeruginosa* ekspresję szeregu czynników chorobotwórczości. Mechanizm tej regulacji, przedstawiony schematycznie na rycinie 2, jest podobny do wcześniej opisanej regulacji emisji światła w komórkach w populacjach *V. fischeri*. I tak, w warunkach, gdy populacja komórek *P. aeruginosa* osiągnie wysoką gęstość w tkankach gospodarza, a stężenie syntetyzowanych autoinduktorów acyl-HSL1 i acyl-HSL2 przekroczy w tym środowisku określoną wartość, cytoplazmatyczne białko receptorowe LasR rozpoznaje i łączy się z właściwym dla siebie autoinduktorem acyl-HSL1. Wytworzony kompleks LasR/acyl-HSL1 przyłącza się do promotorów kontrolujących ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za syntezę szeregu sekcyjnych białek *P. aeruginosa*. Białka te wydzielane do środowiska uszkadzają tkanki gospodarza, rozszerzając w ten sposób obszar bakteryjnej infekcji. Do tych białek, będących czynnikami chorobotwórczości, których synteza w tworzonym biofilmie jest indukowana kompleksem LasR/acyl-HSL1 należy zaliczyć: elastazę kodowaną przez gen *lasB*, proteazę kodowaną przez gen

*lasA*, egzotoksynę (gen *toxA*) oraz alkaliczną fosfatazę (gen *aprA*) [9, 11, 35, 59]. Omawiany kompleks LasR/acyl-HSL1 indukuje ekspresję drugiego białka kontrolnego RhIR, które rozpoznaje i wiąże się ze specyficznym dla siebie autoinduktorem acyl-HSL2. Powstały kompleks RhIR/acyl-HSL2 indukuje dodatkowo geny odpowiedzialne za syntezę elastazy oraz fosfatazy alkalicznej, będące pod kontrolą systemu LasI/LasR. Niezależnie, kompleks indukcyjny RhIR/acyl-HSL2 aktywuje inny zespół genów, wśród których znajdują się: podjednostka  $\sigma^s$  polimerazy RNA (gen *rpoS*), transferaza ramnozowa, toksyczna lektyna (geny, odpowiednio, *rhIAB* i *lecA*), a także syntetaza RhII odpowiedzialna za syntezę autoinduktora acyl-HSL2 [4, 11, 19, 25, 39, 58, 60, 63, 92, 93, 94]. Uogólniając, należy stwierdzić, że ta niezwykle efektywna indukcja ekspresji wielu ważnych czynników chorobotwórczości w populacjach *P. aeruginosa* następuje w odpowiedzi na wzrost stężenia dyfuzyjnych autoinduktorów w środowisku wzrostu, rozpoznawanych przez białka regulatorowe LasR i RhIR, pełniące zarówno funkcję sensorów sygnałów, jak i efektorów transkrypcji genów.

W zakończeniu niniejszego rozdziału pragniemy skoncentrować uwagę na dwóch ogólnych zagadnieniach *quorum sensing* u bakterii: funkcji biologicznej białek regulatorowych zaliczanych do rodziny LuxI i LuxR oraz naturze chemicznej autoinduktorów syntetyzowanych przez inne niż wyżej opisane gatunki bakterii Gram-ujemnych. W populacjach komórek *Agrobacterium tumefaciens*, patogena roślin, system QS kontroluje proces koniugacyjnego przenoszenia plazmidu koniugacyjnego Ti, za który odpowiedzialne są białka regulatorowe TraI i TraR oraz syntetyzowany przez białko TraI N-oktanolowy lakton homoseryny działający jako autoinduktor [31, 98]. Podobnie, w populacjach *Erwinia carotovora*, bakterii patogennych dla wielu gatunków różnych roślin, układ białek regulatorowych ExpI/ExpR, analogów systemu LuxI/LuxR, kontroluje syntezę i sekrecję wielu egzoenzymów, w tym celulaz i pektynaz odpowiedzialnych za macerację tkanek i rozszerzanie się infekcji bakteryjnej.

Na podstawie obecnej wiedzy na temat funkcji biologicznej białek zaliczanych do rodziny LuxI/LuxR (*LuxI-like*, and *LuxR-like*) u różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych można stwierdzić, że jedno z białek tego systemu jest syntetazą odpowiedzialną za syntezę dyfuzyjnego autoinduktora, drugie zaś wypełnia funkcję sensora tego sygnału w środowisku wzrostu oraz aktywatora transkrypcji określonych genów. Substratami dla syntezy autoinduktorów u bakterii Gram-ujemnych są S-adenozylometionina (SAM) oraz acylowane, nośnikowe białko Acyl-ACP (ang. *acyl-acyl carrier protein*), które jest pośrednim produktem w syntezie kwasów tłuszczowych. Jak przedstawiono na rycinie 3, funkcja enzymatycznego białka LuxI *V. fischeri* i jego analogów u innych gatunków bakterii Gram-ujemnych sprowadza się do połączenia wiązaniem amidowym SAM ze specyficznym dla danego gatunku Acyl-ACP [52, 90]. Okazało się, że acylowane laktony homoseryny, wypełniające funkcję autoinduktorów u różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych, różnią się między sobą wyłącznie długością acylowego łańcucha przyłączonego do SAM. Wysłunięto wniosek, że syntetaza danego gatunku bakterii Gram-ujemnych (ang. *LuxI-like protein*) ma zdolność przyłączania do SAM ściśle określonego Acyl-ACP, o zdefiniowanej długości łańcucha, syntetyzuje więc autoinduktor jednego rodzaju. Dokładna analiza sekwencji aminokwasowej oraz struktury przestrzennej białek należących do rodziny białek LuxR dowiodły, że są one





RYCINA. 3. Szlak biosyntezy laktonów homoseryny, autoinduktorów bakteryjnego systemu *quorum sensing*. Rodzina enzymatycznych białek typu LuxI tworzy wiązanie amidowe pomiędzy cząsteczkami S-adenozylometioniny (SAM) i acyl - ACP. Wytworzony produkt pośredni ulega laktonizacji, z odłączeniem metyltioadenozyny i wytworzeniem końcowego produktu, którym jest określony acylowany lakton homoseryny (HSL)

zbudowane z dwóch domen, z których jedna, aminoterminalna, jest odpowiedzialna za wiązanie właściwego autoinduktora, druga zaś, karboksyterminalna, za multimeryzację cząsteczki i aktywację transkrypcji docelowych genów [6, 72, 74, 79, 80, 92, 100]. Karboksyterminalna domena białek (ang. *LuxR-like*) zawiera bardzo konserwatywny motyw helisa-skręt-helisa (ang. *helix-turn-helix*), odpowiedzialny za rozpoznanie i połączenie się z promotorami wielu docelowych genów w regionie ich palindromowej sekwencji (ang. *lux-box*), położonej około 40 par zasad powyżej kodonu start [18].

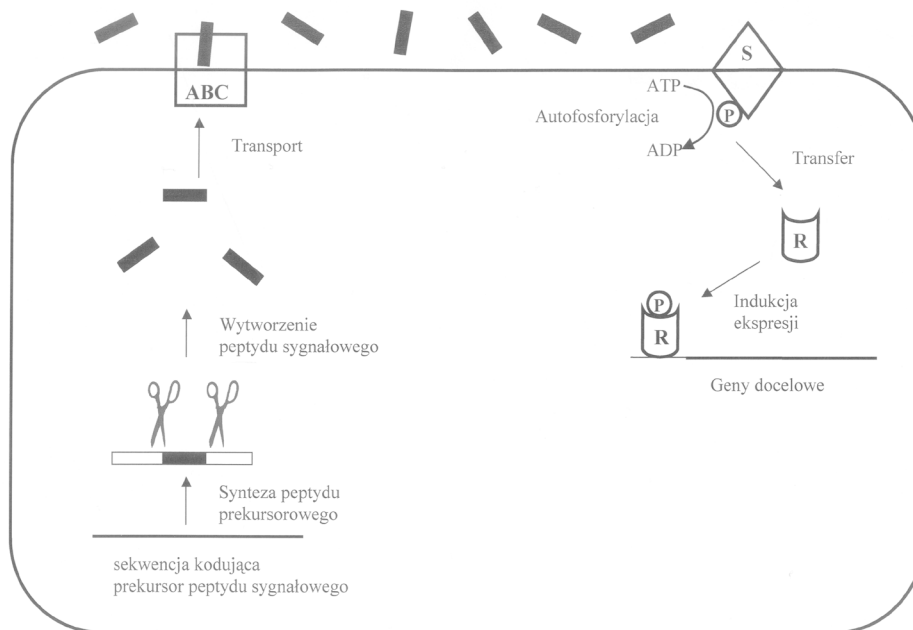
Jak wspomniano wcześniej, białka rodziny LuxR, jako sensory sygnałów, rozpoznają w środowisku wyłącznie specyficzne dla danego gatunku autoinduktory, ale zawierając konserwatywny motyw helisa-skręt-helisa mogą aktywować w komórkach danej populacji bakterii transkrypcję wielu różnych genów, zawierających w regionie ich promotorów docelową sekwencję typu *lux-box* [21, 69, 99]. Ponadto, białka rodziny LuxR są niezwykle wrażliwe na wszelkie zmiany długości acylowego łańcucha acyl-HSL, a stąd tylko właściwe dla danego gatunku acylowane laktony homoseryny mają zdolność pełnej aktywacji transkrypcji docelowych genów. Z drugiej strony okazało się, że związki chemiczne o bardzo podobnej budowie chemicznej do acylowanych laktonów homoseryny mogą hamować wiązanie się białek akceptorowych rodziny LuxR z właściwymi dla nich autoinduktorami. Odkrycie to stworzyło szansę dla podjęcia badań nad wykorzystaniem

