

ПРЕНОС ГЕНЕТСКОГ МАТЕРИЈАЛА БАКТЕРИЈЕ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ПРОЦЕСОМ ТРАНСФОРМАЦИЈЕ

Наташа ОПАВСКИ, Слободанка ЂУКИЋ, Вера МИЈАЧ, Лазар РАНИН
Институт за микробиологију и имунологију Медицинског факултета Универзитета, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ: *Streptococcus pneumoniae* је једна од главних патогених бактерија респирационог система, која најчешће изазива пнеумонију, запаљење средњег ува, бактеријемiju и менингитис. Такође, пнеумокк је једна од највише проучаваних бактерија. Нека врло значајна научна открића учињена су на експериментном моделу пнеумокока: трансформација; *DNK* као носилац генетских инфорамција; улога капсуле бактерије у резистенцији на фагоцитозу; имуногеност полисахарида капсуле; терапијско деловање пеницилина, као и механизам резистенције на бета-лактамске антибиотске лекове. *S. pneumoniae* је једна од ретких врста бактерија које су природно трансформабилне и код којих је трансформација основни начин размене генетског материјала. Трансформација гена је процес у коме ћелије преузимају слободну *DNK* из околног медијума и инкорпоришу је, при чему настаје измена генотипа, која се преноси наслеђем. Потпун процес се може поделити у неколико фаза: а) развој компетенције (способност преузимања *DNK*); б) везивање *DNK*; в) транспорт *DNK*; и д) интеграција *DNK* у хромозом ћелије примаоца. Детерминанте кодирание у хромозому су ограничене на пренос у исте бактерије или у сродне врсте бактерија. Као последица рекомбинације између врста настају мозаички гени, који се састоје од наизменичних блокова нуклеотида, пореклом од донора и примаоца. Ако селекција делује на овом нивоу, корисни "мозаици" постају фиксирани у популацији бактерија, а могу се и хоризонтално ширити из једне у другу врсту бактерија. Хоризонтални пренос гена и хомолога рекомбинација доводи до стварања разноликости гена. Код пнеумокока, резистенција на бета-лактамске антибиотске лекове настала је услед стицања детерминанте резистенције, попут ниско-афинитетних пеницилин-везујућих протеина процесом хоризонталног преноса гена од вирулентних стрептокока. Гени који кодирају детерминанте вируленције могу се преносити између пнеумокока и сродних врста бактерија. Ова појава утиче на настанак врло резистентних и вирулентних изолата *S. pneumoniae*. Такође, измене гена који кодирају синтезу аутолизина и доводе до промене серотипа могу ометати идентификацију пнеумокока и бити узрок неуспеха деловања вакцине.

Кључне речи: *Streptococcus pneumoniae*, процес трансформације, генетски материјал. (СРП АРХ ЦЕЛОК ЛЕК).

Streptococcus pneumoniae је врста бактерија која је позната још од краја 19. века као изазивач пнеумоније. Све до увођења пеницилина у терапију 1941. године проценат морталитета од пнеумококне пнеумоније био је изузетно висок. У новије време, пнеумокк се чешће спомиње као узрочник запаљења средњег ува, синуситиса, менингитиса, посебно код деце. Ова обољења данас обично нису фатална, али носе ризик од појаве секвела.

Streptococcus pneumoniae колонизује горње респирационе путеве, не изазивајући патолошке промене. Да ли ће колонизација прерасти у обољење, зависи од бројних фактора, првенствено вируленције бактерија и стања имунитета домаћина.

Најзначајнији фактори вируленције пнеумокока су: 1) капсула, с антифагоцитним својствима и помаже у адхеренцији бактерија; 2) површни протеин пнеумокока, који успорава елиминацију пнеумокока из крви; 3) протеаза IgA_1 , која деградира IgA_1 ; 4) пнеумолизин, који је тиол-активни цитотоксин; 5) аутолизин, који лизира ћелије бактерија и на тај начин ослобађа пнеумолизин; и 6) делови зида ћелија.

