

Received: 2010.12.10
Accepted: 2011.03.04
Published: 2011.03.25

Funkcje białek bakteriofagowych*

The functions of bacteriophage proteins

Ewa Brzozowska¹, Justyna Bazan², Andrzej Gamian^{1,2}

¹ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

² Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Bakteriofagi (fagi) stanowią naturalny czynnik regulujący liczebność populacji bakteryjnych w przyrodzie. Zainteresowanie bakteriofagami ciągle wzrasta ze względu na ich ogromną liczebność w naturalnym środowisku, a tym samym wpływ na funkcjonowanie organizmów żywych oraz zastosowanie w terapii przeciwko patogennym bakteriom opornym na stosowane antybiotyki. Za swoistość i za zjadliwość fagów wobec bakterii odpowiadają białka wchodzące w skład cząstki fagowej. Białkami tymi są adhezyny rozpoznające receptory na komórkach gospodarzy oraz enzymy degradujące określone struktury ściany komórkowej lub otoczki bakterii. Inne białka fagowe pełnią funkcję strukturalną, wchodząc w skład kapsydów. Białka te chronią fagowy kwas nukleinowy oraz umożliwiają przekazanie wirusowego genomu do wnętrza komórki bakteryjnej, a tym samym odpowiadają za proces infekcji i namnażania fagów potomnych. Enzymy fagowe są ważną grupą białek, które degradują struktury ścian i otoczek bakteryjnych od zewnętrznej, a także od wewnętrznej strony komórki gospodarza. Są to enzymy lityczne hydrolizujące komponenty cukrowe oraz białkowe. Bliższe poznanie natury bakteriofagów oraz pojawienie się lekooporności wśród patogennych bakterii, spowodowało wzrost zainteresowania fagami, jako czynnikami leczniczymi. Bakteriofagi coraz częściej wykorzystywane są także w innych dziedzinach życia człowieka. Testowano je nie tylko w terapii roślin, zwierząt i ludzi, ale także zapropowano ich użycie do odkażania żywności i środowiska.

Słowa kluczowe:

bakteriofagi • fagi • białka fagowe • adhezyny fagowe • enzymy fagowe • kapsyd

Summary

Bacteriophages (phages) are viruses specific towards bacterial strains and are natural regulators of bacterial populations in nature. Interest in the therapeutic use of phages is growing due to the emergence of antibiotic resistant pathogens. Bacteriophage proteins are responsible for phage specificity and virulence. These proteins are i) adhesins, capable of recognizing specific receptors on the bacterial surface, ii) enzymes responsible for destroying bacterial cell wall components or bacterial slime, and iii) structural proteins making up the phage capsid. Bacteriophage enzymes destroy the bacterial cell wall from both outside and inside by hydrolyzing carbohydrates and protein components. All these proteins protect phage genetic material, secure injection of the phage nucleic acid into the bacterial cell, and promote phage propagation. Our better understanding of how bacterial viruses function may help to combat antibiotic resistant human pathogens and expand the use of bacteriophages to animal and plant care. Other applications may include food processing and environmental protection.

Key words:

Bacteriophage • phage • phage proteins • phage adhesins • phage enzymes • capsid

* Badania były finansowane ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne – BioMed” (POIG 01.01.02-02-003/08-00) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Działanie 1.1.2.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=936090>**Word count:** 3735**Tables:** 1**Figures:** 4**References:** 82**Adres autorki:** dr Ewa Brzozowska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: ezuziak@iitd.pan.wroc.pl

1. WSTĘP

Bakteriofagi stanowią najbardziej zróżnicowaną i prawdopodobnie najliczniejszą grupę wirusów. Liczba poznanych bakteriofagów co roku powiększa się o około stu nowych przedstawicieli [1]. Po raz pierwszy bakteriofagi odkryto na początku dwudziestego stulecia. Wtedy to Ernest Hankin zauważył, że woda z rzek Gangesu i Jumny ma właściwości antybakteryjne, które znikają po jej przegotowaniu. Po zbadaniu wpływu wody na *Vibrio cholerae* Hankin stwierdził, że substancje w niej zawarte zapobiegają rozprzestrzenianiu się epidemii cholery wśród ludzi pijących wodę z Gangesu i Jumny [39]. Wirusy te mogą być skuteczne w bardzo specyficznym leczeniu infekcji bakteryjnych, stanowiąc swoistą alternatywę dla antybiotyków [34,35,53,54,74] oraz mogą być stosowane do leczenia zakażeń antybiotykoodpornymi szczepami bakterii [8]. Bakteriofagi mają zastosowanie w przemyśle spożywczym, a także jako środki ochrony roślin i zwierząt przed infekcjami bakteryjnymi [5,72]. Dzięki nowoczesnym metodom badawczym odkryto, że wiele toksyn wytwarzanych przez patogenne bakterie jest kodowanych w genomach fagowych [22]. Liczba fagów na całej Ziemi szacuje się na około 10^{31} cząstek. Są one prawdopodobnie najbardziej zróżnicowaną grupą wirusów zawierającą 10^8 różnych genotypów [70]. Przykładem różnorodności fagów mogą być wirusy pałeczek *Klebsiella*, które różnią się wrażliwością na zmiany termiczne i morfologią łysinek [61]. Nie wykazano korelacji między właściwościami serologicznymi, a zakresem litycznym tych bakteriofagów [63]. Bakteriofagi wykryto wszędzie tam, gdzie obecne są bakterie. Licznie występują zarówno w wodach słodkich jak i oceanach [16]. Szacuje się, że w środowisku wodnym bakteriofagi są obecne w liczbie 10^4 – 10^8 cząstek w 1 ml. W wodach słodkich jest ich od $0,65 \cdot 10^9$ /g do $3 \cdot 10^9$ /g. W glebie liczbę bakteriofagów szacuje się do $2,7 \cdot 10^8$ cząstek na gram. Na jedną komórkę bakteryjną może przypadać do stu cząstek fagowych [21], a stosunek ten zmienia się w zależności od środowiska. Na wzrost i przetrwanie cząstek fagowych w środowisku wpływa wiele czynników, głównie temperatura, pH oraz obecność komórek gospodarza [2].

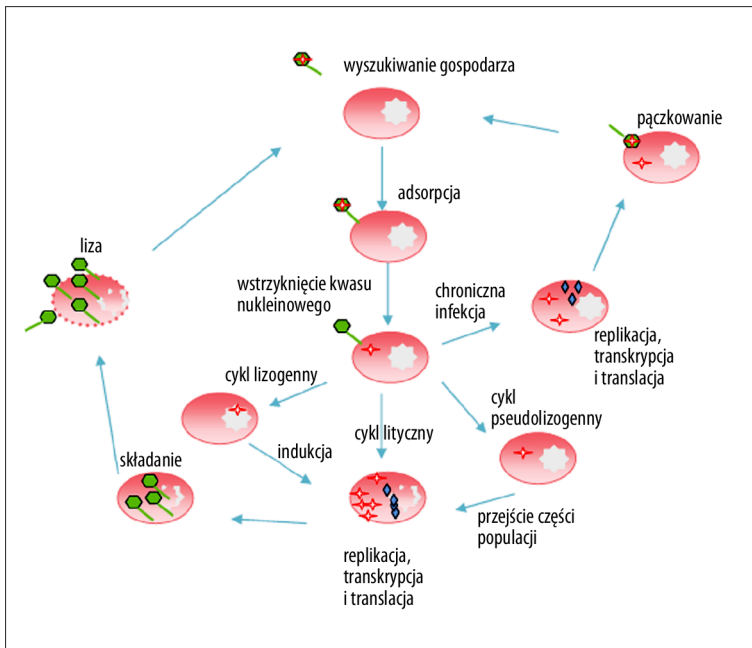
Bakteriofagi będące pasożytami bakterii mogą się namnażać wyłącznie w żywych i wrażliwych na danego faga bakteriach. Początkowo cząstki fagowe wiążą się do specjalnych receptorów na komórce bakteryjnej, po czym następuje proces wnikięcia genomu fagowego do wnętrza komórki gospodarza. Od chwili adsorpcji bakteriofaga do komórki bakteryjnej rozpoczyna się okres latencji, który trwa aż do lizy komórki. Czas latencji jest zróżnicowany, zależy od rodzaju faga i szczepu bakterii oraz warunków środowiskowych. Podobnie jest z liczbą uwalnianych bakteriofagów, określaną jako wielkość wyrzutu (burst size), po okresie