takich analogów w hamowaniu systemu QS, jako możliwej strategii dla opracowania skutecznej, alternatywnej terapii zakażeń bakteryjnych [21, 69, 99].

#### 4. ORGANIZACJA I FUNKCJA SYSTEMU *QUORUM SENSING* U BAKTERII GRAM-DODATNICH

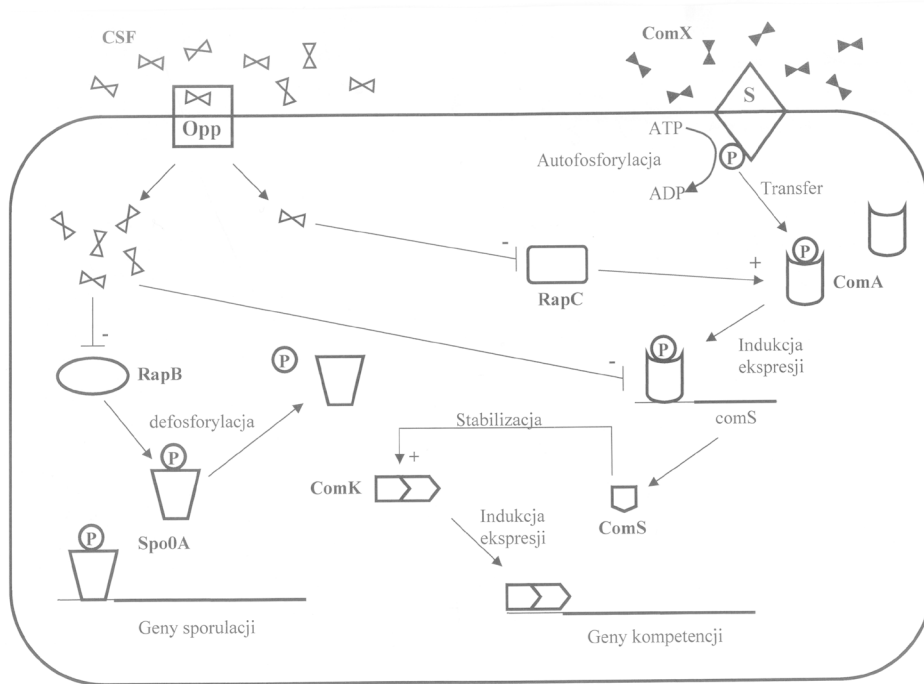
Bakterie Gram-dodatnie w czasie ewolucyjnego rozwoju wykształciły odmienne mechanizmy syntezy cząsteczek sygnałowych i sposoby transmisji sygnałów od białek sensorowych komórki do efektorów. Mechanizmy i białka zaangażowane w QS u bakterii Gram-dodatnich zostały najlepiej poznane u *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* [23, 68]. Funkcję cząsteczek sygnałowych u tej grupy bakterii pełnią oligopeptydy, które powstają w wyniku trawienia większych prekursorów białkowych. Takie cząsteczki sygnałowe, specyficzne dla każdego gatunku bakterii, są transportowane na zewnątrz komórki przy udziale białka transportowego zależnego od ATP (ABC, ang. *ATP-binding cassette*). Gdy stężenie cząsteczek sygnałowych w środowisku wzrostu osiągnie wartość krytyczną, sygnał ten jest rozpoznawany przez kinazę histydynową pełniącą funkcję białka receptorowego. Interakcja cząsteczki sygnałowej z kinazą histydynową i autofosforylacja reszty histydynowej tego białka inicjuje kaskadę reakcji fosforylacji i defosforylacji kolejnych białek komórkowych, z wytworzeniem w końcowym etapie białka regulatorowego specyficznego dla określonego gatunku bakterii Gram-dodatnich. Białka regulatorowe z ufosforylowaną resztą asparaginy rozpoznają promotory docelowych genów, aktywując w ten sposób ich ekspresję [38, 51, 70]. Indukcja ekspresji określonych genów jest więc ostatnim etapem transdukcji sygnałów u bakterii Gram-dodatnich w zsynchronizowanej odpowiedzi komórek populacji na określone, progowe stężenie autoinduktora w ich środowisku wzrostu (ryc. 4).

Dobrze poznanymi przykładami roli biologicznej QS u bakterii Gram-dodatnich jest nabywanie stanu kompetencji przez komórki *Streptococcus pneumoniae* i *Bacillus subtilis*. Nabycie stanu kompetencji, to jest zdolności pobierania obcego DNA, jest związane z szeregiem złożonych przemian fizjologicznych, z których znaczna część jest pod kontrolą omawianego systemu [28]. W przypadku *S. pneumoniae* funkcję cząsteczki sygnałowej spełnia oligopeptyd CSP (ang. *competence stimulating peptide*) zbudowany z 17 aminokwasów, powstający w wyniku proteolizy prekursorowego peptydu ComC, zbudowanego z 41 aminokwasów [27, 66]. CSP jest wydzielany do środowiska wzrostu przy udziale białek transportowych (ang. *Com ABC transporter*). Akceptorem sygnału jest białko kinazy ComD, które przy odpowiednio wysokim stężeniu CSP ulega autofosforylacji, uruchamiając w ten sposób wieloetapowy proces fosforylacji i defosforylacji białek pośrednich, prowadzący do transdukcji sygnału na końcowy akceptor, którym jest białko regulatorowe ComE. Ufosforylowane białko ComE indukuje transkrypcję genu *comX* kodującego syntezę alternatywnej podjednostki sigma polimerazy RNA, odpowiedzialnej za transkrypcję wielu genów strukturalnych zaangażowanych w proces nabywania kompetencji [30, 42, 64]. Przedstawiony na



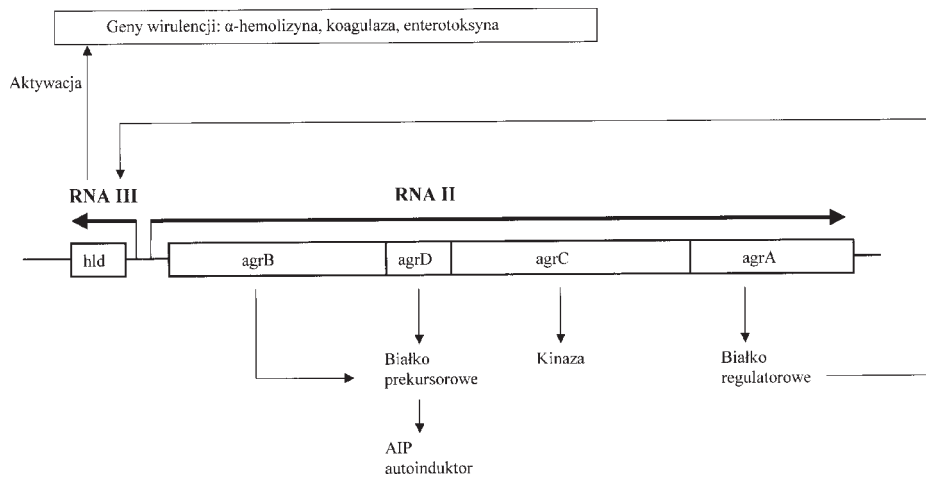
RYCINA 4. Model układu *quorum sensing* u bakterii Gram-dodatnich. Autoinduktorami są krótkie peptydy (■), które powstają w komórkach w wyniku trawienia większego peptydu sygnałowego. Częsteczki sygnałowe są następnie transportowane ze środowiska wzrostu bakterii przy pomocy systemu białek transportowych ABC. Sygnały są rozpoznawane przez domenę sensorową (S) kinazy zakotwiczonej w błonie komórkowej, która podlega autofosforylacji na reszcie histydynowej. Kolejno, grupa fosforanowa (P) jest przenoszona na białko regulatorowe (R). Ufosforylowane zaś białko regulatorowe na reszcie asparaginianowej aktywuje transkrypcję docelowych genów