У заштити организма од инфекција пнеумококама значајно је функционисање епителних ћелија респирационог тракта, муцин, учешће фагоцита и система комплемента, као и хуморалног имунитета. Од међусобне интеракције наведених одбрамбених механизма и фактора вируленције зависи да ли ће пнеумокк с места примарне колонизације извршити инва-

зију околних ткива домаћина. Обољења која изазива ова врста бактерија већином су ендемог порекла. У случају пада природног имунитета, ризик оболевања знатно се повећава.

1. Значај бактерије *Streptococcus pneumoniae* у оледима

Осим клиничког, *Streptococcus pneumoniae* показује и изузетно велики значај у огледима. Коришћен је као добар модел у огледу на коме су учињена важна научна открића. Авери (Avery) [1] је, 1917. године, у профилтрисаној течној култури пнеумокока издвојио "специфичну солубилну супстанцију", за коју је открио да се налази у капсули ове бактерије. Неколико година касније је утврђено да је капсула према хемијском саставу полисахарид, као и да су разлике у њеном хемијском саставу код различитих типова пнеумокока одговорне за разлике у вируленцији, као и специфичности антитела која реагују с њом. На тај начин је доказано да осим протеина и полисахарида имају имуногена својства. Потом је уследио чувени оглед Ф. Грифита (Griffith) [2], у коме је мишу убригао мешавину живих, инкапсулисаних и мртвих, инкапсулисаних пнеумокока, који су припадали различитим серотиповима. Неочекивано, животиња је оболела и уинула, а из њене крви је изолован исти тип пнеумокока коме је припадао мртви инкапсулирани сој. Грифит је ову измену имунолошке специфичности описао као трансформацију пнеумокока.

Настављајући огледе трансформације пнеумокока, Авери и сарадници [1] су, 1944. године, открили да је медијатор трансформације генетски материјал, који је по хемијском саставу дезоксирибонуклеинска киселина (*DNK*). Ово је било врло значајно и изненађујуће откриће, јер су се у то време све значајне функције придавале протеинима.

2. Трансформација

Трансфер гена се код бактерија дешава у току трансформације, трансдукције и конјугације. Трансформација представља преузимање слободних фрагмената *DNK* ћелија из спољне средине, који потом ступају у рекомбинацију с хромозомом реципијентне ћелије бактерије. Разликује се природна и вештачка (артефицијална) трансформација. Бактерије су једини микроорганизми (с могућим изузетком гљива) које могу природно да трансформишу [2], док се код ћелија виших организама и сисара трансформација може једино изазвати вештачки, *in vitro*. За сада се зна да постоји 15 родова микроорганизма који природно трансформишу [3]. Код родова *Bacillus*, *Streptococcus* и *Haemophilus*, трансформација је истовремено и основни начин размене генетског материјала. То је једини облик трансфера гена бактерија у коме су фазе преноса материјала гена кодиране у хромозому [4]. Процес трансформације се, условно, може поделити на неколико фаза: 1) развој компетенције, 2) везивање *DNK*, 3) транспорт *DNK* у цитоплазму и 4) рекомбинација *DNK* даваоца у хромозом ћелија примаоца. И код грам-позитивних и грам-негативних бактерија процес трансформације се одвија кроз ове четири фазе, мада помоћу различитих механизма.

Развој компетенције

Компетенција представља стање у коме су бактерије способне да везују и апсорбују *DNK*, везану за протеине и резистентну на екзогене и ендогене нуклеазе. Већина бактерија које природно могу да трансформишу постају компетентне под одређеним условима у току раста и размножавања. Испитивања су показала да: (a) компетенција за трансформацију код пнеумокока није конститутивна особина, већ је регулисана сигнаlima феромона - фактора компетенције [5]; (b) сви пнеумокоци носе гене компетенције; (c) постоје два алела који кодирају различите факторе [6] - феромоне компетенције у природној трансформацији; (d) оба феромона су активна у изазивању компетенције; и (e) код сојева пнеумокока трансформација може бити изазвана синтетским феромонским пептидима.