ich namnożenia. Okres, w którym wytworzone są kopie wegetatywnych bakteriofagów określa się mianem eklipsy. W tym okresie następuje wiele procesów, które wpływają na ostateczny kształt potomnych fagów [2]. W okresie eklipsy nowo powstałe cząstki faga wymieniają swój materiał genetyczny. U wielu fagów liniowy DNA wnika do komórki gospodarza ma kohezyjne końce, składające się z krótkich sekwencji zasad komplementarnych. Łączenie się zasad w pary na tych końcach przekształca liniowy DNA w postać kolistą. Koło zostaje zamknięte przez połączenie przerw w pojedynczych niciach z udziałem ligazy [26]. Na początku zostaje zahamowana synteza bakteryjnego DNA, RNA i białek, a rozpoczyna się synteza DNA fagowego [68]. Powstaje także wiele nowych białek, zwanych „białkami wczesnymi”. Należą do nich m.in. enzymy konieczne do syntezy DNA bakteriofagowego: polimeraza DNA (EC 2.7.7.7), kinaza niezbędna do wytworzenia trifosforanów nukleotydów (EC 3.6.1.15) oraz syntetaza tymidylanowa (EC 2.1.1.45). W przypadku niektórych bakteriofagów T potrzebne są również enzymy wykorzystywane do syntezy hydroksymetylocytozyny oraz enzymy niszczące deoksytydylotrifosforan gospodarza [2]. W fazie pośredniej następuje synteza białek kapsydu i dodatkowych struktur białkowych wirusów, natomiast w fazie późnej tworzone są nowe wirusy przez łączenie kapsydu z kwasami nukleinowymi, a także z elementami białkowymi [38]. Bakteriofagi mogą wykazywać także inne cykle rozwojowe: lityczny, lizogenny, pseudolizogenny oraz cykl przewlekłej infekcji [80]. Cykl lizogenny polega na zespoleniu genomu fagowego z genomem gospodarza i tym samym wprowadza faga w stan uśpienia. Postać taka określana jest mianem profaga, a fagi inicjujące proces lizogenii określa się mianem fagów łagodnych, umiarkowanych, utemperowanych (temperate phages). Infekcja przewlekła charakteryzuje się tym, że potomne cząstki fagowe są wytwarzane przez zainfekowane komórki bakteryjne w równych odstępach czasowych i wydzielane do środowiska w pęcherzykach. Podczas tego procesu nie zachodzi liza komórki bakteryjnej. Wyróżniono też stan zakażenia trwałego (persistent infection) określanego także jako stan pseudolizogenny (ryc. 1) [68].

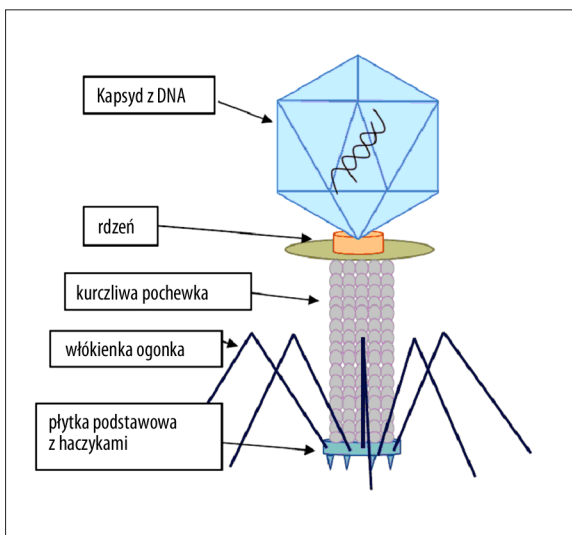
Cząstki fagowe zbudowane są głównie z białek i kwasów nukleinowych. Fag T2 zawiera także około 2% lipidów, a bakteriofag PM2 z rodziny *Corticoviridae* zawiera nawet do 14% lipidów w swojej cząstce [33]. Białka są budulcem głównych komponentów strukturalnych cząstek fagowych, uczestniczą w procesach adhezji do komórek bakteryjnych oraz mają aktywność enzymatyczną.

2. BIAŁKA STRUKTURALNE

Bakteriofagi filamentowe poza kapsydem, wewnątrz którego znajduje się kwas nukleinowy, mają także ogonki



Ryc. 1. Cykle rozwojowe bakteriofagów (na podstawie [22] zmodyfikowano)

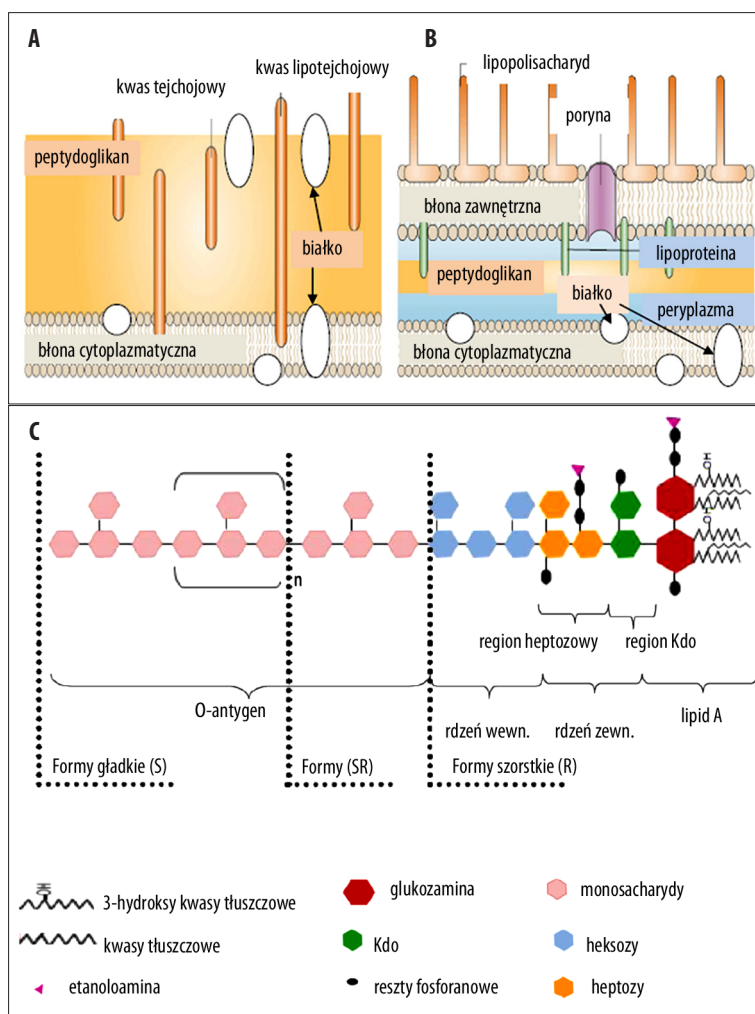


Ryc. 2. Budowa bakteriofaga T4 (na podstawie [24] zmodyfikowano)

i włókienka [48,56,75]. Większość fagów przypomina wyglądem kijanki z długimi ogonkami przyłączonymi do sferycznej, cylindrycznej lub polihedralnej główki. Znane są także bakteriofagi bez ogonków o kształcie kulistym lub o kształcie wielościanu z bardzo małym ogonkiem. Główka, rdzeń, pochewka i włókna ogonka faga zbudowane są z białek. Dzięki rozwojowi technik badawczych poznano obecnie wiele struktur przestrzennych bakteriofagów oraz ich komponentów strukturalnych. Bardzo złożoną strukturą przestrzenną charakteryzuje się fag T4. Jest on zbudowany z ponad 40 różnych białek (ryc. 4), wśród których można wyróżnić białka główki chroniące materiał genetyczny, ponadto białka ogonka i białka włókienek przytwierdzonych do ogonka (ryc. 2).