rycinie 5 schemat QS w populacjach *B. subtilis* obrazuje zarówno niezwykłą złożoność, jak i precyzję mechanizmu rozpoznawania i transdukcji sygnałów w regulacji wzrostu wegetatywnego, sporulacji i nabywania kompetencji komórek, w odpowiedzi na zmiany szybkości wzrostu populacji uzależnionej od warunków środowiska, w tym szczególnie od dostępności źródeł węgla i energii. Populacja komórek *B. subtilis* nabywa kompetencji pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu i na początku fazy stacjonarnej. W tym okresie część komórek zamiera i ulega lizie, a uwolniony z nich DNA, aktywnie pobierany ze środowiska przez subpopulację komórek kompetentnych jest prawdopodobnie wykorzystany w procesach naprawy uszkodzeń ich genomów. Proces sporulacji jest natomiast inicjowany w warunkach ograniczonej dostępności źródeł węgla i energii w środowisku i zahamowania wzrostu wegetatywnego bakterii. Okazało się, że omawiane procesy kompetencji i sporulacji w populacjach *B. subtilis* są kontrolowane przez dwa odmienne oligopeptydy, odpowiednio, ComX (ang. *competence factor*) i CSF (ang. *competence and sporulation factor*). Akumulacja autoinduktora ComX do odpowiednio wysokiego stężenia uruchamia w komórkach szlak reakcji, które prowadzą do ekspresji wielu



RYCINA 5. Regulacja kompetencji i sporulacji u *Bacillus subtilis*. Komórki *B. subtilis* syntetyzują dwa rodzaje autoinduktorów, z których jeden CSF (⊠) reguluje proces sporulacji, a drugi ComX (◄) proces nabywania kompetencji. Białko ComP (◊) jest kinazą pełniącą funkcję białka sensorowego dla autoinduktora ComX, a białko ComA (⌢) pełni funkcję regulatora aktywującego transkrypcję genu *comS*, zaś akumulowane w komórkach białko ComS (⌢) zwiększa poziom białka ComK (⌢), bowiem hamuje jego proteolizę. Tak stabilizowany poziom białka ComK aktywuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za nabywanie kompetencji. Autoinduktor CSF jest transportowany do komórki przy udziale białek systemu transportu Opp. Białko RapB (○) jest fosfatazą, defosforylującą białko regulatorowe Spo0A (▽). Zatem hamowanie (-) syntezy tej fosfatazy przez wysokie stężenie CSF prowadzi do podniesienia poziomu ufosforylowanego białka Spo0A, co w konsekwencji kieruje metabolizm komórki na drogę sporulacji. Ponadto, wysokie stężenie w komórce CSF hamuje aktywność białka ComS, a w konsekwencji hamuje transkrypcję genów kompetencji, promując natomiast w tych warunkach szlak sporulacji. Niskie stężenie CSF hamuje ekspresję (-) białka fosfatazy RapC (□), w efekcie prowadząc do podniesienia w komórce (+) poziomu ufosforylowanego białka ComA, co w rezultacie kieruje komórki na drogę nabywania kompetencji (więcej informacji w tekście)

białek odpowiedzialnych za nabycie kompetencji. W szlaku tym funkcję sensora dla autoinduktora ComX spełnia kinaza ComP, która inicjuje transdukcję sygnału poprzez białka przekaźnikowe, z wytworzeniem białka regulatorowego, którym jest ufosforylowane białko ComA. Białko regulatorowe ComA aktywuje zaś syntezę białka ComS, które spełnia funkcję inhibitora proteolizy drugiego białka regulatorowego ComK. To ostatnie, jest czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym ekspresję białek komórkowych odpowiedzialnych za nabycie kompetencji [76, 89, 91].



RYCINA 6. Organizacja i mechanizm regulacji genów regionu agr *Staphylococcus aureus*. W transkrypcie RNA II geny *agrC* i *agrA* kodują syntezę, odpowiednio, sensora sygnału kinazy AgrC oraz białka regulatorowego AgrA. Obecne w transkrypcie RNA II geny *agrD* i *agrB* są odpowiedzialne za syntezę prekursora i końcowego oktapeptydu, pełniącego funkcję autoinduktora AIP. Wzrost w komórkach poziomu ufosforylowanego białka AgrA, w odpowiedzi na wzrost stężenia autoinduktora AIP, zwiększa pulę transkryptu RNAIII, który jako efektor aktywuje transkrypcję wielu genów kodujących czynniki wirulencji, w tym gen hemolizyny (*hld*)

Drugi z wymienionych autoinduktorów CSF spełnia funkcję cząsteczki sygnałowej zarówno w procesie nabywania kompetencji, jak i sporulacji. CSF, podobnie jak inne autoinduktory, akumuluje się w środowisku wzrostu w miarę powiększania się liczby komórek w populacji, spełniając funkcje zewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej. Jednak w odróżnieniu od innych opisywanych autoinduktorów spełnia dodatkowo funkcję wewnątrzkomórkowego sygnału, który kieruje komórki na drogę sporulacji w warunkach deficytu źródeł pokarmowych [40, 62]. W warunkach wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia CSF obserwuje się zahamowanie aktywności białka ComS, a w efekcie zahamowanie szlaku transdukcji sygnałów prowadzącego do nabycia kompetencji. I odwrotnie, niskie wewnątrzkomórkowe stężenie CSF prowadzi do zahamowania aktywności fosfatazy RapC, a w efekcie do podwyższenia puli ufosforylowanego białka ComA i skierowania komórek na drogę kompetencji. Niezwykle ważną funkcją CSF jest hamowanie aktywności fosfatazy RapB, enzymu defosforylującego regulatorowe białko sporulacji *B. subtilis*, SpoOA. Zatem zahamowanie aktywności tej fosfatazy podwyższa pulę ufosforylowanego białka SpoOA, odpowiedzialnego za indukcję złożonego szlaku sporulacji. W tym niezwykle precyzyjnym mechanizmie regulacji sporulacji i kompetencji *B. subtilis*, kluczową rolę sygnałów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych spełniają dwa odmienne oligopeptydy oraz specyficzne kinazy jako receptory tych sygnałów [23, 61, 70, 75]. Ponadto, precyzyjna regulacja zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej puli czynnika CSF przy udziale białka transportowego Opp, w

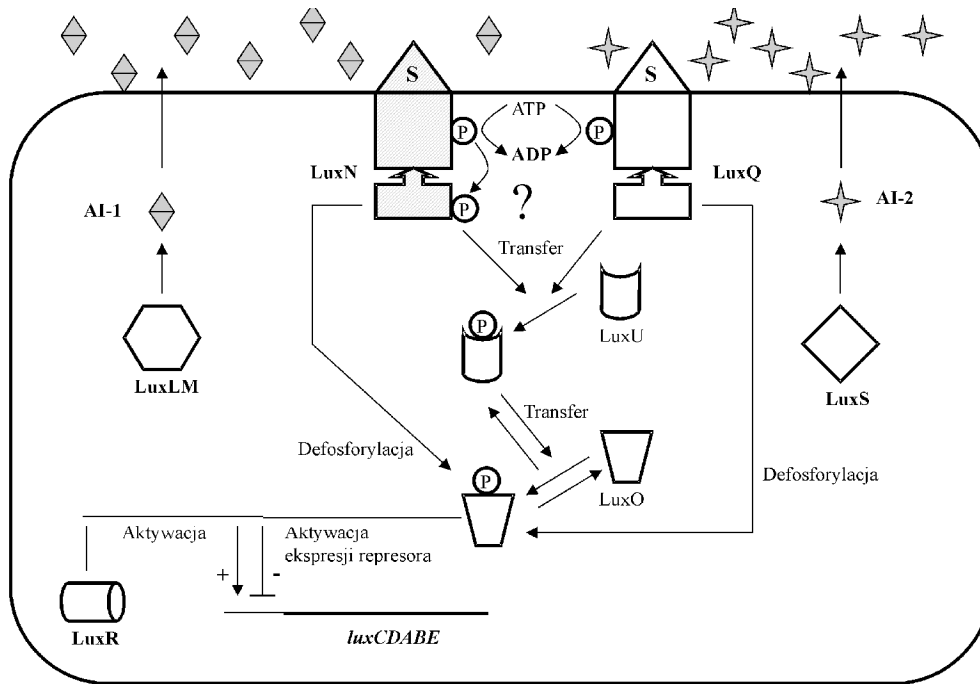
odpowiedzi na zmieniające się czynniki środowiska, przystosowuje sposób życia komórek w populacji do aktualnych warunków ich bytowania.