Ћелије бактерија, у току раста и размножавања (пнеумокок у експоненцијалној фази) почињу да луче фактор компетенције [4]. Компетенција је изазвана од тренутка када густина бактерија у култури износи 10^8 cfu/mL, односно када је постигнута оптимална концентрација акумулисаног фактора компетенције. Тачан механизам деловања фактора компетенције није познат. У току развоја компетенције дешавају се бројне промене у ћелији бактерије: акти-

више се нова муреин-хидролаза, која на ограниченој површини бактерија разграђује пептидогликански матрикс, на којој би се везала и преузела слободна *DNK* [7]; настају нагле и значајне промене у синтези протеина - појављују се нови протеини, који се не налазе код некомпетентних ћелија; успорава се брзина раста и размножавања. Вероватно да фактор компетенције, после везивања за специфичне рецепторе на површини грам-позитивних бактерија, доводи до описаних измена. Огледи су показали да *S. pneumoniae* синтетише 14 компетенцијом изазваних протеина [8]. Неки од њих су смештени у цитоплазми, неки у мембрани цитоплазме пнеумокока. Значајна је њихова улога у везивању, преузимању и интегрисању *DNK* даваоца.

У условима *in vitro* развој компетенције пнеумокока зависи од: a) температуре; b) јона магнезијума и калцијума; и c) ацидности (pH) средине.

Везивање *DNK*

После успостављања стања компетенције, слободна *DNK* се везује за *DNK*-везујуће протеине (*DNK-VP*) који се налазе на површини ћелија бактерија [9]. Током већег дела циклуса ћелије, *DNK*-везујући протеини у ћелији су скривени и само под дејством аутолизина, после успостављања компетенције, настаје њихово демаскирање. На површини компетентних ћелија пнеумокока нађено је 60-80 рецепторских места за везивање *DNK* [4].

Експериментално је утврђено да се сама реакција везивања одвија брзо, у првих 5-10 минута, на 30°C, а затим се наставља постепено до 30 минута. Уочено је да се за површинске рецепторе везује само дволанчана *DNK*, с формирањем граничних маркера, у интервалима од 6 Kb [2]. После оствареног контакта између *DNK* и *DNK-VP* фрагментишу се везане дволанчане *DNK* у интервалима од 6 Kb, под дејством ендонуклеаза. Потом, следи комплетна фрагментација једног од ланаца *DNK*.

Транспорт *DNK* у цитоплазму

У току транспорта, дволанчана *DNK*, везана за *DNK-VP*, под дејством ендонуклеаза преводи се у једноланчану (облик резистентан на дезоксирибонуклеазу), у којој се преноси са спољашње мембране у цитоплазму ћелије [10]. Заштита донорске *DNK* од неспецифичне деградације нуклеазама код грам-позитивних бактерија остварује се формирањем комплекса протеина *DNK*. Овај комплекс је стабилан и отпоран на дигестију ензима. Претпоставља се да комплекс *DNK*-протеин убрзава трансфер *DNK* у ћелију, штити *DNK* од интрацелулних нуклеаза и олакшава интеграцију *DNK* донора у геном реципијента [11].

Рекомбинација *DNK* даваоца у хромозом ћелије примаоца

Интеграција трансформишуће *DNK* у хромозом ћелије примаоца представља последњи корак у процесу природне трансформације. Код испитаних бактерија је утврђено да настаје рекомбинација - замена

дела једнога ланца *DNK*, у хромозому ћелије примаоца, фрагментима трансформишућих хомолога *DNK* даваоца. Сматра се да је за успешан процес рекомбинације неопходно нормално функционисање гена за рекомбинацију (*rec*), чији производи катализују стварање формације *DNK* донора - *DNK* хромозома [4]. Такође, производи ових гена показују и активност ендонуклеаза, те чине прекид на једном ланцу *DNK* примаоца, где ће се обавити рекомбинација. Код мутаната, с лезијама у генима *recA*, *recB*, *recD* и *recE*, настају нормална везивања и транспорт *DNK*, али не и интеграције у хромозом примаоца.

Пошто се донорски и реципијентни ланац *DNK*, и поред одређеног степена хомологије, разликују у секвенцијама база *DNK*, у току њиховог сједињавања настају грешке као последица погрешног “упаривања” база. Ово некомплементарно спаривање база коригује се под дејством тзв. система исправљача (*repair*), система с различитим успехом. Донорска *DNK* се уграђује уколико систем исправљача одстрани неодговарајућу базу у реципијентној *DNK*.