Izometryczna główka bakteriofaga T4 składa się ze 120 heksamerów białka określanego jako gp23 (gene product

23) i 11 pentamerów białka gp24, które nadają osłonce DNA grubość 30 Å. Ogólnie główka bakteriofaga T4 zawiera około 12 rodzajów białek, które tworzą w sumie ponad 3000 łańcuchów polipeptydowych. Na uwagę zasługują regiony gpHoc (highly antigenic outer capsid protein) i gpSoc (small outer capsid protein). GpSoc tworzy białkową siatkę na powierzchni powłoki, która również zawiera heksamery białek gp23. Ze względu na wiązanie dwóch podjednostek gp23 przez gpSoc, białko to spełnia rolę stabilizującą strukturę główki w ekstremalnych warunkach środowiska [44]. GpHoc jest białkiem wystającym około 50 Å ponad powierzchnię główki bakteriofagów, może być umiejscowione wewnątrz każdego heksameru gp23. Funkcja gpHoc nie została poznana. Jednak badania przeprowadzone na fagu T4 i jego mutancie pozbawionym białek gpHoc – HAP1 – są dowodem istnienia znacznych różnic w ich aktywności. Fag HAP1 w porównaniu z T4, przejawia mniejszą aktywność w oddziaływaniach z płytkami krwi i komórkami T, natomiast wykazuje większą aktywność przeciwnowotworową [14]. Ogonek faga T4 zbudowany jest z białek kodowanych przez 22 geny i składa się z dwóch współśrodkowych cylindrów, zakończonych u dołu płytką podstawową z włóknkami. Wewnętrzny białkowy kanał ogonka jest złożony ze 144 kopii białka gp19 i bierze udział w przekazywaniu DNA z główki faga do zainfekowanej komórki bakteryjnej. Zewnętrzny cylinder ogonka ciasno otacza cylinder wewnętrzny, osiągając średnicę 210 Å i zbudowany jest ze 144 kopii białka gp18. Podjednostki obu cylindrów tworzą prawoskrętną helisę o kącie skręcenia równym 17° [44]. Ogonek przytwierdzony jest do główki za pośrednictwem szyjki zbudowanej z heksamerowych pierścieni, utworzonych z białek gp3, gp13, gp14, gp15. Od góry szyjka ograniczona jest kołnierzem z wąsami. Głównym ich składnikiem jest fibrylina [10,36]. Płytkę podstawową obejmuje około 130 podjednostek białkowych stanowiących produkty 14 genów. Podczas adsorpcji płytka podstawowa przybiera kształt sześcioramiennego gwiazdy. Na środku płytki podstawowej faga umieszczony jest szpic zbudowany z białek gp5, gp27 i gp29 [44]. Białko



Ryc. 3. Struktura warstw zewnętrznych **(A)** bakterii Gram-dodatnich i **(B)** Gram-ujemnych w oparciu o [11] oraz **(C)** schemat budowy LPS u różnych bakterii Gram-ujemnych, na podstawie [45]

gp27 stanowi element dopasowujący sześć obwodowych białkowych klinów z centralnie położonym węzłem. Białko gp5, jako jedyne jest aktywne enzymatycznie. Odpowiada za zniszczenie peptydoglikanu komórki bakteryjnej [66]. Bakteriofag T4 ma trzy rodzaje białkowych włókienek: długie (LTF), krótkie (STF) i wąsy. Długie włókienka ogonka pełnią rolę czujników oraz są niezbędne przy adsorpcji faga na komórce bakteryjnej. Włókienka te z płytka podstawową połączone są za pomocą białek gp9 i gp7 osiągając długość 1450 Å [49]. Białka włókienka LTF są homotrimerami, a wyjątek stanowi białko gp35, które jest monomerem. Każde włókienko zbudowane jest z 2 części: bliższej – kodowanej przez gen 34 i dalszej – kodowanej przez geny 36 i 37. Obie części połączone są ze sobą przez białko gp35, które łączy się z białkiem gp34 należącym do części bliższej i białkiem gp36 części dalszej. Koniec C białka gp37 wiąże się z bakteryjnym lipopolisacharydem występującym na zewnętrznej powierzchni komórki [49]. Włókienka ogonka mogą przybierać dwa stany – „górny”, wtedy ustawione są wzdłuż powłoki ogonka, oraz „dolny”, kiedy są luźno opuszczone („up” i „out”). Pozycja włókienek jest określona przez warunki otaczającego środowiska, tj. temperaturę i pH [36]. Ciekawe obserwacje dotyczące zmian w metabolizmie szczepu *Escherichia coli* B, po infekcji niekompletnym fagiem T2 opisał Lehman i wsp. Fag T2 pozbawiony był kwasu nukleinowego, zaś komponenty

białkowe były nienaruszone. Okazało się, że w wyniku infekcji dochodziło do zahamowania syntezy bakteryjnego kwasu nukleinowego i początkowo proces zakażenia zachodził analogicznie, jak w przypadku faga kompletnego [42]. Obserwacja ta wskazuje na istotność składników białkowych części fagowych. Inne badania dotyczące białek fagowych pozwoliły na wskazanie różnic oraz podobieństw w obrębie białek fagowych i w obrębie białek wszystkich znanych wirusów. Przykładem może być odkrycie podobieństwa między białkami kapsydu bakteriofaga PRD1, a białkami ludzkiego adenowirusa, co sugeruje ich ewolucyjne spokrewnienie [6,67].

3. ADHEZYNY

Bakteriofagi wykazują swoistość wobec bakterii, rozpoznając różnego rodzaju cząsteczki obecne na komórce gospodarza. Może to być lipopolisacharyd (LPS), odpowiednie białko, cząsteczki cukrowe, a także fimbrie [4,20,52,57,60,71].

LPS (ryc. 3) jest składnikiem zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych. Jest to heteropolimer, składający się z trzech podstawowych części, mających określone funkcje biologiczne: lipidu A, oligosacharydowego rdzenia, antygeny O-swoistego. Połączone ze sobą kowalencyjnie te trzy części tworzą LPS typu S (smooth). Postać R

(rough) LPS pozbawiona jest najbardziej zmiennej części O-swoistej, która jest zarazem najbardziej zewnętrzną częścią. Antygen O-swoisty jest homo- lub heteropolimerem składającym się z powtarzających się podjednostek oligosacharydowych, z których każda zawiera do ośmiu reszt monocukrowych (najczęściej są to rzadko spotykane cukry). Wspomniane podjednostki wykazują zróżnicowanie pod względem składu chemicznego, kolejności ułożenia cukrów, typu wiązań, rodzaju odgałęzień bocznych oraz zawartości np. kwasu sjałowego lub niecukrowych podstawników, takich jak: aminokwasy, fosforany, rybitol, glicerol. Cukry obecne w łańcuchu O-swoistym nadają mu charakter obojętny, kwaśny lub zasadowy [76]. W części rdzeniowej LPS wyróżnia się region zewnętrzny i wewnętrzny, do którego przyłączony jest lipid A. Lipid A jest elementem bardzo konserwatywnym, podobnie jak kwas 2-keto-3-deoksyoctulozonowy (Kdo) części rdzeniowej i pod względem budowy jest identyczny u większości bakterii Gram-ujemnych. Zarówno lipid A, jak i wewnętrzny region rdzenia są ufosforylowane [73].