W końcowej części tego rozdziału przedstawiono system *quorum sensing* chorobotwórczych bakterii *Staphylococcus aureus*, zwany *agr*BDCA, który kontroluje ekspresję szeregu zewnątrzkomórkowych czynników wirulencji. Synteza cząsteczek sygnałowych oraz ich sensorów jest kodowana przez geny locus *agr*BDCA, które są transkrybowane z jednego promotora P2 z wytworzeniem policistronowego transkryptu RNAII (ryc. 6). Gen *agrD* koduje syntezę prekursorowego peptydu zbudowanego z 46 aminokwasów, który po kolejnych modyfikacjach, związanych z częściową proteolizą i wytworzeniem oktapeptydu oraz przyłączeniem pod kontrolą genu *argB* tiolaktonowego pierścienia, nabiera właściwości specyficznego autoinduktora AIP (ang. *autoinducing peptide*) [32, 33, 53]. Kolejny gen *agrC* odpowiada za syntezę kinazy, natomiast pod kontrolą genu *agrA* syntetyzowane jest końcowe białko regulatorowe AgrA. Białko to prawdopodobnie zwiększa pulę antysensownego transkryptu RNAIII, syntetyzowanego z promotora, zlokalizowanego w locus *agr* powyżej genu *agrB*. Region 5' tego transkryptu, o długości 512 nukleotydów, spełnia w komórkach *S. aureus* rolę pozytywnego regulatora ekspresji genów, aktywując syntezę szeregu białek sekrecyjnych na poziomie ich translacji, w tym  $\alpha$ -hemolizyny, koagulazy, enterotoksyny oraz innych czynników wirulencji [34, 44, 54].

Co niezwykle ciekawe, wśród chorobotwórczych szczepów *S. aureus* wyróżnia się cztery grupy izolatów, syntetyzujących odmienne oligopeptydy jako szczepowo-specyficzne autoinduktory. Te odmienne oligopeptydy są rozpoznawane jako cząsteczki sygnałowe wyłącznie przez specyficzne kinazy. Co więcej, oligopeptyd syntetyzowany przez daną grupę szczepów nie tylko nie aktywuje genów *agr* innej grupy szczepów, ale całkowicie hamuje ich ekspresję. Zatem chorobotwórczy szczep *S. aureus*, który jako pierwszy skolonizuje gospodarza i uruchomi swój system QS, skutecznie konkuruje ze szczepami tego samego gatunku, ale należącymi do innej grupy, uniemożliwiając im inwazję tego samego gospodarza [33, 48, 56].

## **5. UNIWERSALNY AUTOINDUKTOR AI-2 JEST CZĄSTECZKĄ SYGNAŁOWĄ UMOŻLIWIAJĄCĄ KOMUNIKOWANIE SIĘ KOMÓREK BAKTERII W POPULACJACH MIESZANYCH**

Badania możliwości międzygatunkowego komunikowania się komórek bakterii w naturalnych środowiskach zostały zintensyfikowane w ostatnich latach, a impulsem była praca Bassler i wsp. opublikowana w 1997 roku [1], w której autorzy przedstawili wyniki na ten temat u wolnożyjących bakterii morskich *Vibrio harveyi* zdolnych do bioluminescencji. Bakterie tego gatunku, w odróżnieniu od wcześniej opisanego, symbiotycznego gatunku *V. fischeri*, nie są symbiontami, ale wolnożyjącymi w płytkich wodach morskich, w osadach sedymentacyjnych, a także na powierzchni ciała lub w



RYCINA 7. Schemat układu *quorum sensing* *Vibrio harveyi*. Dwa odmienne autoinduktory AI-1 i AI-2, odpowiednio, acetylowany lakton homoseryny (◊) i cykliczny związek, pochodna 4,5-dihydroxy-2,3-pentandionu (✦) (ryc. 8) są syntetyzowane przez białka, odpowiednio, LuxLM (⬡) i LuxS (◊). Dwa odmienne białka kinaz sensorowych rozpoznają sygnały, odpowiednio, LuxQ sygnał AI-2 i LuxN sygnał AI-1. Sygnały z obu kinaz są przenoszone poprzez ich defosforylację i następnie fosforylację białka fosfotransferazy LuxU (⌢), która pełni funkcję integracyjną dla obu dróg przekazywania sygnałów. Fosfotransferaza LuxU przenosi sygnał na kolejne białko LuxO (⌢), które w formie ufosforylowanej spełnia funkcję negatywnego regulatora (-) dla transkrypcji genów operonu lucyferazy *luxCDABE*. Białko LuxR (⌢), odmienne od wcześniej omawianego białka regulatorowego LuxR *Vibrio fischeri*, spełnia rolę czynnika transkrypcyjnego, aktywującego (+) geny operonu lucyferazy *luxCDABE* (szczegółowe informacje w tekście)

przewodzie pokarmowym wielu zwierząt morskich. Populacja komórek *V. harveyi*, podobnie jak *V. fischeri*, ma zdolność bioluminescencji w określonych warunkach, aczkolwiek mechanizm tego zjawiska jest u tego gatunku odmienny. Najogólniej, populacja komórek *V. harveyi*, podobnie jak inne gatunki bakterii Gram-ujemnych, wykorzystuje acyl-HSL jako cząsteczki sygnałowe, ale system rozpoznawania i transdukcji tego typu sygnałów są analogiczne do tych, jakie funkcjonują u bakterii Gram-dodatnich.

Najważniejszym odkryciem było wykazanie, że *V. harveyi* syntetyzuje i rozpoznaje zupełnie odmienny autoinduktor, zwany AI-2, który przeznaczony jest do komunikowania się z komórkami innych bakterii, żyjących wspólnie w tej samej niszy. W naturalnych środowiskach *V. harveyi* żyje i rozwija się w postaci międzygatunkowych,