Код пнеумокока систем “*repair*” (назван хекс - *Hex*) исправља грешке у спаривању база *DNK*, које су настале као последица трансформације или погрешне репликације хромозома бактерија [12]. Уколико је систем хекс ефикасан, фреквенција трансформације односно вероватноћа појаве мутације је мања. С друге стране, хекс-мутанти (с изменама у генима *hexA* и *hexB*) показују знатно већу учесталост спонтаних мутација [13].

Порекло слободне трансформишуће *DNK*

Дуго се веровало да слободна *DNK* настаје искључиво лизирањем дела популације бактерија. У том случају, она би највероватније била комплетно деградисана под дејством екстрацелуларних нуклеаза. Стога је прихватљива хипотеза да бактерије активно “секретују” фрагменте *DNK*, који остају везани на површини ћелије даваоца и на тај начин бивају заштићени од нуклеаза и боље презентовани ћелији примаоца [14]. Претпоставља се да у популацији бактерија постоји координисана регулација развоја компетенције и секретовања *DNK*.

Уколико су медијатори трансформације кодирани гени у хромозомима, они се могу успешно преносити само у исте врсте бактерија или између сродних врста бактерија. Ово је разумљиво, јер је за интеграцију *DNK* донора неопходна хомолога рекомбинација с резидентним алелом. Максимум разлике између нуклеотида који улазе у рекомбинацију је 20-30 посто. Као последица рекомбинације између врста настају “мозаички” гени, састављени од наизменичних блокова нуклеотида, пореклом од соја примаоца и даваоца. Ови блокови могу бити последица рекомбинације малих фрагмената у гену или замене комплетних гена новим генетским материјалом. У сваком случају, овај “мозаички” ген кодира протеин с другачијом каталитичком и антигенском активношћу у односу на реципијента и донора. Селективна преса утиче да “мозаик”, који доноси неку особину корисну за бактеријску врсту, остаје фиксиран у попула-

цији. Такође, фаворизовани “мозаички” ген се може и хоризонтално ширити од једне до друге природно трансформабилне врсте бактерија [15].

3. Значај трансформације бактерије *Streptococcus pneumoniae*

Гени који су највише подложни трансформацији код *S. pneumoniae* су они који кодирају синтезу (а) протеина који везују пеницилин и (б) фактора вируленције. Очигледно је да су ови гени код пнеумокока под најснажнијим утицајем селективне пресе [15].

Резистенција на пеницилин и групе бета-лактаамске антибиотске лекове

Од почетка увођења пеницилина у терапију инфекција изазваних пнеумококом, морталитет ових обољења је знатно опао. Резистенција на пеницилин *S. pneumoniae* је у то време изазвана само код мутаната *in vitro*. Међутим, 1967. године су регистровани први изолати од болесника у Аустралији са смањеном осетљивошћу на пеницилин [16], а ова појава је уочена и код болесника у другим деловима света. Сојеви с врло високом резистенцијом на пеницилин (МИК од 4-8 mg/mL) први пут су изоловани у епидемији у Јужној Африци [17].

Утврђено је да клинички изолати пнеумокока резистентни на пеницилин не стварају бета-лактамазе. За смањену осетљивост *S. pneumoniae* на бета-лактаминске антибиотске лекове одговоран је механизам “унутрашње” резистенције - измене протеина који везују пеницилин (PVP), односно циљних места деловања ових лекова.[18].

S. pneumoniae поседује пет протеина који везују пеницилин, велике масе молекула (1A, 1B, 2A, 2B и 2X) који су укључени у финалне фазе синтезе пептидогликана [19]. Промене протеина који везују пеницилин, посебно аминокиселина у близини активног места, смањују њихов афинитет за антибиотске лекове. Утврђено је да резистенција на бета-лактамазе настаје примарно услед измена у три протеина који везују пеницилин - 1A, 2X и 2B [20]. С обзиром да је сваки протеин који везује пеницилин различитог афинитета за различите бета-лактаминске антибиотске лекове, резистенција на пеницилин настаје услед промена у протеинима који везују пеницилин 1A, 2X и 2B, док је смањена осетљивост на цефалоспорине последица измена протеина који везују пеницилин 1A и 2X [21].