Do połączenia bakteriofaga T4 z komórką *E. coli* B dochodzi przez LPS obecny na jej powierzchni zewnętrznej, który jest swoiście rozpoznawany przez faga, a konkretnie przez niektóre jego białka [44]. Za pierwszy etap adsorpcji faga T4 do komórki gospodarza odpowiedzialne jest białko gp37, rozpoznające resztę glukozy w rdzeniu lipopolisacharydowym [3]. Inny fag – Φ X174 – łączy się z LPS z udziałem białka G, znajdującego się na ogonku [32]. Kolejnymi przykładami mogą być białka pb5 fagów T5 i BF23 oraz białko P2 faga PRD1, których regiony wiążące bakteryjne receptory zostały dobrze poznane [25,51]. Fagi c2, ml3 i sk1, zakażające szczepy *Lactococcus lactis*, rozpoznają białko błonowe bakterii o masie 99 kDa. Mutanty bakteryjne pozbawione zdolności syntezy tego białka, stawały się odporne na infekcję wspomnianymi bakteriofagami [37]. Lindberg wyodrębnił cztery różne modele adsorpcji fagów do bakterii: adsorpcja małych fagów typu Φ X174 do postaci LPS szorstkiej u enterobakterii, adsorpcja fagów do otoczki egzopolisacharydowej u bakterii otoczkowych, adsorpcja fagów do części O-swoistej LPS enterobakterii lub do kwasu teichojowego u bakterii Gram-dodatnich, adsorpcja dużych fagów typu T4 do szorstkiej postaci LPS u enterobakterii [73]. Szersze zestawienie bakteriofagów i ich receptorów podano w tabeli 1.

Zakażenie bakteriofagiem komórki bakteryjnej mającej otoczkę jest uwarunkowane rozbiciem warstwy wielocukru otoczkowego i to zarówno wtedy, gdy jest to dla faga swoisty receptor, jak i gdy swoisty receptor umiejscowiony jest głębiej, w ścianie komórkowej. Bakteriofagi wiążą się z wielocukrowymi otoczkami *Klebsiella* na zasadzie reakcji enzym-substrat. Istnieje enzym degradujący otoczkę komórkową podczas zakażenia bakteriofagiem. Enzym ten dyfunduje do podłoża, pozbawia otoczek komórki rosnące wokół łyśinek i pojawia się strefa przejaśnienia zwana strefą „halo”. Strefa ta nie musi się pojawiać w niektórych przypadkach infekcji komórek otoczkowych przez bakteriofagi zdolne do niszczenia otoczek [59].

Zanim fag będzie mógł się zaadsorbować na powierzchni komórki bakteryjnej, jej powierzchnia musi ulec modyfikacji. Polega to na przyłączeniu kationów, a w niektórych przypadkach tryptofanu lub innych kofaktorów, takich jak:

fenyloalaniny, tyrozyny lub dijudotyrozyny. Niektóre czynniki, takie jak 2-pirydyloalanina i 3-pirydyloalanina ułatwiają adsorpcję wirusa na bakterii. Jeżeli jednak znajdują się w podłożu w czasie namnażania wirusa, hamują tworzenie łyśinek. Stają się więc czynnikiem antywirusowym. Wykazano, że obecność elektrolitów w podłożu hodowlanym nie tylko wspomaga adsorpcję cząstek fagowych do bakterii, ale również wpływa na skuteczne zakażenie komórki gospodarza [28]. Obecność jonów wapnia, magnezu, baru może z kolei hamować działanie niektórych fagów, natomiast w pewnych przypadkach jony wapnia wydają się czynnikiem niezbędnym do adsorpcji wirusa [82]. Brak elektrolitów może spowodować adsorpcję odwracalną bez zakażenia bakterii fagiem. Niskocząsteczkowe związki organiczne przyłączają się do cząstek fagowych powodując ich aktywację. Wykazano np., że do aktywacji bakteriofaga T4 potrzeba sześć cząsteczek tryptofanu. Indol natomiast hamuje adsorpcję bakteriofaga do komórki bakteryjnej. Prawdopodobnie związki organiczne wpływają na zmianę konformacji miejsc odpowiedzialnych za wiązanie się z komórką bakteryjną przez co ułatwiają, albo też uniemożliwiają zajście procesu adsorpcji. Nieodwracalne połączenie faga z komórką gospodarza poprzedza faza połączenia odwracalnego. Stwierdzono, że za pierwszy kontakt bakteriofaga z gospodarzem odpowiadają oddziaływania elektrostatyczne. Głównymi grupami funkcyjnymi biorącymi udział w oddziaływaniach elektrostatycznych są grupy hydroksylowe i aminowe [2,28,82].

Jeden z ciekawszych mechanizmów adsorpcji występuje u fagów filamentowych – fd, zakażających bakterie *E. coli*. Łączą się one z rzęską F komórki poprzez białko g3p, po czym białko fagowe przechodzi przez zewnętrzną błonę komórkową bakterii i łączy się z innym białkiem bakteryjnym – TolQRA – obecnym w przestrzeni peryplazmatycznej [64]. TolQRA jest kompleksem trzech białek, z których TolA jako pierwsze łączy się z białkiem faga g3p i dzięki temu formowany jest otwór, umożliwiający penetrację fagowego DNA [28].

Niektóre bakterie mają zdolność wytwarzania egzopolisacharydowych otoczek zewnętrznych, które wówczas chronią komórkę przed zakażeniem przez faga. Przykładem może być szczep *Rhizobium meliloti* M11S, którego otoczka chroni bakterię przed adsorpcją faga NM8 [15].

Prowadzono także badania nad powinowactwem bakteriofagów do innych komórek niż bakteryjne. Okazało się, że bakteriofagi T2 mają zdolność wiązania się do leukocytów końskich oraz leukocytów świnek morskich zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [27,30], a także do komórek nowotworowych myszy [29]. Z innych badań natomiast wiadomo, że przeciwciała uzyskane przeciwko bakteryjnemu kwasowi polisjałowemu w równym stopniu rozpoznają kwas polisjałowy ludzkich komórek nerwowych. Na tej podstawie można wnioskować, że bakteriofagi, dla których receptorem jest właśnie kwas α -2,8-polisjałowy, będą mogły rozpoznawać ten sam receptor na komórkach ośrodkowego układu nerwowego u człowieka [77].

4. ENZYMY

Bakteriofagi zawierają enzymy uczestniczące w degradacji ścian i otoczek komórek bakteryjnych. Są to enzymy

Tabela 1. Receptory bakteryjne fagów (na podstawie [78])

Bakteria	Bakteriofag	Receptor faga	Funkcja receptora w komórce
<i>Escherichia coli</i>	M13, fl, fd	koniec pilusa, koreceptor TolA	koniugacja, przyłączenie do gospodarza, integralność błony zewnętrznej
	MS2, QB	bok pilusa	koniugacja, przyłączenie do gospodarza
	ΦX174, T7	LPS	ochrona i toksyczność
	T4, AR1	główny receptor LPS, drugorzędny OmpC	ochrona i toksyczność, przepuszczalność dla małych cząsteczek
	T-podobne	OmpA	integralność błony zewnętrznej, koniugacja
	TLS	główny receptor LPS, drugorzędny TolC	ochrona i toksyczność, usuwanie małych cząsteczek
	T5	główny receptor LPS, drugorzędny FhuA	ochrona i toksyczność, transport ferrichromu
	K20	główny receptor LPS, drugorzędny OmpF	ochrona i toksyczność, przepuszczalność dla małych cząsteczek
	T1	FhuA/TonB	transport ferrichromu
	λ	LamB/ManY	element systemu transportującego maltozę
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PRD1	białka systemu otoczki Mpf	koniugacja
<i>Pseudomonas syringae</i>	Φ6	bok pilusa	koniugacja, przyłączenie do gospodarza
	Φ13	LPS	
<i>Salmonella thyphi</i>	Gifsy-1, Gifsy-2	OmpC	przepuszczalność dla małych cząsteczek
<i>Vibrio cholerae</i>	496	pilus	koniugacja, przyłączenie do gospodarza
<i>Xanthomonas campestris</i>	ΦL7	LPS/TonB-ExbB-ExbD1	ochrona i toksyczność, patogenność, asymilacja żelaza
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	16-3	RkpM	biosynteza antygeny polisacharydu KR5, infekcja roślin
<i>Listeria monocytogenes</i>	A118	N-glukozamina, reszty ramnozowe kwasu tejchojowego	właściwości jonowe ściany, autoliza
<i>Lactococcus lactis</i>	bIL67, Φ645	prawdopodobnie EPS	nieznane
	c2	receptor główny reszty ramnozy, drugorzędny Pip	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	LL-H	Kwasy lipotejchowe	patogenność, adhezja, właściwości hydrofobowe ściany
<i>Bacillus anthracis</i>	γ	GamR	prawdopodobnie zaangażowane w transport kobaltu
<i>Bacillus subtilis</i>	Φ29, Φ25	glikozylowane kwasy tejchowe, PGP	właściwości jonowe ściany, autoliza
	SPP1	YueB	
	Φ3T	kwas tejchowy, GTA	

lityczne hydrolizujące komponenty cukrowe oraz białkowe peptydoglikanu i działają zarówno od strony zewnętrznej, jak i wewnętrznej komórki gospodarza [18]. Dzięki tym właściwościom bakteriofagi wzbudzają powszechne zainteresowanie jako czynniki lecznicze [34,35,53,54,74], a także coraz częściej do usuwania drobnoustrojów w przemyśle spożywczym [5,13,72].

Bakteriofagi degradują struktury komórkowe gospodarza za pomocą specjalnych enzymów, aby wprowadzić swój materiał genetyczny. Po namnożeniu się faga dochodzi do lizy komórki i uwolnienia nowo powstałych cząstek fagowych. W procesie lizy komórkowej również uczestniczą specjalne enzymy, degradujące błonę komórkową od wewnątrz. Fagi zakażające szczepy *E. coli* K1 mają enzymy,

które niszczą otoczkę polisacharydową zbudowaną z kwasu polisialowego (PSA), określanego jako kwas kolominowy. Jest to polimer kwasu α -2,8-N-acetylneuraminowego, który może być O-acetylowany [31,41,47]. Wyodrębniono kilka bakteriofagów zdolnych do zakażenia bakterii z otoczką PSA. Fagi te mają enzymy o aktywności endosyalidaz (EC 3.2.1.129), katalizujących reakcje cięcia polimeru. Wykazano także, że substraty tych enzymów nie mogą zawierać mniej niż 5 reszt kwasu sialowego [31]. Jednymi z bakteriofagów mających enzym o aktywności endosyalidazy są fagi Φ K1E oraz PK1A. Prawdopodobnie enzym odpowiedzialny za degradację bakteryjnego polisacharydu otoczkowego jest umiejscowiony na filamencie fagowym. Inny bakteriofag Φ K5 zakaża bakterie *E. coli* mające w swej otoczce polimer zbudowany z jednostek α -N-acetyloglukozaminy i kwasu β -glukuronowego (antygen K5). Dzięki obecności enzymu degradującego antygen K5, bakteriofag rozpoznaje swoiście daną bakterię. Znanych jest także wiele innych bakteriofagów rozpoznających swoiście inne antygeny sjalowe: K3, K7, K12, K13, K20. Wyizolowano także bakteriofaga Φ K1-5, który zdolny był do rozpoznawania i namnażania się w dwóch szczepach *E. coli* K1 i K5. Bakteriofag ten miał dwa rodzaje enzymów degradujących dwa różne polimery kwasu sialowego [69,71]. Dotąd poznane endosyalidazy fagowe odznaczają się wysoce konserwatywną domeną katalityczną oraz charakterystyczną domeną C-kończową, uczestniczącą w procesie fałdowania. Domena ta jest odcinana po utworzeniu się holoenzymu [43].

Badania enzymów aktywnych w czasie infekcji fagiem pałeczek *Klebsiella* wykazały istnienie hydrolazy degradującej zarówno wiązania glukozylu-fukozowe, jak i glukozylu-mannozowe, obecne w polisacharydach otoczek komórkowych. Stwierdzono, że enzym ten to β -D-glukozydaza (EC 3.2.1.21). Inne poznane enzymy to endogalaktozydazy hydrolizujące wiązanie β -Gal(1-3)Gal (EC 3.2.1.145), występujące w polisacharydach typu K8 *Klebsiella aerogenes*. Wykryto także inne glikanazy, a najlepiej poznany enzymem był enzym faga 11 o aktywności endoglukozydazy hydrolizującej wiązanie β -Glc(1-3)GlcA (EC 3.2.1.39). Enzym ten miał także aktywność endogalaktozydazy i uczestniczył w hydrolizowaniu wiązania Gal(1-3)Glc. Kolejne poznane depolimerazy to galaktozydaza faga 328 B, aktywna wobec wielocukru K20 i glikozydaza faga XI (K24), hydrolizująca wielocukier K24. Obie depolimerazy były aktywne wobec wielu szczepów, mających takie same wielocukry otoczkowe. W przypadku galaktozydazy faga 328 B stwierdzono, że hydrolizuje ona wielocukry K18 i K30. Innym fagiem pałeczek *Klebsiella* o aktywności enzymatycznej typu glikanazowego okazał się fag 13, depolimeryzujący wielocukier K13 przez hydrolizę wiązania β -D-glukopiranozylo-D-mannopiranozowego. Prawdopodobnie aktywność enzymatyczna tych fagów zawarta jest w kolcach płytki podstawowej. Dalsze depolimerazy, swoiste dla wielocukrów otoczkowych pałeczek *Klebsiella*, wykryto w bakteriofagach Φ izolowanych ze ścieków. Degradowały one wielocukry otoczkowe K17, K23, K36, K46, K60, K63, K74. Wielocukry te różniły się składem, strukturą i stopniem polimeryzacji, degradowane były jednak do oligosacharydów w podobny i swoisty sposób. Swoistość działania fagowych enzymów degradujących otoczki bakteryjne związanych z fagami decyduje o ich otoczkowej swoistości i zakresie litycznym. Podobieństwo

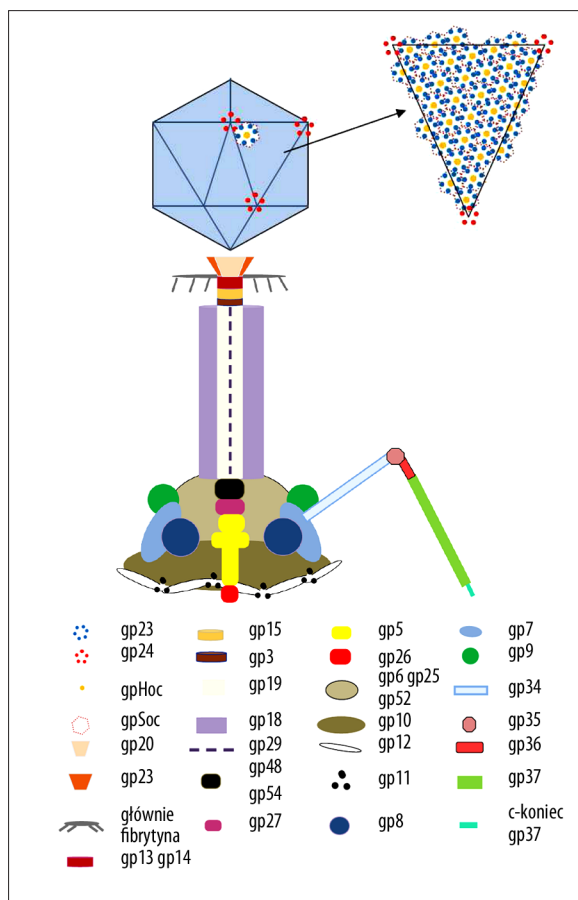
struktur wielocukrów zewnątrzkomórkowych bakterii może tłumaczyć aktywność określonego faga w stosunku do szczepów o różnych antygenach K. Trudniej jest wyjaśnić brak aktywności tego samego faga w stosunku do szczepów o identycznych antygenach otoczkowych [62].

Podczas lizy komórkowej dzięki specjalnym hydrolazom dochodzi do strawienia mureiny (EC 3.5.1.28). Inna grupa enzymów degraduje błonę komórkową, przez którą wydostaje się zawartość komórki na zewnątrz wraz z namnożonymi wirusami [81]. Endolizyny są to enzymy fagowe, wytwarzane w końcowej fazie namnażania wirusa w komórce bakteryjnej. Uczestniczą one w degradacji ściany komórkowej, dzięki czemu dochodzi do uwolnienia cząstek fagowych [17]. Endolizyny syntetyzowane są w postaci nieaktywnej, jako prekursorzy enzymów (preendolizyny). Bliższe badania pozwoliły podzielić endolizyny na pięć klas: N-acetylomuraminidazy (lizozym) (EC 3.2.1.17), endo- β -N-acetyloglukozaminidazy (EC 3.2.1.96), lityczne transglikozylazy (wszystkie wymienione enzymy odcinają resztę cukrową peptydoglikanu), endopeptydazy – odcinające jednostki peptydowe, amidazy N-acetylomuramyl-L-alaninowe (EC 3.5.1.28), które przecinają wiązanie amidowe między L-alaniną, a resztą N-acetylomuramylową. Warto dodać, że wszystkie endolizyny, z wyjątkiem transglikozylazy, są hydrolazami. Większość endolizyn wykazuje tylko jeden rodzaj aktywności, np. muramidazową lub endopeptydazową. Rzadko endolizyny są dwufunkcyjne, chociaż i takie udało się wykryć u bakteriofagów: B30, Φ 11, NCTC11237, Φ WMY, dla których gospodarzami są odpowiednio: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *S. warneri* [9].

Wynika z tego, że endolizyny stanowią grupę enzymów, które nie należą do tego samego typu, toteż proces lizy komórki bakteryjnej spowodowany zakażeniem fagami może być odmienny u różnych bakterii [81]. W przypadku fagów T4 i λ do wystąpienia lizy komórkowej niezbędne są białka nazywane holinami. Są to niskocząsteczkowe białka błonowe, które kontrolują aktywność endolizyn. Synteza holin następuje w końcowej fazie tworzenia wirionów. Białka te degradują błonę cytoplazmatyczną, co pozwala cytosolowym endolizynom na trawienie kolejnych składników komórkowych [55,79]. Holiny stanowią bardzo różnorodną grupę, ale bazując na topologii odcinka błonowego, podzielono je na trzy grupy. W przypadku faga P1 lub faga 21 lizozym (endolizyna) jest transportowany do przestrzeni peryplazmatycznej przez specjalny, bakteryjny system sekrecyjny – sec, przez co nie jest wymagana obecność holin [55].

5. GENOMY FAGOWE

W celu określenia rodzaju i funkcji białek bakteriofagów stosuje się także analizy sekwencji DNA genomów fagowych. Znane są genomy bakteriofagów kodujące około 200 i więcej białek, ale i takie, które mają tylko 3 geny [26]. Przykładem może być analiza genomu bakteriofaga Φ KZ, u którego stwierdzono występowanie 306 otwartych ramek odczytu (open reading frame – ORF) [50]. Dalsza analiza kodujących sekwencji wykazała homologię do 59 znanych białek różnych organizmów, m.in.: reduktazy dihydrofolanowej (EC 1.5.1.3), reduktazy difosforanowej (EC 1.17.4.1), syntazy tymidylanowej (EC 2.1.1.45), (EC 2.1.1.148), kinazy



Ryc. 4. Schemat budowy bakteriofaga T4 z uwzględnieniem rozmieszczenia białek (na podstawie [44,49] zmodyfikowano)

tymidylanowej (EC 2.7.4.9), deaminazy deoksycytidynotrifosforanowej (EC 3.5.4.13). Ponadto piętnaście produktów białkowych wykazywało homologię do białek organizmów patogennych włączając *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria*, *Rickettsia prowazekii* i *Vibrio cholerae*. Spośród białek kodowanych przez faga ϕ KZ, jedenaście wykazywało podobieństwo sekwencyjne do białek innych fagów zakażających szczepy *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces* [49]. W przypadku bakteriofaga T1 analiza sekwencji nukleotydowych w genomie tego wirusa wykazała brak pokrewieństwa z innymi fagami T. Fag ten kodował nieznane dotąd białka, uczestniczące w syntezie kapsydu [65]. Kolifagi DNA mają także białka odpowiedzialne za końcowy etap formowania potomnych wirionów, są to białka określane jako terminazy [59]. Podobne badania wykonano dla bakteriofagów zakażających szczepy *Staphylococcus aureus* i *Mycobacterium tuberculosis* [40]. W obrębie pierwszej grupy fagów stwierdzono ogromną różnorodność proteomów i wykazano

obecność 55% zupełnie nieznanymi ORF. Podobne rezultaty uzyskano dla fagów *Mycobacterium*, dla których 50–75% ORF nie wykazywało homologii do opisanych w bazie GenBank. Genom faga T4 koduje około 290 białek, 8 tRNA, a także stabilne RNA o nieznanym dotąd funkcji. Niektóre genomy bakteriofagów RNA zostały poznane, np. MS2 ma genom o długości 3569 nukleotydów i zawiera 4 geny [58]. Trudniej jest określić, jakie białka kodują fagowe geny nakładające się na siebie. Jest tak w przypadku faga Φ X174, atakującego *E. coli* R1. Nakładanie się genów rozwiązuje problem małej ilości DNA kodującego, pozwalając na bardziej efektywne wykorzystanie informacji genetycznej, ale jednocześnie stwarza niebezpieczeństwo, że jedna mutacja może wpłynąć na dwa geny [23].

6. PODSUMOWANIE

Badania dotyczące analizy strukturalnej oraz właściwości i funkcji fagowych kapsydów pozwalają nie tylko na poznanie morfologii cząstek fagowych, ale także na opisanie istotnych procesów łączenia się wirusów z komórkami gospodarzy, uwalniania materiału genetycznego, a dalej replikacji i w końcu powstawania i uwalniania nowych cząstek fagowych. Fagowe enzymy lityczne mogą być wykorzystywane w terapii przeciwko patogenom opornym na stosowane antybiotyki, a dzięki inżynierii genetycznej można polepszać efektywność ich działania [17]. Enzymy fagowe są swoiste, działają na wybrane szczepy bakteryjne i nie uszkadzają naturalnej flory jelitowej, jednak w przypadku podawania preparatów fagowych wymagane jest ich dokładne oczyszczenie z resztek komórek bakteryjnych, co jest obecnie bardzo poważnym wyzwaniem naukowym [13].

Bakteriofagi lityczne mają specjalne enzymy, które degradują peptydoglikan. Są to endolizyny, enzymy wytwarzane w końcowej fazie cyklu litycznego [9]. Badania wykazały, że niszczą one bakterie również od zewnętrznej strony komórki. Łączą się swoiście z określonymi elementami na komórkach bakteryjnych nawet szczepów opornych na antybiotyki syntetyczne. Innym przykładem fagowego antybiotyku białkowego może być białko A_2 . Jest to białko kapsydu faga Q β , które hamuje aktywność enzymu katalizującego biosyntezę mureiny [7]. Innym enzymem o aktywności muramidazy jest białko Pal (*N*-acetylo-muramyl-L-alanino amidaza (EC 3.5.1.28)) oraz białko Cpl-1 fagów litycznych zakażających pneumokoki [19, 46]. Endolizyny fagowe mogłyby być z powodzeniem stosowane jako antybiotyki, jednakże są to białka obce dla ludzkiego organizmu i rozpoznawane są przez czynniki układu obronnego człowieka, podobnie jak całe cząstki fagowe [12]. Enzymy fagowe od dawna są stosowane w badaniach strukturalnych otoczek bakteryjnych do ich depolimeryzacji i otrzymywania oligosacharydów. Białka adhezyjne fagów mogą również znaleźć zastosowanie praktyczne jako immunodiagnostyki do specyficznego rozpoznawania bakterii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ackermann H.W.: 5500 phages examined in electron microscope. Brief Review. Arch. Virol., 2007; 152: 227–243
- [2] Adams M.H.: Bacteriophages. Interscience publishers, INC; New York 1959
- [3] Arisaka F.: Assembly and infection process of bacteriophage T4. Chaos, 2005; 15: 1–7
- [4] Bartell P.F., Orr T.E., Reese J.F., Imaeda T.: Interaction of *Pseudomonas bacteriophage* 2 with the slime polysaccharide and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* strain BI. J. Virol., 1971; 8: 311–317
- [5] Bennett A.R., Davis F.G., Vlahodimou S., Banks J.G., Betts R.P.: The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of *Salmonella*. J. Appl. Microbiol., 1997; 83: 259–265

- [6] Benson S.D., Bamford J.K., Bamford D.H., Burnett R.M.: Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structure. *Cell*, 1999; 98: 825–833
- [7] Bernhardt T.G., Wang I.N., Struck D.K., Young R.: A protein antibiotic in the phage Q β virion: diversity in lysis targets. *Science*, 2001; 292: 2326–2329
- [8] Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel A.N., Powell B., Carlton R., Merrill C.R.: Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 204–210
- [9] Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med.*, 2006; 231: 366–377
- [10] Boudko S.P., Strelkov S.V., Engel J., Stetefeld J.: Design and crystal structure of bacteriophage T4 mini – fibrin NCCF. *J. Mol. Biol.*, 2004; 339: 927–935
- [11] Cabeen M.T., Jacobs-Wagner C.: Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 3: 601–610
- [12] Cisko M., Dąbrowski M., Weber-Dąbrowska B., Woytoń A.: Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1987; 35: 175–183
- [13] Clark J.R., March J.B.: Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterial. *Trends Biotechnol.*, 2006; 24: 212–218
- [14] Dąbrowska K., Świtajła-Jeleń K., Opolski A., Górski A.: Possible association between phages, Hoc protein and immune system. *Arch. Virol.*, 2006; 151: 209–215
- [15] Defives C., Werquin M., Mary P., Hornez J.P.: Roles of exopolysaccharides and lipopolysaccharides in the adsorption of the Siphovirus phage NM8 to *Rhizobium meliloti* M11S cells. *Curr. Microbiol.*, 1996; 33: 371–376
- [16] Demuth J., Neve H., Witzel K.P.: Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage population in Lake Plußsee. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993; 59: 3378–3384
- [17] Fischetti V.A.: Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.*, 2005; 13: 491–496
- [18] Fischetti V.A.: Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria. *BMC Oral Health*, 2006; 6(Suppl.1): S16
- [19] Clark J.L., Garcia E., Arraras A., Garcia P., Ronda C., Lopez R.: Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysine. *J. Virol.*, 1978; 61: 2573–2580
- [20] German G.J., Misra R.: The TolC protein of *Escherichia coli* serves a cell-surface receptor for the new characterized TLS bacteriophage. *J. Mol. Biol.*, 2001; 308: 579–585
- [21] Górski A., Weber-Dąbrowska B.: The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 511–519
- [22] Gregoraci G.B.: The biology of bacteriophages. W: *Modern bacteriophage biology and biotechnology*, red.: G. Węgrzyn, Research Signpost, Trivandrum, India, 2006
- [23] Hayashi M.N., Hayashi M., Imai M.: Bacteriophage phiX174-specific mRNA synthesis in cells deficient in termination factor rho activity. *J. Virol.*, 1981; 38: 198–207
- [24] Häusler T.: *Viruses vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis*. Macmillan, 2007
- [25] Hewat E.: The bacteriophage PRD1 uses a pseudo- β -propeller to bind to its cellular receptor. *Structure*, 2003; 11: 239–240
- [26] Jawetz E.J., Melnick E., Adelberg A.: *Przegląd Mikrobiologii Lekarskiej*; Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich; 1991
- [27] Kańtoch M.: Badania nad wiązaniem wirusów bakteryjnych przez leukocyty. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1958; 12: 637–640
- [28] Kańtoch M.: Wybrane zagadnienia z nauki o bakteriofagach. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1956; 10: 47–86
- [29] Kańtoch M., Mordarski M.: Wiązanie wirusów bakteryjnych przez komórki nowotworowe *in vitro*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1958; 12: 191–192
- [30] Kańtoch M., Skurski A., Wieczorek Z.: Hamowanie *in vitro* fagocytozy bakterii za pomocą wirusów bakteryjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1958; 12: 95–96
- [31] Kataoka Y., Miyake K., Iijima S.: Coliphage derived sialidase preferentially recognizes nonreducing end of polysialic acid. *J. Biosci. Bioeng.*, 2006; 101: 198–201
- [32] Kawaura T., Inagaki M., Karita S., Kato M., Nishikawa S., Kashimura N.: Recognition of receptor lipopolisaccharides by spike G protein of bacteriophage ϕ X174. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000; 64: 1993–1997
- [33] Kivelä H.M., Kalkkinen N., Bamford D.H.: Bacteriophage PM2 has a protein capsid surrounding a spherical proteinaceous lipid core. *J. Virol.*, 2002; 76: 8169–8178
- [34] Kokocińska I., Rossowski H.: Profilaktyczne zastosowanie bakteriofaga czerwonego *S. sonnei* w domu dziecka. *Przegl. Epidemiol.*, 1974; 28: 497–498
- [35] Kostrzewski J., Mulczyk M., Śłopek S.: Próby zapobiegania zakażeniom czerwonym w zbiorowiskach ludzi z pomocą wielowalencyjnych bakteriofagów czerwonych *S. flexneri* i *S. sonnei*. *Przegl. Epidemiol.*, 1974; 28: 483–507
- [36] Kostyuchenko A., Chipman P.R., Leiman P.G.: The tail of bacteriophage T4 and its mechanism of contraction. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005; 190: 810–813
- [37] Kraus J., Geller B.L.: Membrane receptor for prolate phages is not required for infection of *Lactococcus lactis* by smaller large isometric phages. *J. Dairy Sci.*, 1998; 81: 2329–2333
- [38] Kunicki-Goldfinger W.J.: *Zycie bakterii*; PWN; 2005
- [39] Kutter E.: Phage therapy: bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics. W: *Textbook of Natural Medicine*, t.1, red.: J. Pizzorno, M. Murray, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005; 1147–1161
- [40] Kwan T., Liu J., DuBow M., Gros P., Pelletier J.: Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 1184–1187
- [41] Kwiatkowski B., Boschek B., Thiele H., Stirm S.: Endo-N-acetylneuramidase associated with bacteriophage particles. *J. Virol.*, 1982; 43: 697–704
- [42] Lehman I.R., Herriott R.M.: The protein coats or „ghosts“ of coliphage T2. III. Metabolic studies of *Escherichia coli* B infected with T2 bacteriophage „ghosts“. *J. Gen. Physiol.*, 1958; 41: 1067–1082
- [43] Leiman P.G., Battisti A.J., Bowman V.D., Stummeyer K., Mühlhoff M., Gerardy-Schahn R., Scholl D., Molineux I.J.: The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain progressive degradation of new host specificities. *J. Mol. Biol.*, 2007; 371: 836–849
- [44] Leiman P.G., Kanamaru S., Mesyanzhinov V.V., Arisaka F., Rossmann M.D.: Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol. Life Sci.*, 2003; 60: 2356–2370
- [45] Łodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z.: Metody derywatywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 113–128
- [46] Loeffler J.M., Djurkovic S., Fischetti V.A.: Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.*, 2003; 6199–6204
- [47] Long G.S., Bryant J.M., Taylor P.W., Luzio J.P.: Complete nucleotide sequence of the gene encoding bacteriophage endosialidase: implications for K1E endosialidase structure and function. *Biochem. J.*, 1995; 309: 543–550
- [48] Marvin D.A., Welsh L.C., Symmons M.F., Scot W.R.P.: Molecular structure of fd (f1, M13) filamentous bacteriophage refined with respect to X-ray fibre diffraction and solid-state NMR data supports specific models of phage assembly at the bacterial membrane. *J. Mol. Biol.*, 2006; 355: 294–309
- [49] Mesyanzhinov V.V., Leiman P.G., Kostyuchenko V.A., Kurochkina L.P., Miroshnikov K.A., Sykilinda N.N., Shneider M.M.: Molecular architecture of bacteriophage T4. *Biochemistry*, 2004; 69: 1190–1202
- [50] Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., Krylov V.N., Volckaert G.: The genome of bacteriophage ϕ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.*, 2002; 317: 1–19
- [51] Mondigler M., Holz T., Heller K.J.: Identification of the receptor-binding regions of pb5 proteins of bacteriophages T5 and BF23. *Virology*, 1996; 219: 19–28
- [52] Morona R., Krämer C., Henning U.: Bacteriophage receptor area of outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1985; 12: 539–545
- [53] Mulczyk M., Śłopek S.: Znaczenie swoistych bakteriofagów w zwalczaniu nosicielstwa pałeczki *Shigella sonnei*. *Przegl. Epidemiol.*, 1971; 25: 475–476
- [54] Nowak-Lipińska K., Libich M.: Profilaktyczne zastosowanie bakteriofaga czerwonego *Sh. sonnei* w Zakładach Dziecięcych w Łodzi. *Przegl. Epidemiol.*, 1974; 28: 498–504

- [55] Park T., Struck D.K., Deaton J.F., Young R.: Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 19713–19718
- [56] Pederson D.M., Welsh L.C., Marvin D.A., Sampson M., Perham R.N., Yu M., Slater M.R.: The protein capsid of filamentous bacteriophage PH75 from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, 2001; 309: 401–421
- [57] Plancon L., Janmot C., le Maire M., Desmadril M., Bonhivers M., Letellier L., Boulanger P.: Characterization of a high-affinity complex between the bacterial outer membrane protein FhuA and the phage T5 protein pb5. *J. Mol. Biol.*, 2002; 318: 557–569
- [58] Poot R.A., Tsareva N.V., Boni I.V., van Duin J.: RNA holding kinetics regulates translation of phage MS2 maturation gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 10110–10115
- [59] Przondo-Hessek A.: Podstawy lizotypii pałeczek *Klebsiella*, 1. Rola struktur powierzchniowych pałeczek *Klebsiella* w wiązaniu bakteriofagów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1985; 39: 264–310
- [60] Przondo-Hessek A., Romanowska E.: Lipopolysaccharides of *Shigella flexneri* 6 as phage receptors. *Acta Microbiol. Pol.*, 1978; 27: 7–102
- [61] Przondo-Hessek A., Śłopek S.: Morphology and thermal sensitivity of *Klebsiella* bacteriophages of the collection of Przondo-Hessek. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1967; 15: 547–556
- [62] Przondo-Hessek A., Śłopek S.: Typing of *Klebsiella* bacilli by means of *Klebsiella* bacteriophages from the collection of Przondo-Hessek. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1967; 15: 563–577
- [63] Przondo-Hessek A., Śłopek S., Miodońska J.: Serologic characterization of the *Klebsiella* bacteriophages of the Przondo-Hessek collection. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1967; 15: 557–562
- [64] Riechmann L., Holliger P.: The C-terminal domain of TolA is the co-receptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell*, 1997; 90: 351–360
- [65] Roberts M.D., Martin N.L., Kropinski A.M.: The genome and proteome of coliphage T1. *Virology*, 2004; 318: 245–266
- [66] Rossman M.G., Mesyanzhinov V.V., Arisaka F., Leiman P.G.: The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004; 14: 171–180
- [67] San Martin C., Huiskonen J.T., Bamford J.K., Butcher S.J., Fuller S.D., Bamford D.H., Burnett R.M.: Minor proteins, mobile arms and membrane-capsid interactions in the bacteriophage PRD1 capsid. *Nat. Struct. Biol.*, 2002; 9: 756–763
- [68] Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, PWN; 1996
- [69] Scholl D., Rogers S., Adhya S., Merrill C.R.: Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J. Virol.*, 2001; 75: 2509–2515
- [70] Serwer P., Hayes S.J., Thomas J.A., Hardies S.C.: Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class. *J. Virol.*, 2007; 4: 1–5
- [71] Skurnik M., Strauch E.: Phage Therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006; 296: 5–14
- [72] Smith H.W., Huggins M.B.: Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, 1982; 128: 307–318
- [73] Sutherland I.: Surface carbohydrate of the prokaryotic cell. Academic Press, London, 1977
- [74] Szkudlarek D.: Profilaktyczne zastosowanie bakteriofaga *S. sonnei* w domu dziecka. *Przegl. Epidemiol.*, 1974; 28: 505–506
- [75] Thiriot S.D., Nevzorov A.A., Zagaynskiy L., Wu C.W., Opella S.J.: Structure of the coat protein in Pf1 bacteriophage determined by solid-state NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 2004; 341: 869–879
- [76] Tichaczek-Goska D., Cisowska A.: Wybrane właściwości lipopolisacharydów bakterii Gram-ujemnych zawierających mannan w łańcuchu O-swoistym. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2007; 16: 105–112
- [77] Vimr E.R., McCoy R.D., Vollger H.F., Wilkinson N.C., Troy F.A.: Use of prokaryotic-derived probes to identify poly(sialic acid) in neonatal neuronal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81: 1971–1975
- [78] Vinga I., Sao-Jones, C., Tavares, P., Santos, M.A.: Bacteriophage entry in the host cell. W: *Modern bacteriophage biology and biotechnology*, red. G. Węgrzyn, Research Signpost, Trivandrum, India, 2006; 165–205
- [79] Wang I.N., Smith D.L., Young R.: Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000; 54: 799–825
- [80] Weinbauer M.: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004; 28: 127–181
- [81] Young R.: Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.*, 1992; 56: 430–481
- [82] Zakrzewski K.: Biochemia wirusa bakteryjnego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1951; 4: 135–186

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.