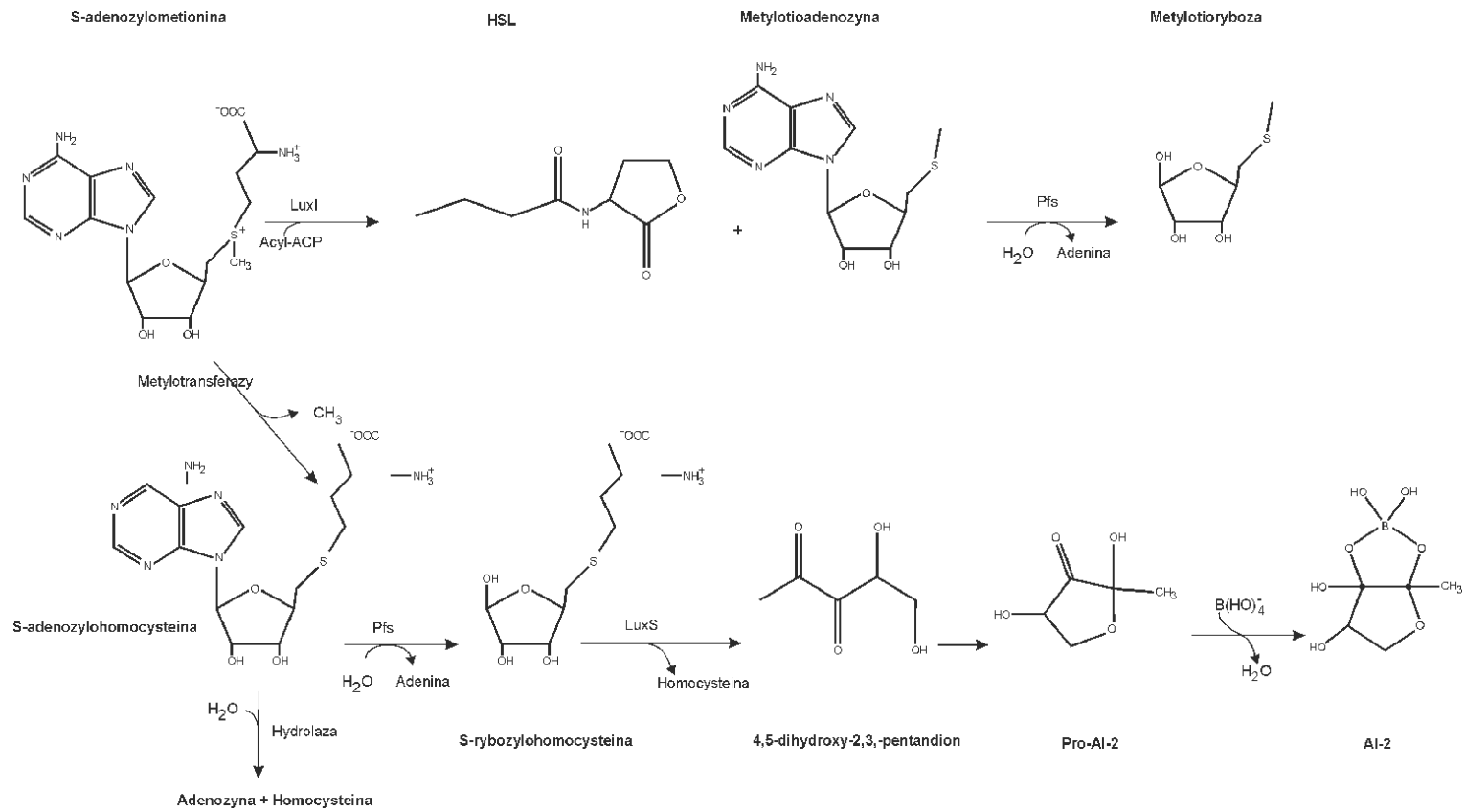
mieszanych populacji. Stąd, synteza acyl-HSL jako cząsteczek sygnałowych dla regulacji aktywności własnej populacji, a także zdolność syntezy zarówno własnego, sygnału AI-2, jak i rozpoznawania cząsteczek sygnałowych AI-2 produkowanych przez inne gatunki bakterii, pozwala *V. harveyi* monitorować gęstość komórek nie tylko we własnej populacji, ale także w populacjach innych gatunków żyjących w tym samym środowisku (ryc. 7). Na zupełnie odmienne funkcje biologiczne omawianych autoinduktorów *V. harveyi* acyl-HSL i AI-2 wskazują wyniki dowodzące, iż pierwszy z sygnałów reguluje ekspresję operonu luxCDABE odpowiedzialnego za bioluminescencję, drugi zaś kontroluje aktywność innych genów i operonów [51].

Zdolność do syntezy cząsteczki sygnałowej AI-2 oraz obecność kodującego ją genu *luxS* zostały w ostatnich latach potwierdzone dla wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, takich jak: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serotyp *Typhimurium*, *Salmonella enterica* serotyp *Typhi*, *Shigella flexnerii*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium perfringens* i inne [3, 8, 13, 51, 81, 82, 85]. Dla niektórych z wymienionych gatunków udało się już skonstruować bardzo dogodne modele badawcze w postaci mutantów pozbawionych zdolności syntezy AI-2 (*luxS*<sup>-</sup>). Szczegółowe badania fenotypowe i genetyczne tych mutantów pozwolą zapewne w najbliższym czasie na lepsze zrozumienie mechanizmu tej regulacji oraz na dokładniejsze poznanie kontrolowanych w ten sposób genów i operonów [10, 36, 45]. Wiemy już, że autoinduktor AI-2 indukuje geny wyspy patogenności u chorobotwórczych szczepów *E. coli* O157:H7 [77] oraz jest odpowiedzialny za regulację syntezy hemolizyny i proteazy u *V. vulnificus*, a także za sekrecję proteazy cysteinowej *S. pyogenes* [46] oraz za ekspresję genu wirulencji *virB* *Shigella flexnerii* [10]. Donoszono także o roli tego autoinduktora w tworzeniu powodującego próchnicę zębów biofilmu przez *P. gingivalis* i *Streptococcus gordonii* [49]. Sądzi się, że sposób komunikowania się komórek różnych gatunków bakterii przy pomocy uniwersalnego alfabetu, jakim jest cząsteczka sygnałowa AI-2, został wykształcony przed ich dywergencją na dwie współcześnie żyjące grupy bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, które posługują się odmiennymi cząsteczkami sygnałowymi oraz innymi mechanizmami ich rozpoznawania i transdukcji sygnałów [5, 51, 71, 83, 97].

Autoinduktor AI-2 pozostaje nadal intrygującą cząsteczką sygnałową nie tylko ze względu na swoją uniwersalną funkcję dla większości (o ile nie dla wszystkich bakterii), ale także ze względu na budowę chemiczną oraz szlak biosyntezy.

Wspomniano wcześniej, że cząsteczki sygnałowe syntetyzowane przez różne gatunki bakterii Gram-ujemnych (acyl-HSL) oraz bakterii Gram-dodatnich (oligopeptydy) różnią się, odpowiednio, długością łańcucha acylowego oraz liczbą i rodzajem aminokwasów. Zatem, takie specyficzne gatunkowo sygnały mogą być rozpoznawane i transdukowane wyłącznie przez komórki należące do określonego gatunku, nie są zaś rozpoznawane przez inne, nawet blisko spokrewnione gatunki bakterii. W odróżnieniu, autoinduktor AI-2 ma identyczną budowę chemiczną i powstaje w identycznym szlaku biosyntezy, niezależnie od szczepu, gatunku, czy rodzaju bakterii [71]. Substratem dla syntezy AI-2, podobnie jak dla acyl-HSL, jest S-adenozylometionina (SAM). SAM jest ważnym





RYCINA 8. Szlaki syntezy autoinduktora AI-2 oraz laktonów homoseryny (HSL)

metabolitem, bowiem jest donorem grup metylowych dla metylacji DNA, RNA oraz wielu białek. Metylotransferazy, przenosząc grupę metylową z SAM na różne końcowe akceptory, generują w komórkach produkt pośredni S-adenozylhomocysteinę (SAH). SAH jest wysoce toksyczny dla komórki i dlatego jest szybko eliminowany przez nukleozydazę Pfs, która odłącza adeninę z wytworzeniem S-rybozylo-homocysteiny (SHR) [7, 71]. SHR jest substratem dla białka LuxS, produktu genu *luxS*, które hydrolizuje SHR do homocysteiny (HC) i 4,5-dihydrokso-2,3-pentandionu (DPD), a ten po spontanicznej cyklizacji i skompleksowaniu atomu boru przyjmuje postać AI-2 (diestru furanozylo-boranowego) [5, 22, 71]. Przedstawiony na rycinie 8 schemat syntezy AI-2 wskazuje, że substratem dla biosyntezy zarówno gatunkowo specyficznych autoinduktorów klasy acyl-HSL, jak i tej uniwersalnej cząsteczki sygnałowej jest S-adenozylometionina, a w szlaku reakcji biorą udział metylotransferazy oraz nukleozydaza Pfs.

Wciąż intrygującym i oczekującym na wyjaśnienie jest pytanie o naturę bakteryjnych białek, receptorów AI-2. Z wyjątkiem *V. harveyi*, gdzie funkcję tę pełni periplazmatyczne białko LuxP (ang. *ribosome-like binding protein*), nic nie wiadomo o takich białkach u innych gatunków bakterii [5]. Można domniemywać, że ze względu na naturę chemiczną AI-2 białka takie winny należeć do klasy białek wiążących reszty cukrowe (ang. *sugar binding proteins*). Jednym z bardziej nieoczekiwanych odkryć w tej dziedzinie, opisanym w 2002 roku, było wykazanie, że prekursor AI-2 (pro-AI-2) tworzy kompleks z borem i w tej postaci jest rozpoznawany przez białko LuxP *V. harveyi*, co udowodniono na podstawie analizy struktury kryształu omawianego kompleksu LuxP/pro-AI-2/Bor [5]. Zgodnie z naszą wiedzą, byłaby to pierwsza, zdefiniowana funkcja biologiczna boru w regulacji ważnych procesów życiowych w świecie bakterii. Nie jest wykluczone, że cząsteczka prekursorowa pro-AI-2 może w środowiskach naturalnych tworzyć kompleksy z innymi metalami bądź związkami, a powstałe w ten sposób autoinduktory, pochodne AI-2, mogą aktywować drogi transdukcji sygnałów poprzez różne białka, pochodne LuxP, spełniające funkcję receptorów takich sygnałów.