Иако је улога наведена три протеина који везују пеницилин у појави резистенције на бета-лактамазе јасно доказана, није искључено да и друга два протеина који везују пеницилин, 2A и 1B, такође учествују у овом процесу.

Анализе гена што кодирају синтезу протеина који везују пеницилин показале су да су они врло униформни код пнеумокока осетљивих на пеницилин (са само 1 посто варијације секвенција), док изолати резистенти на пеницилин поседују веома варијабилне гене за протеин који везују пеницилин. Они су “мозаички” грађени и састоје се од блокова нуклеотида, који су идентични или слични изолатима рези-

стентним на пеницилин и блокова у којима нуклеоти-ди варирају до 20 посто у односу на сојеве осетљиве на пеницилин. Сматра се да су ови “мозаички” гени последица рекомбинација између *S. pneumoniae* и хомологих гена из сродних врста - за ген протеина који везују пеницилин 2B доказано је да је донор *S. mitis*, док ген протеина који везују пеницилин 2X да је *S. oralis* [20, 22]. Хакенбек (*Hakenbeck*) и сарадници [23] су, у огледима трансформације у којима су коришћени изолати *S. mitis*, резистентни на велики број бета-лактаминских антибиотских лекова, као донори, а пнеумококе осетљиве на пеницилин, као реципијенте, добили низ трансформаната пнеумокока код којих су свих пет протеина који везују пеницилин били измењени. Код наведених сојева је ниво резистенције не пеницилине и цефалоспорине био висок и одговарао је соју *S. mitis* донора. Иако су ове промене настале у лабораторијским условима, претпоставља се да се оне догађају и у природи. Запањујућа је била лакоћа којом су гени за синтезу есенцијалних ензима (протеина који везују пеницилин) били пренети између две бактеријске врсте. Стога, све раширенију резистенцију *S. pneumoniae* на бета-лактаминске антибиотске лекове аутори [24] тумаче последицом три различита процеса: 1) хоризонталног трансфера гена из сродних врста у бар један клон пнеумокока; 2) преноса “мозаичког” гена резистенције из резистентног клона у остале; и 3) ширења резистентног клона. Уколико је то тачно, може се претпоставити да ће се неуспех терапије бета-лактаминским антибиотским лековима инфекција, узрокованих пнеумококама, ускоро појавити и у регионима света у којима је проценат резистенције пнеумокока на пеницилин још низак.

Еволуција детерминанти вируленције

а) Измена серотипова

Гени за стварање капсуле пнеумокока састоје се од конзервисаних региона, укључених у полимеризацију, и варијабилних гена, одговорних за специфичност капсула.

Према разликама у хемијској и антигенској грађи капсуле, *S. pneumoniae* се дели на 90 серотипова [25]. Ипак, највећи број (90 посто) инвазивних болести изазивају само 16 серотипова, док свега шест доминира међу изолатима резистентним на пеницилин [26]. Могуће је да, у популацији пнеумокока за поједине серотипове који успешно колонизују домаћина или ефикасно “беже” имунском систему, постоји селективна предност. Ти серотипови су на тај начин фаворизовани.

Барнес [27] је код детета претходно колонизованог мултирезистентним сојем 23F *S. pneumoniae* изоловао мултирезистентни сој серотипа 14. Анализе гена су показале да је реч о истом соју пнеумокока, који је трансформацијом изменио серотип. Упознавање с механизмом и учесталошћу измене материјала капсуле код пнеумокока је од значаја, јер би ова појава могла битно да угрози успех вакцине која у себи садржи полисахарид капсуле [15].