Należy jednak stwierdzić, że pomimo iż geny kontrolowane przez autoinduktor AI-2 zostały wykryte u wielu gatunków bakterii, to jednak wiedza, o mechanizmie komunikowania się komórek przy jego udziale, jest wciąż niepełna i ograniczona do trzech gatunków: *V. harveyi*, *V. cholerae* i *S. enterica* serotyp *Typhimurium* [97]. Nie brak w literaturze przedmiotu także publikacji podważających dość powszechny pogląd, że AI-2 jest uniwersalną cząsteczką sygnałową dla międzygatunkowej komunikacji w świecie bakterii. Przytacza się nowe wyniki lub interpretuje się inaczej wcześniejsze dane wskazując, że funkcji białka LuxS nie można sprowadzić wyłącznie do syntezy cząsteczki sygnałowej AI-2 i jego roli w systemie QS. Białko to pełni bowiem ważną funkcję w szlakach syntezy SAM oraz wykorzystania tego związku jako donora grupy metylowej. Stąd, inaktywacja genu *luxS* prowadziłaby nie tylko do zahamowania syntezy prekursora AI-2, ale także do zaburzenia całego szlaku syntezy metioniny, SAM oraz metylacji kwasów nukleinowych i białek [95]. Zdaniem tych autorów nie ma zatem nic dziwnego w tym, że mutacja genu *luxS* w szczepie *E. coli* 0157:H7 prowadzi do zmiany ekspresji aż około 400 genów [12, 78]. Nie brak też głosów, że AI-2, podobnie jak jego prekursor (DPD), jest mutageny i toksyczny dla komórki, a stąd musi być wydalany z komórek do środowiska w czasie logarytmicznego wzrostu i intensywnego metabo-

lizmu. Jednakże w czasie fazy stacjonarnej i deficytu źródeł węgla i energii AI-2 nie jest wydalany, jak to wykazano dla *S. enterica* serotyp *Typhi*, *E. coli*, *S. pyogenes* i *N. gonorrea*, ale aktywnie pobierany z otoczenia i wykorzystywany jako ekwiwalent rybozy [45, 82, 96]. W konkluzji należałoby stwierdzić, że rola cząsteczki sygnałowej AI-2 jako globalnego regulatora QS w populacjach *V. harveyi* nie podlega obecnie dyskusji, natomiast jej uniwersalny udział w świecie bakterii jako globalnego autoinduktora systemu QS wymaga jeszcze głębszych badań. Bakterie w czasie wzrostu i rozwoju wydają do środowiska wzrostu wiele różnorodnych, niskocząsteczkowych metabolitów, które mogą spełniać funkcję pozytywnych lub negatywnych regulatorów ekspresji genów, mogą także spełniać funkcję aktywatorów lub inhibitorów określonych białek enzymatycznych. Często nie jest więc łatwo zdecydować, czy obserwowane zmiany fenotypowe, metaboliczne w populacjach bakterii są efektem działania bakteryjnego QS, czy też może przejawem zupełnie odmiennych mechanizmów regulacji metabolicznej.

Zgodnie z propozycją Klausa Winzera i współpracowników [95] metabolit, który może być uznany za dyfuzyjną cząsteczkę sygnałową w systemie *quorum sensing*, winien spełniać następujące kryteria:

- synteza takiego związku powinna zachodzić w warunkach fizjologicznych, w ściśle określonej fazie wzrostu populacji i w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska,
- związek ten winien być akumulowany zewnątrzkomórkowo i być rozpoznawany przez specyficzne białko receptorowe,
- akumulacja związku w określonym stężeniu winna wywoływać skoordynowaną odpowiedź całej populacji lub jej większości,
- fizjologiczna i metaboliczna odpowiedź komórek populacji winna obejmować inne aktywności niż te, które są związane z detoksyfikacją takiego związku lub jego wykorzystaniem jako źródła węgla i energii.

## 6. ROLA BIOLOGICZNA QS W NATURALNYCH ŚRODOWISKACH BAKTERII

Systemy QS umożliwiając wewnątrz- i międzygatunkową komunikację komórek pozwalają bakteriom na koordynację różnorodnych aktywności biologicznych w obrębie populacji danego gatunku, a także na ustalenie wzajemnych relacji pomiędzy populacjami różnych gatunków bakterii, które w środowiskach naturalnych mogą przyjąć charakter współdziałania, kompetycji lub antagonizmu. Poniżej przedstawiono kilka dobrze poznanych przykładów takich międzygatunkowych współzależności, w ustaleniu których międzygatunkowa komunikacja bakterii przy udziale dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych odgrywa decydujące znaczenie. Jednym z takich przykładów międzygatunkowych interakcji są komórki wcześniej diskutowanego gatunku *V. harveyi*, które żyjąc w mieszanych populacjach wykorzystują cząsteczkę AI-2, syntetyzowaną przez inne gatunki, do regulacji ekspresji własnych genów.

Innym, często cytowanym przykładem jest biofilm, tworzony przez populacje komórek *P. aeruginosa* i *Burkholderia cepacia* u pacjentów z mukowiscydozą. Chorzy na mukowiscydozę produkują nadmierne ilości śluzu, który jest bogatym podłożem dla rozwoju wymienionych bakterii w formie biofilmu. W tworzeniu omawianego biofilmu zasadniczą rolę ogra ywa międzygatunkowa komunikacja przy udziale cząsteczek sygnałowych [13, 20, 57, 73, 87]. Dowiedziono w układach doświadczalnych, że obecność autoinduktora produkowanego przez komórki *P. aeruginosa* z funkcjonalnym systemem białek LasI/LasR jest warunkiem koniecznym dla indukcji ekspresji czynników wirulencji *B. cepacia*. Na tej podstawie przyjmuje się, że u pacjentów z CF najpierw dochodzi do infekcji i rozwoju populacji *P. aeruginosa* i akumulacji dyfuzyjnej cząsteczki sygnałowej acyl-HSL, która jest rozpoznawana przez komórki *B. cepacia* jako sygnał dla ekspresji własnych czynników wirulencji ułatwiających kolonizację tkanki przez tego groźnego patogena. Dobrze udokumentowanym przykładem roli systemu QS w układach antagonistycznych i kompetycyjnych są wcześniej wspomniane wyniki, które uzyskano w badaniach chorobotwórczych bakterii *S. aureus*. W tym przypadku specyficzny acyl-HSL, syntetyzowany przez jedną grupę szczepów, hamuje ekspresję genów wirulencji innej grupy szczepów, uniemożliwiając im w ten sposób kolonizację tej samej niszy [33, 48, 56]. Inna strategia eliminowania konkurentów z środowiska jest opisywana dla bakterii *P. aureofaciens* zdolnych do syntezy antybiotyków. Synteza antybiotyków u tego gatunku jest indukowana obecnością w środowisku cząsteczek sygnałowych acyl-HSL, produkowanych także przez inne gatunki bakterii żyjących w tej samej niszy. Szybka akumulacja autoinduktora w środowisku, jako rezultat współdziałania różnych gatunków, indukuje szlak produkcji antybiotyku w populacji komórek *P. aureofaciens*, co w konsekwencji eliminuje inne gatunki ze wspólnego środowiska [77]. Alternatywną strategię eliminacji bakterii *E. carotovora* wykształciły populacje komórek *B. subtilis*. W tym przypadku syntetyzowana przez *B. subtilis* i wydzielana do środowiska metalohydrolaza (AiiA) inaktywuje autoinduktor produkowany przez *E. carotovora*, którego obecność jest konieczna dla indukcji ekspresji genów odpowiedzialnych za proces kolonizacji roślin [14]. Podobnie, glebowe bakterie z rodzaju *Variovorax* mają zdolność wykorzystywania różnych autoinduktorów klasy acyl-HSL jako źródła węgla i azotu, ograniczając w ten sposób możliwość komunikowania się komórek w populacjach innych gatunków bakterii, żyjących w tej samej niszy ekologicznej [41].

Badania na temat roli systemu QS w kształtowaniu rozmaitych interakcji pomiędzy różnymi gatunkami bakterii, a także pomiędzy bakteriami i organizmami wyższymi są dopiero w początkowej fazie. Można się spodziewać w najbliższych latach dalszych, ważnych odkryć w tej dziedzinie, związanych z jednej strony ze znaczeniem tego zjawiska w procesie infekcji, w tworzeniu groźnych biofilmów na materiałach medycznych, z drugiej zaś z ukierunkowanym działaniem specyficznych inhibitorów, naturalnych i syntetycznych analogów dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych, które potencjalnie mogą być zastosowane jako nowe leki blokujące ekspresję czynników wirulencji. Dobrze udokumentowanym przykładem hamowania bakteryjnego systemu QS i zapobiegania w tworzeniu biofilmu jest zdolność do syntezy halogenowanych furanonów przez morski glon *Delisea pulchra*. Okazało się, że związki te są wysoce aktywne w zapobieganiu

tworzenia biofilmu na statkach rybackich i sieciach jako kompetycyjne analogi acylowanych laktonów homoseryny. Szczegółowe badania wskazują, że halogenowane furanony prawdopodobnie konkurują z autoinduktorem o miejsce wiązania na białku receptorowym LuxR i w ten sposób blokując system QS *Serratia liquefaciens* hamują proces kolonizacji i tworzenia biofilmu [47, 88]. Nie można także wykluczyć, że przyłączenie inhibitora destabilizuje białko LuxR poprzez drastyczne obniżenie czasu jego półtrwania lub zablokowanie procesu dimeryzacji cząsteczki [8, 81].

W poszukiwaniu naturalnych i syntetycznych związków chemicznych jako potencjalnych nowych leków antybakteryjnych, bardzo obiecujące są prace dowodzące, że również syntetyczne halogenowane furanony mogą być skutecznymi inhibitorami tworzenia biofilmu przez *E. coli* oraz ruchu pełzakowatego przez *P. aeruginosa*, a więc procesów kontrolowanych przez system QS [29, 67]. Wskazuje się również, że różne gatunki roślin wyższych, takie jak: ryż, groch, pomidor i gryka, syntetyzują i wydzielają do środowiska bliżej jeszcze niezidentyfikowane substancje, które jako analogi cząsteczek sygnałowych, w tym również prawdopodobnie analogi AI-2, kontrolują aktywność populacji bakterii w danych niszach ekologicznych [5]. Wydaje się, że ważnym poznawczym kierunkiem poszukiwań naukowych u bakterii chorobotwórczych winny być badania enzymów szlaków biosyntezy autoinduktorów oraz struktury i funkcji specyficznych białek receptorowych oraz białek przekaźnikowych. Dokładne poznanie natury i funkcji tych białek stworzyłoby szansę dla syntezy specyficznych inhibitorów jako leków blokujących rozpoznanie lub transdukcję sygnałów, a w konsekwencji blokujących QS i hamujących ekspresję czynników wirulencji.

## 7. PODSUMOWANIE

W świetle obecnej wiedzy na temat bakteryjnego systemu QS populacje bakterii zarówno w hodowlach, jak i w ich środowiskach naturalnych należy rozpatrywać jako zespoły zsynchronizowanych komórek, regulujących zbiorowo ważne funkcje życiowe w sposób podobny jak komórki tkanek organizmów wyższych. Populacje bakterii jako zbiorowości jednokomórkowych organizmów w biofilmach mogły być jednym z wczesnych etapów ewolucji organizmów wielokomórkowych. System QS pozwalał bowiem ogromnej populacji indywidualnych komórek koordynować w sposób globalny różnorodne aktywności, w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, dostępność substancji pokarmowych oraz obecność innych gatunków bakterii w tej samej niszy ekologicznej. Atrakcyjność badań systemu QS wynika z ogólnobiologicznego i biotechnologicznego znaczenia procesów i aktywności kontrolowanych przez te wyspecjalizowane układy sygnałów i przekaźników u różnych gatunków bakterii środowiskowych i chorobotwórczych. Pełniejsze zrozumienie elementów i mechanizmów odpowiedzialnych za komunikowanie się bakterii w środowiskach naturalnych może przynieść nowe propozycje o znaczeniu biotechnologicznym. Kontrola kolonizacji roślin przez bakterie symbiotyczne i chorobotwórcze, kontrola tworzenia biofilmów w środowiskach naturalnych, na materiałach oraz urządzeniach medycznych, to jedno z

obecnie dyskutowanych oczekiwaniach o znaczeniu biotechnologicznym. Duże nadzieje wiąże się również z badaniami, których perspektywnym celem jest opracowanie nowych leków, które jako inhibitory QS mogą pozwolić na opracowanie nowej strategii skutecznego leczenia wielu bakteryjnych chorób człowieka.

## LITERATURA

- [1] BASSLER BL, GREENBERG EP, STEVENS AM. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 4043–4045.
- [2] BASSLER BL. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999; **2**: 582–587.
- [3] BASSLER BL. A multichannel two-component signaling relay controls quorum sensing in *Vibrio harveyi*. W: Dunny GM, Winans SC [red.] Cell- cell Signaling in Bacteria. Washington DC: ASM Press 1999: 259–273.
- [4] BRINT JM, OHMAN DE. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 1995; **177**: 7155–7163.
- [5] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, VAN DORSSEALER A, PELCZER I, BASSLER BL, HUGHSON FM. Structural identification of bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002; **415**: 545–549.
- [6] CHOI SH, GREENBERG EP. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 1115–1119.
- [7] CORNELL KA, SWARTS WE, BARRY RD, RISCOE MK. Characterization of recombinant *Escherichia coli* 5'-methyl-thioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: Analysis of enzymatic activity and substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **228**: 724–732.
- [8] DANIELS R, VANDERLEYDEN J, MICHIELS J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2003; **28**: 261–289.
- [9] DAVIES DG, PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; **280**: 295–298.
- [10] DAY WA Jr, MAURELLI AT. *Shigella flexneri* LuxS quorum sensing system modulates virB expression but is not essential for virulence. *Infect Immun* 2001; **69**: 15–23.
- [11] DE KIEVIT TR, IGLEWSKI BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *Infect Immunol* 2000; **68**: 4839–4849.
- [12] DELISA MP, WU CF, WANG L, VALDES JJ, BANTLEJ WE. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5239–5247.
- [13] DONABEDIAN H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003; **46**: 207–214.
- [14] DONG YH, XU JL, LI XZ, ZHANG LH. AIIA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3526–3531.
- [15] DUNNY GM, BROWN BL, CLEWELL DB. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 3479–3483.
- [16] DWORKIN M, KAISER D. Cell interaction in myxobacterial growth and development. *Science* 1985; **230**: 18–24.
- [17] ENGBRECHT J, SILVERMAN M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 4154–4158.
- [18] FUQUA C, WINANS SC, GREENBERG EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; **176**: 269–275.
- [19] FUQUA C, WINANS SC, GREENBERG EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 1996; **50**: 727–751.
- [20] GOVAN JR, HUGHES JE, VANDAMME P. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 1996; **45**: 395–407.

- [21] GRAY KM, PASSADOR L, IGLEWSKI BH, GREENBERG EP. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 3076–3080.
- [22] GREENE RG. Biosynthesis of methionine. W: Neidhardt F [red.] *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press 1996 : str 542–560.
- [23] GROSSMAN AD. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 1995; **29**: 477–508.
- [24] HANZELKA BL, PARASEK MR, VAL DL, DUNLAP PV, CRONAN JE, GREENBERG EP. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* 1999; **181**: 5766–5770.
- [25] HASSETT DJ, MA JF, ELKINS JG, MCDERMOTT TR, OCHSNER UA, WEST SE, HUANG CT, FREDERICS J, BURNETT S, STEWART PS, et al. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 1999; **34**: 1082–1093.
- [26] HASTINGS J, NEALSON KH. Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* 1977; **31**: 549–595.
- [27] HAVERSTEIN LS, COOMARASWAMY G, MORRISON DA. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11140–11144.
- [28] HAVERSTEIN LS, MORRISON DA. Quorum sensing and peptide pheromones in Streptococcal competence for genetic transformation. W: Dunny GM, Winans SC [red.] *Cell-cell Signaling in Bacteria*. Washington DC: ASM Press 1999: 9–26.
- [29] HENTZER M, RIEDEL K, RASMUSSEN TB, HEYDORN A, ANDERSEN JB, PARSEK MR, RICE SA, EBEL L, MOLIN S, HOIBY N, KJELLEBERG S, GVIKOV M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 2002; **148**: 87–102.
- [30] HUI FM, ZHOU L, MORRISON DA. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes. *Gene* 1995; **153**: 25–31.
- [31] HWANG I, LI PL, ZHANG L, PIPER KR, COOK DM, TATE ME, FARRAND SK. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4639–4643.
- [32] JI G, BEAVIS R, NOVICK RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 12055–12059.
- [33] JI G, BEAVIS R, NOVICK RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 1997; **276**: 2027–2030.
- [34] JOHANSSON J, COSSART P. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 280–285.
- [35] JONES S, YU B, BAINTON NJ, BIRDSALL M, BYCROFT BW, CHHABRA SR, COX AJ, GOLBY P, REEVES PJ, STEPHENS S, et al. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* 1993; **12**: 2477–2482.
- [36] JOYCE EA, BASSLER BL, WRIGHT A. Evidence for a signaling system in *Helicobacter pylori*: detection of a luxS-encoded autoinducer. *J Bacteriol* 2000; **182**: 3638–3643.
- [37] KAPLAN HB, GREENBERG EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 1985; **163**: 1210–1214.
- [38] KLEEREBEZEM M, QUADRI LE, KUIPERS OP, DE VOS WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction system in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 1997; **24**: 895–904.
- [39] LAFITI A, FOGLINO M, TANAKA K, WILLIAMS P, LAZDUNSKI A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 1996; **21**: 1137–1146.
- [40] LAZAZZERA BA, SOLOMON JM, GROSSMAN AD. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell* 1997; **89**: 917–925.
- [41] LEADBETTER JR, GREENBERG EP. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* 2000; **182**: 6921–6926.
- [42] LEE MS, MORRISON DA. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol* 1999; **181**: 5004–5016.
- [43] LEWENZA S, CONWAY B, GREENBERG EP, SOKOL PA. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* 1999; **181**: 748–756.