б) Аутолизин пнеумокока

У овојници пнеумокока налази се ензим аутолизин, чија је активност регулисана холином из липотеинонске киселине. Овај ензим прекида амидне везе у пептидогликану и тако доводи до лизе пнеумокока [28]. Активан је у деоби ћелија, стационарној фази раста културе и лизи индукованом жучним солима (дезоксихолом) и бета-лактаминским антибиотским лековима. Приликом лизе пнеумокока под утицајем аутолизина, ослобађа се пнеумолизин (цитотоксин) и делови зида ћелија, који су изразито инфламационог потенцијала. Код сојева пнеумокока који су отпорни на лизу дезоксихолом установљено је да су гени који кодирају синтезу аутолизина *lyt A* измењени [30]. Они су “мозаички” грађени и састоје се од делова, који се разликују до 20 посто од гена који кодирају аутолизин *lyt A*, типичних дезоксихолом-осетљивих пнеумокока. Измењени гени за *lyt A* што кодирају синтезу аутолизина кога инактивише дезоксихолом, те изостаје лиза ћелије бактерије. Интересантно је да блокови нуклеотида из ових “мозаика” показују знатну сродност у секвенцијама с генима за *lyt A* за синтезу аутолизина, нађеним код стрептокока вириданс који доводе до инвазивних болести [29]. Такође, код изолата *S. mitis* су нађени алели гена за *lyt A*, типични за пнеумококе растворљиве у дезоксихолому. Ова открића указују да је настао трансфер гена *lyt A* из *S. pneumoniae* у стрептококе вириданс [15].

Могућност преноса гена за аутолизин из пнеумокока у стрептококе вириданс, као и стварање атипичног “мозаичког” гена за синтезу аутолизина код пнеумокока нерастворљивих дезоксихолом, ограничава употребу граничника PCR за ген за синтезу аутолизина у циљу идентификације *S. pneumoniae* [15].

в) Неураминидаза

Неураминидаза се сматра фактором вируленције, јер сече терминалне остатке сијалинске киселине из различитих једињења, смештених у телесним течностима и на површини тела, те на тај начин огољује рецепторе за адхезине пнеумокока, чиме му олакшава колонизацију [30].

Анализа гена који кодирају синтезу неураминидазе пнеумокока *nan A* показала је висок степен сродности с регионом за протеазу IgA₁ *S. sanguis*. Разлике у броју и структури нуклеотидних секвенција у гену за синтезу неураминидазе пнеумокока *nan A*, код различитих изолата пнеумокока, вероватно су последица хоризонталног трансфера гена, те се рекомбинантни молекули разликују од реципијента и до 35 посто на нивоу нуклеотида [15].

ЗАКЉУЧАК

Очигледно је да код природно трансформабилних бактерија, као што је *S. pneumoniae*, у настанку и ширењу резистенције на бета-лактамазе, као и еволуцији детерминанти вируленције, трансформација је од изузетног значаја. Захваљујући релативно лакој размени материјала гена са сродним врстама, првенствено стрептококама које су део физиолошке флоре

усне дупље, пнеумокок је у кратком временском периоду стекао широку разноврсност гена, с могућношћу фаворизовања “пожељних” гена. Као последица наведених збивања селекционисани су клонови пнеумокока с израженим факторима вируленције и високим степеном резистенције на антибиотске лекове.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Avery OT, MacLeod CM, McCarty. Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med. 1944;79:137-58.
2. Smith HO, Danner DB, Deich RA. Genetic transformation. Ann Rev Biochem 1981;50:41-68.
3. Mercenier A, Chassy BM. Strategies for the development of bacterial transformation systems. Biochem 1988;7:503-17.
4. Stewart GJ, Carlson CA. The biology of natural transformation. Ann Rev Microb. 1986;40:211-35.
5. Tomasz A, Hotchkiss RD. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. Proc Natl Acad Sci 1964;51:480.
6. Pozzi G, Masala L, Ianelli F, Manganeli R et al. Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. J Bacter 1986;178:6087-90.
7. Horne D, Tomasz A. Competence specific autolysis in *S.sanguis*. J Gen Microb 1985;131:533-41.
8. Vijayakumar MN, Morrison DA. Localization of competence induced proteins in *S.pneumoniae*. J Bacter 1986;165:689-95.
9. Ceglowski P, Kawezynski M, Dobrzanski WT. Purification and properties of deoxyribonucleic acid binding factor isolated from the surface of *Streptomyces sanguis* cells. J Bacter 1980;141:1005-14.
10. Morrison DA, Lacks SA, Guild WR, Hageman JM. Isolation and characterization of three new classes of transformation deficient mutants of *S.pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. J Bacter 1983;156:281-90.
11. Lacks S. Uptake of circular deoxyribonucleic acid and mechanism of deoxyribonucleic acid transport in genetic transformation in *S.pneumoniae*. J Bacter 1979;138:404-9.
12. Claverys JR, Lacks SA. Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. Microb Rev 1986;50:133-65.
13. Prudhomme M, Mejean V, Martin B, Claverys JR. Mismatch repair genes in *S.pneumoniae*: Hex A confers a mutator phenotype in *E.coli* by negative complementation. J Bacter 1991;173:7196-203.
14. Catlin BW. Cell to cell transmission of chromosomal loci in *N.gonorrhoeae*. Genetic Exchange: A celebration and a new generation. Dekker, New York 1982;369.
15. Dowson CG, Barcus V, King S, Pickerill P et al. Horizontal gene transfer and the evolution of resistance and virulence determinants in *Streptococcus*. J Appl Microb 1997;63(Suppl):42-51.
16. Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. Lancet 1967;2:264-5.
17. Appelbaum PC, Bhamjee A, Scragg JN et al. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. Lancet 1977;2:995-7.
18. Tomasz A, Jabes D, Markiewicz Z, Garcia Butos J, Nachman S. Multiple binding proteins in penicillin resistant pneumococci: evidence for the clonal nature of resistance among clinical isolates. In: Jackson GG, Schlumberg HD, Zeiler HJ (ed). Proc Inter Symp Friedr. Vieweg, Braunschweig/Weisbaden 1988;11-20.
19. Hakenbeck R, Briese T, Chalkley L, Ellebrok H et al. Variability of penicillin binding proteins from penicillin sensitive *S. pneumoniae*. J Inf Dis 1991;164:307-12.
20. Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, Whiley RA. Evolution of penicillin resistance in *S. pneumoniae*; the role of *S. mitis* in the formation of a low affinity PBP 2B in *S. pneumoniae*. Mol Microb 1993;9:635-43.
21. Barcus VA, Ghanekar K, Yeo M, Coffey TJ, Dowson CG. Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *S. pneumoniae*. FEMS Microb Lett 1995;126:299-304.
22. Sibold C, Henrichsen J, Konig A, Martin C et al. PBP X genes of major clones of penicillin resistant *S. pneumoniae* have evolved from PBPX genes of a penicillin sensitive *S. oralis*. Mol Microb 1994;12:1013-23.
23. Hakenbeck R, Konig A, Kern I, Linden M et al. Acquisition of five high-M penicillin binding protein variants during transfer of high level beta lactam resistance from *S. mitis* to *S. pneumoniae*. J Bacter 1998;180:1831-40.
24. Sibold C, Wang J, Henrichsen J, hakenbeck R. Genetic relationships of penicillin susceptible and resistant *S. pneumoniae* strains isolated on different continents. Inf Immun 1992;60:4119-26.
25. Henrichen J. Six newly recognised types of *S.pneumoniae*. J Clin Microb 1995;33:2759-62.
26. Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Gardes C et al. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *S. pneumoniae*. Inf Immun 2001;69:2477-86.
27. Barnes DM, Whittier S, Gilligan PH, Soares S et al. Transmission of multidrug resistant serotype 23F *S. pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain *in vivo*. J Inf Dis 1994;171:890-6.
28. Briese T, Hakenbeck R. Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acids and choline. Eur J Bacter 1985;146:417-27.
29. Diaz E, Lopez R, Garcia JL. Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *S. pneumoniae*. J Bacter 1992;174:5508-15.
30. Krivan HC, Roberts DD, Ginsberg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc1-4Gal found in some glycolipids. Proc Natl Acad Sci 1988;85:6157-61.

NATAŠA OPAVSKI

Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Medicinski fakultet

11 000 Beograd, Dr Subotića 1

Tel.: 685-961