- [44] LINA G, JARRAUD S, JI G, GREENLAND T, PEDRAZA A et al. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 655–662.
- [45] LYON WR, MADDEN JC, STEIN J, CAPARON MG. Mutation of luxS affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 2001; **42**: 145–157.
- [46] LYON GJ, WRIGHT JS, MUIR TW, NOVICK RP. Key determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 2002; **41**: 10095–100104.
- [47] MANFIELD M, DE NYS R, KUMAR N, READ R, GIVSKOV M, STEINBERG P, KJELLEBERG S. Evidence that halogenated furanones for *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 1999; **145**: 283–291.
- [48] MAYVILLE P, JI G, BEAVIS R, YANG H, GOGER M, NOVICK RP, MUIR TW. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1218–1223.
- [49] McNAB R, FORD SK, EL SABAENY A, BARBIERI B, COOC GS, MAMONT RJ. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 2003; **185**: 274–284.
- [50] MIAMOTO CM, BOYLAN M, GRAHAM AF, MEIGHEN EA. Organization of the lux structural genes of *Vibrio harveyi*. Expression under the T7 bacteriophage promoter, mRNA analysis, and nucleotide sequence of the luxD gene. *J Biol Chem* 1988; **263**: 13393–13399.
- [51] MILLER MB, BASSLER BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; **55**: 165–199.
- [52] MORE MI, FINGER LD, STRYKER JL, FUQUA C, EBERHARD A, WINANS SC. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 1996; **272**: 1655–1658.
- [53] MORFELD E, TAYLOR D, VON GABAIN A, ARVIDSON S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 1995; **14**: 4569–4577.
- [54] NOVICK R, ROSS H, PROJAN S, KORNBLUM J, KREISWIRTH B, MOGHAZEH S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993; **12**: 3967–3975.
- [55] NOVICK RP, PROJAN SJ, KORNBLUM J, ROSS HF, JI G et al. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 446–458.
- [56] OTTO M, SUSSMUTH R, VUONG C, JUNG G, GOTZ F. Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives. *FEBS* 1999; **450**: 257–262.
- [57] PARSEK MR, GREENBERG EP. Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Methods Enzymol* 1999; **310**: 43–55.
- [58] PARSEK MR, GREENBERG EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8789–8793.
- [59] PASSADOR L, COOK JM, GAMBELLO MJ, RUST L, IGLEWSKI BH. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 1993; **260**: 1127–1130.
- [60] PEARSON JP, PASSADOR L, IGLEWSKI BH, GREENBERG EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1490–1494.
- [61] PEREGO M, HANSTEIN C, WELSH KM, DJAVAKHISHVILI T, GLASER P, HOCH JA. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *Bacillus subtilis*. *Cell* 1994; **79**: 1047–1055.
- [62] PEREGO M. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8612–8617.
- [63] PESCI EC, PEARSON JP, SEED PC, IGLEWSKI BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 3127–3132.
- [64] PESTOVA EV, HAVARSTEIN LS, MORRISON DA. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* 1996; **21**: 853–862.
- [65] PIERSON LS 3rd, KEPPELNE VD, WOOD DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* 1994; **176**: 3966–3974.
- [66] POZZI G, MASALA L, INNAELI F, MANGANELLI R, HAVARSTEIN LS, et al. Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol* 1996; **178**: 6087–6090.



- [67] REN D, SIMS JJ, WOOD TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ Microbiol* 2001; **3**: 731–736.
- [68] REN D, SIMS JJ, WOOD TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol* 2002; **34**: 293–299.
- [69] SCHAEFER AL, HANZELKA BL, EBERHARD A, GREENBERG EP. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol* 1996; **178**: 2897–2901.
- [70] SCHAUDER S, BASSLER BL. The languages of bacteria. *Genes Dev* 2001; **15**: 1468–1480.
- [71] SCHAUDER S, SHOKAT K, SURETTE MG, BASSLER BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 2001; **41**: 463–476.
- [72] SHADEL GS, YOUNG R, BALDWIN TO. Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol* 1990; **172**: 3980–3987.
- [73] SINGH PK, SCHAEFER AL, PARSEK MR, et al. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; **407**: 762–764.
- [74] SLOCK J, VANRIET D, KOLIBACHUK D, GREENBERG EP. Critical region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. *J Bacteriol* 1990; **172**: 3974–3979.
- [75] SOLOMON JM, MAGNUSON R, SRIVASTAVA A, GROSSMAN AD. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factor in *Bacillus subtilis*. *Genes* 1995; **9**: 547–548.
- [76] SOLOMON JM, LAZAZZERA BA, GROSSMAN AD. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes* 1996; **10**: 2014–2024.
- [77] SPERANDIO V, MELLIES JL, NGUYEN W, SHIN S, KAPER JB. Quorum sensing controls expression of the tape III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 15196–15201.
- [78] SPERANDIO V, TORRES AG, KAPER JB. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 809–821.
- [79] STEVENS AM, GREENBERG EP. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* 1997; **179**: 557–562.
- [80] STEVENS AM, FUJITA N, ISHIHAMA A, GREENBERG EP. Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J Bacteriol* 1999; **181**: 4704–4707.
- [81] SUGA H, SMITH KM. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol* 2003; **7**: 586–591.
- [82] SURETTE MG, BASSLER BL. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1999; **31**: 585–595.
- [83] SURETTE MG, MILLER MB, BASSLER BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1639–1644.
- [84] TAGA ME, SEMMELHACK JL, BASSLER BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2001; **42**: 777–793.
- [85] TAGA ME, BASSLER BL. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **2**: 14549–14554.
- [86] TAGA ME, MILLER ST, BASSLER BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2003; **50**: 1411–1427.
- [87] TAYLOR RF, GAYA H, HODSON ME. *Pseudomonas cepacia*: Pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *Respir Med* 1993; **87**: 187–192.
- [88] TEPLITSKI M, ROBINSON JB, BAUER WD. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activates and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 637–648.
- [89] TURGAY K, HAHN J, BURGHOORN J, DUBNAU D. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* 1998; **17**: 6730–6738.
- [90] VAL DL, CRONAN JE Jr. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol* 1998; **180**: 2644–2651.

- [91] VAN SINDEREN D, LUTTINGER A, KONG L, DUBNAU D, VENEMA G, HAMOEN L. comK encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1995; **15**: 455–462.
- [92] WHITELEY M, LEE KM, GREENBERG EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 13904–13909.
- [93] WHITELEY M, PARSEK MR, GREENBERG EP. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2000; **182**: 4356–4360.
- [94] WINZER K, FALCONER C, GARBER NC, DIGGLE SP, CAMARA M, WILLIAMS P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 2000; **182**: 6401–6411.
- [95] WINZER K, HARDIE KR, WILLIAMS P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 216–222.
- [96] WINZER K, SUN YH, GREEN A, DELORY M, BLACKLEY D, HARDIE KR, BALDWIN TJ, TANG C. The role of *Neisseria meningitidis* luxS in cell-to-cell signaling and bacteremic infection. *Infect Immun* 2002; **70**: 2245–2248.
- [97] XAVIER K, BASSLER BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin* 2003; **6**: 191–197.
- [98] ZHANG L, MURPHY PJ, KERR A, TATE ME. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 1993; **362**: 446–448.
- [99] ZHU J, BEABER JW, MORE MI, FUQUA C, EBERHARD A, WINANS SC. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 5398–5405.
- [100] ZHU J, WINANS S.C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 1507–1512.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 14.01.2005 r.*

*Przyjęto 04.02.2005 r.*

*ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź*