

Molekularne mechanizmy chorobotwórczości enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* (EPEC)

JACEK OSEK

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J.

Molecular mechanisms of the pathogenicity of enteropathogenic *Escherichia coli* strains (EPEC)

Summary

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains are important etiological agents of diarrhea in young children in developing countries. The bacteria also seem to play a role in enteric infections in some animals, especially in piglets, calves, rabbits and dogs. The pathogens colonize the intestinal mucosa and produce a characteristic histopathological feature known as the attaching effacing (AE) lesion. The pathomechanism of EPEC infections is very complicated and includes at least three steps: (1) binding of bacteria to the enterocytes through adhesive bundle forming pili (BFP); (2) expression of a nonfimbrial bacterial adherence protein called intimin together with its own receptor Tir that is inserted into the membrane of host cells; (3) transfer of bacterial proteins to the enterocytes through the type III secretion system that leads to the reorganization of the host cells cytoskeleton, formation of pedestals and attaching effacing lesions. Several genes, both of plasmid and chromosomal origin, are involved in this process and, among them, the LEE pathogenicity island seems to play a key role in the virulence of EPEC. Although the molecular level of EPEC action is well known the exact mechanism of diarrhea due to enteropathogenic *E. coli* bacteria needs to be further analyzed.

Keywords: Enteropathogenic *E. coli*, mechanism of diarrhea, genes, LEE pathogenicity island, EAF plasmid

Chorobotwórcze szczepy *Escherichia coli* są istotnym czynnikiem etiologicznym biegunek u ludzi, zarówno dzieci jak i osób dorosłych oraz u zwierząt, szczególnie młodych (15, 29). Bakterie *E. coli* można podzielić, biorąc pod uwagę posiadane przez nie mechanizmy wywoływania biegunki, na szereg grup: enteropatogenne (EPEC), enterotoksyczne (ETEC), enteroinwazyjne (EIEC), enterokrwotoczne (EHEC), enteroagregacyjne (EAEC) i martwicowe (NTEC) (24, 29). Do tej pory najlepiej poznano mechanizmy patogennego działania szczepów należących do grup ETEC, EIEC i EHEC. W ostatnim okresie dużą uwagę zwraca się na stosunkowo wcześniej opisane (lata 40- i 50-te XX w.) drobnoustroje grupy enteropatogennych *E. coli* (EPEC), których działanie chorobotwórcze prowadzi do powstania szeregu zmian w komórkach nabłonkowych gospodarza, konsekwencją czego jest rozwój objawów biegunkowych, powiązanych z charakterystycznym obrazem histopatologicznym określanym terminem „przylegania i zacierania” (attaching effacing; AE) (10, 12, 38, 39). Podobne zmiany obserwuje się też w przypadku zakażeń szczepami enterokrwotocznymi (EHEC) oraz innymi bakteriami chorobotwórczymi dla ludzi i zwierząt, należącymi do rodzajów *Hafnia* i *Citrobacter* (1, 23, 35). Z tego też względu wszystkie te mikroorganizmy klasyfikuje się obecnie do wspólnej grupy tzw. patogenów AE (23).

W obecnym opracowaniu zebrano najnowsze informacje dotyczące mechanizmów chorobotwórczości

bakterii AE ze szczególnym uwzględnieniem enteropatogennych *E. coli*.

Bakterie EPEC są istotną grupą drobnoustrojów, odpowiedzialną za rozwój schorzeń biegunkowych u dzieci w krajach rozwijających się (23). W ostatnim okresie szczepy enteropatogenne *E. coli* wiąże się też z występowaniem biegunek u zwierząt, zwłaszcza prosiąt, cieląt, królików oraz psów (4, 9, 11, 41). W początkowym okresie, do grupy EPEC zaliczono *E. coli* określonych grup serologicznych, których mechanizm działania biegunkowego nie był znany. Izolaty te, pochodzące zwykle od dzieci z zaburzeniami gastrycznymi, należały najczęściej do grup O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128 i O142 (23, 24). Właściwości chorobotwórcze i zdolność indukowania biegunki przez enteropatogenne *E. coli* potwierdzono w badaniach na ohotnikach (24) jednak mechanizm, na drodze którego bakterie te powodowały wystąpienie sekrecji wody i elektrolitów pozostawał wciąż niezny. Dopiero pod koniec lat 80-tych XX w. wykazano, że bakterie *E. coli* należące do serotypów zaliczonych wcześniej do EPEC powodują powstanie charakterystycznych zmian morfologicznych w komórkach nabłonka jelitowego *in vivo* oraz w hodowlach komórkowych *in vitro* (6, 27). Efekt ten (wspomniany wcześniej AE) cechuje się zatarciem struktury mikroskospów oraz powstawaniem specyficznych wybrzuszeń błony cytoplazmatycznej enterocytów, do których przyłączone były komórki EPEC. Wybrzuszenia te

określane są obecnie terminem piedestałów (pedestals), których wysokość może sięgać nawet do 10 μm (27). Twory te wykonują ruch, umożliwiając tym samym poruszanie się bakterii na powierzchni komórek nabłonkowych gospodarza, z prędkością do 0,07 $\mu\text{m/s}$ (33). Dodatkowo, typowe zmiany histopatologiczne obserwuje się wewnątrz enterocytów, które związane są z gromadzeniem się włókien spolimeryzowanej aktyny (F-aktyna) oraz innych białek komórkowych – α -aktyny, taliny, ezryny i wiliny (8, 22). Oprócz EPEC, analogiczne zmiany typu AE wywołują też szczepy enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC), *Hafnia alvei* wyisobnionne od ludzi z biegunką, *Citrobacter rodentium* patogenny dla myszy jak też niektóre szczepy *E. coli* izolowane od świń, królików, cieląt i psów (4, 9, 11, 35, 41).

Mechanizmy adhezji szczepów EPEC

Badania wykonane przez Donnenberga i Kaperę (7) wykazały, że w patogenezie schorzeń biegunkowych na tle EPEC istotną rolę odgrywa adhezja komórek bakteryjnych do enterocytów jelita cienkiego. Stwierdzono, że w procesie tym uczestniczą przede wszystkim dwa rodzaje adhezyn, zwane fimbriami BFP (fimbrie tworzące wiązki; bundle forming pili) oraz białko nie mające struktury fimbrialnej, określane terminem intymina (14, 18). Wykazano następnie, że BFP odpowiedzialne są za tzw. zlokalizowaną adhezję (localized adherence; LA) szczepów EPEC do komórek linii HEp-2, i że właściwość ta determinowana jest przez produkty genów obecnych w DNA plazmidu o masie ok. 60 MDa (14). Utrata tego plazmidu prowadzi do zaniku zdolności enteropatogennych *E. coli* przyczepiania się w określonych miejscach komórek HEp-2 *in vitro* natomiast przeniesienie DNA plazmidowego do komórek *E. coli* HB101 powoduje, że nabywają one właściwości adhezji do używanych linii komórkowych. W rezultacie, plazmid ten określono nazwą EAF (EPEC adherence factor) (21). Kolejne badania wykonane przez Girona i wsp. (13) wykazały, że niektóre EPEC wytwarzają fimbrie o średnicy ok. 7 nm, które tworzą rodzaj wiązek i są odpowiedzialne za wzajemne łączenie się komórek *E. coli*. Stwierdzono też, że surowica anti-BFP znacząco chociaż niecałkowicie, zmniejsza zdolność szczepów EPEC do przyczepiania się *in vitro* do komórek linii HEp-2. Niewątpliwie fimbrie te biorą udział w tworzeniu się agregatów bakteryjnych EPEC, ale nie jest dokładnie wiadomo jaka jest ich rola w bezpośredniej adhezji *E. coli* do enterocytów *in vivo* i komórek linii tkankowych *in vitro*.

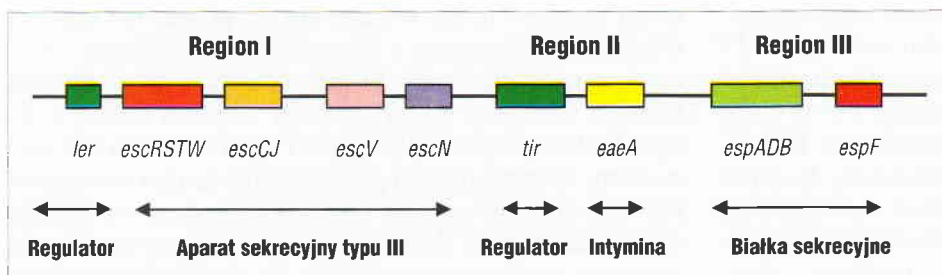
Ekspresja fimbrii BFP na poziomie molekularnym zależna jest od szeregu genów, zlokalizowanych w jednym operonie plazmidu EAF. Najbardziej istotnym genem tego operonu jest *bfpA*, kodujący główną podjednostkę strukturalną fimbrii BFP o masie 19,5 kDa, składającą się ze 180 aminokwasów strukturalnych i 13 aminokwasów peptydu sygnałowego (36). Wykazano, że białko BFP wykazuje ścisłą homologię z fimbriami typu IV, wytwarzanymi przez bakterie *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Moraxella bovis* (24). Ekspresja *in vitro* fimbrii BFP

zależy od szeregu czynników: fazy wzrostu komórek bakteryjnych, temperatury inkubacji, koncentracji jonów wapniowych i amonowych oraz podwyższonej zawartości CO_2 w atmosferze. W optymalnych warunkach, już po 30 minutach hodowli, szczepy EPEC BFP⁺ wykazują autoagregację, tworząc małe skupiska bakterii, czego nie obserwuje się w rutynowych bulionowych pożywkach hodowlanych typu LB lub TSB (40). Stwierdzono również, że do ekspresji powierzchniowej adhezyn BFP konieczna jest aktywacja genu chromosomalnego *dsbA*, kodującego enzym oksydoreduktazę, niezbędny element do tworzenia się mostków dwusiarczkowych aminokwasów strukturalnych białka BFP (12).

Oprócz genu *bfpA*, operon plazmidu EAF zawiera inne geny strukturalne i regulatorowe, z których najważniejsze to kluster 3 genów określanych jako *perA*, *perB* i *perC*, kodujący aktywator transkryptazy Per (plasmid encoded regulator), odpowiedzialny za koordynację ekspresji szeregu genów chromosomalnych i plazmidowych, odgrywających różną rolę w procesie patogenezy infekcji jelitowych na tle EPEC. Regulator Per wpływa w istotny sposób na ekspresję ważnych odcinków chromosomalnych *eeA* i *espB* (patrz niżej) jak też genów odpowiedzialnych za wytwarzanie białek pozabłonkowych o masach 33 i 50 kDa (24). Stwierdzono również, że aktywacja genu *bfpA*, kodującego podjednostkę strukturalną plazmidowych fimbrii BFP, jest w znacznym stopniu zależna od aktywacji chromosomalnego operonu *per*. Ostatnio (12) wykazano także pozytywny wpływ regulatora Per na ekspresję białka adhezyjnego intyminy, wytwarzanego przez szczepy EPEC oraz enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC) (patrz niżej).

Szereg badań wykonanych z użyciem wrażliwych linii komórkowych *in vitro* (np. HEp-2, HeLa) wykazało, że ekspresja fimbrii BFP u szczepów EPEC związana jest ze wspomnianą wyżej zlokalizowaną adhezją (LA) tych komórek do enterocytów jelitowych (6, 12, 18, 21, 34). Zjawisko to cechuje się tworzeniem mikrokolonii bakteryjnych, przylegających do określonych miejsc (zwykle biegunkowych) używanych komórek linii tkankowych. Jak wynika z doświadczeń Stone i wsp. (37) w procesie tym komórki *E. coli* wiążą się z receptorem nabłonkowym komórki eukariotycznej, a następnie taka mikrokolonja powiększa się przez dołączanie kolejnych EPEC i ich systematyczne podziały. Proces ten nie jest hamowany *in vitro* obecnością mannozy, co jednoznacznie wskazuje, że nie biorą w nim udziału fimbrie typu F1 (40).

Z uwagi na to, że plazmid EAF i związane z nim fimbrie BFP występują tylko u niektórych szczepów grupy EPEC, Nataro i wsp. (28) podzielili tę grupę patogennych *E. coli* na dwie klasy: klasa I to typowe (klasyczne) EPEC, cechujące się powstawaniem fenotypu zlokalizowanej adhezji LA, należące do określonych grup serologicznych (O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142), natomiast klasa II to tzw. atypowe EPEC, które przyczepiają się do enterocytów inaczej niż w skupiska LA lub też nie posiadają w ogóle zdolności adhezji przy pomocy fimbrii. Rola tej drugiej grupy EPEC w patogenezie biegunki nie jest



Ryc. 1. Schemat przedstawiający organizację genową chromosomalnego odcinka DNA określanego nazwą wyspy patogenności LEE enteropatogennych szczepów *E. coli* (szczegóły w tekście)

dokładnie wyjaśniona. Szczepy te są zwykle izolowane od dzieci, zarówno z zaburzeniami ze strony przewodu pokarmowego, jak też od zdrowych.

Z ostatnich badań *in vitro*, wykonanych przy użyciu enterocytów pobranych z jelita cienkiego dzieci (tzw. hodowle IVOC; *in vitro* organ culture), a więc z użyciem modelu maksymalnie zbliżonego do środowiska naturalnego jelita wynika, że w procesie początkowej adhezji EPEC do powierzchni śluzówki, oprócz fimbrii BFP biorą też udział inne czynniki kolonizacyjne (12). Potwierdziły to badania wykonane z mutantami bakteryjnymi, pozbawionymi plazmidu EAF lub też genu *bfpA*. W tych przypadkach komórki *E. coli* posiadały jednak ciągle zdolność zasiedlania enterocytów i wywoływania w nich zmian morfologicznych typu AE, ale bez możliwości tworzenia mikrokolonii, charakterystycznych dla EPEC o fenotypie LA (typowe EPEC klasy I). Z tych też względów Frankel i wsp. (12) sugerują, że obecność fimbrii BFP nie jest niezbędna w pierwszym etapie przyczepiania się bakterii do nabłonka jelitowego. Z drugiej jednak strony, badania *in vivo* wykonane na ochotnikach, którym podawano dostnie szczep *E. coli* O111:NM, posiadający gen *bfpA* i wykazujący powierzchniową ekspresję czynnika kolonizacyjnego BFP, doprowadziły do rozwoju biegunki u 11 spośród 13 zakażonych osób. W przeciwieństwie do tego, po podaniu izogenicznego mutantu O111:NM pozbawionego markera *bfpA*, zmiany chorobowe obserwowano tylko u 2 z 16 zakażonych ochotników (3).

Czynniki chorobotwórczości EPEC kodowane przez chromosomalny DNA

Niezwykle istotnym elementem genetycznym, biorącym udział w determinowaniu szeregu czynników chorobotwórczości szczepów EPEC jest tzw. wyspa patogenności (pathogenicity island) chromosomalnego DNA, określana terminem LEE (locus of enterocyte effacement). Jest to fragment o masie 35,6 kb, cechujący się znacząco niższą zawartością zasad C i G (38,3%) w porównaniu z resztą genomu bakteryjnego *E. coli* (50,8%), co wskazuje na jego egzogenne pochodzenie i horyzontalny transfer od innych drobnoustrojów (26). Odcinek LEE u szczepów EPEC opisano po raz pierwszy w 1995 r. u izolatu E2348/69 ale stwierdzono następnie, że występuje on też u innych drobnoustrojów: enterokrwotocznych *E. coli* (EHEC), *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium* i mikroorganizmów nie należących

do grupy AE (attaching effacing), ale nie jest obecny u fizjologicznej flory jelitowej (12). DNA wyspy patogenności LEE szczepów EPEC składa się z 11 konserwatywnych otwartych ramek odczytu (ORF). Geny te zorganizowane są w trzy podstawowe regiony (I-III) (ryc. 1), w skład których wchodzi następujące markery:

- region I: gen *ler* (LEE encoded regulator), pozytywnie regulujący transkrypcję genów wyspy patogenności LEE oraz szeregu genów *esc* kodujących białka efektorowe, odpowiedzialne za aparat sekrecyjny typu III;
 - region II: zlokalizowany w środkowej części LEE, składający się z genów *tir* (translocated intimin receptor), warunkującego syntezę i ekspresję receptora Tir dla białka adhezyjnego intyminy oraz *eaeA*, determinującego wytwarzanie przez EPEC intyminy;
 - region III: znajdują się w nim geny *esp* dla białek efektorowych EspA, EspB i EspD, wydzielanych przez aparat sekrecyjny typu III oraz gen odpowiedzialny za syntezę białka EspF (21 kDa), którego rola w patogeniezie biegunki na tle EPEC nie jest wyjaśniona. Wykazano bowiem, że mutacja fragmentu *espF* nie wpływa na tworzenie się zmian morfologicznych AE enterocytów, zakażonych bakteriami EPEC.
- Istotną rolę w aktywności molekularnej wyspy patogenności LEE odgrywa niewielki gen *ler*, który pozytywnie reguluje transkrypcję poszczególnych odcinków DNA regionów I-III. W procesie tym bierze też udział operon *per* plazmidu EAF, aktywujący zarówno transkrypcję genu *ler*, jak też genów warunkujących ekspresję intyminy (*eaeA*) i aparatu sekrecyjnego typu III (gen *espB*).

Odcinek LEE poddano sekwencjonowaniu i wykazano, że 41 genów występujących u szczepów EPEC obecnych jest też u izolatów *E. coli* należących do grupy enterokrwotocznych (EHEC), zwłaszcza serotypu O157:H7. Obie wyspy patogenności cechowały się też wysoką homologią nukleotydową (93,3%), zwłaszcza na poziomie genów kodujących aparat wydzielniczy typu III (98-100% identyczności). Stosunkowo mniejsze podobieństwo molekularne wykazywał natomiast operon *eaeA*, występujący zarówno u EPEC jak i EHEC (87,23%) podczas gdy geny *tir* i *esp* cechowały się znacznego stopnia różnorodnością nukleotydową ale wykazywały jednocześnie analogiczne funkcje sekrecyjne i regulatorowe (30).

Mechanizmy chorobotwórczego działania szczepów EPEC

Najwięcej informacji dotyczących roli i mechanizmów patogennego działania produktów genowych insertu LEE dotyczy genów *eaeA*, kodującego wytwarzanie białka adhezyjnego intyminy, genu *tir*, determinującego uwalnianie swoistego dla intyminy autoreceptora Tir oraz operonów kodujących białka wydzielnicze Esc (aparat sekrecyjny typu III).

Intymina. Białko to posiadające masę cząsteczkową 94-97 kDa, będące produktem genu *eaeA* (ryc. 1) (nazwa pochodząca od *E. coli* attaching effacing), zostało po raz pierwszy opisane przez Jersego i wsp. (19). Gen *eaeA* występuje u wszystkich szczepów EPEC, zarówno klasy I jak i II, EHEC, *C. rodentium*, *H. alvei* brak go natomiast u enterotoksycznych *E. coli* (ETEC) i bakterii normalnej flory jelitowej. Intymina wykazuje dość dużą homologię aminokwasową z białkiem odpowiedzialnym za właściwości inwazyjne bakterii rodzaju *Yersinia* (12). Wykazano, że elementem odpowiedzialnym bezpośrednio za adhezję intyminy do receptora Tir jest fragment zbudowany z 280 aminokwasów, znajdujący się na jej końcu karboksylowym, a zwłaszcza odcinek tworzący pętlę 76 aminokwasową z mostkiem dwusiarczkowym między cysteinami w pozycjach 862 i 937 (12). Ekspresja powierzchniowa intyminy, aktywowana przez gen regulatorowy *per*, zależy w dużym stopniu od fazy wzrostu i warunków hodowli bakterii *in vitro*. Jest ona największa pod koniec okresu logarytmicznych podziałów komórek i na początku fazy stacjonarnej, w temperaturze inkubacji 37°C, w bogatych pożywkach używanych do hodowli tkankowych, wzbogaconych dodatkowo NaHCO₃. Stwierdzono też, że synteza intyminy zostaje zahamowana po uwolnieniu receptora Tir i połączeniu się z nim powierzchniowych cząstek tego białka adhezyjnego (20, 32).

Wykazano, że intymina występuje w szeregu odmianach i wariantach, różniących się sekwencją i składem aminokwasowym. Wyróżniono 5 jej podstawowych form, oznaczanych jako alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) i epsilon (ϵ) (29). Dalsze badania potwierdziły, że intymina α występuje zwłaszcza u szczepów EPEC klasy I, cechujących się zlokalizowaną adhezją do komórek nabłonkowych *in vitro*, podczas gdy intymina β związana jest ze szczepami EPEC należącymi do klasy II oraz *E. coli* grupy EHEC, a więc przyczepiającymi się w różnych miejscach na powierzchni używanych linii komórkowych (12). Wydaje się, że różne rodzaje intyminy cechują się nieco odmiennym tropizmem do enterocytów *in vivo*. Intyminy α i β (typowe dla EPEC) warunkują powstawanie zmian AE głównie w jelicie cienkim podczas gdy wariant γ (typowy dla szczepów EHEC grupy O157) determinuje powstanie tych zmian histopatologicznych przede wszystkim w enterocytach jelita grubego.

Receptor Tir. Tir, białko o masie cząsteczkowej ok. 78-80 kDa, stanowi ciekawy przykład receptora bakteryjnego, który w warunkach fizjologicznych nie jest obecny na powierzchni komórek eukariotycznych, ale jest cząstką pochodzenia bakteryjnego (produkt genu *tir* operonu LEE), wbudowywaną w błonę enterocytów i ich frakcję cytoplazmatyczną, poddawaną następnie fosforylacji (5). Stwierdzono, że Tir składa się z trzech fragmentów: pozabłonowej domeny wystającej z powierzchni enterocytów, będącej miejscem interakcji z intyminą oraz dwóch domen, wbudowanych w błonę cytoplazmatyczną i frakcję wewnętrzną komórki eukariotycznej (12). Nie jest dokładnie poznany cel zachodzącej wewnątrzblonowo fosforylacji reszt tyrozyno-

wych cząstki Tir, ale wydaje się, że proces ten ułatwia wiązanie się receptora z intyminą oraz co istotne – stanowi sygnał dla komórki gospodarza, pod wpływem którego dochodzi do akumulacji włókien aktyny i innych białek cytoplazmatycznych (12). Proces ten jest elementem warunkującym powstawanie zmian histopatologicznych enterocytów (AE), a zwłaszcza tworzenia się piedestałów. Z drugiej jednak strony wykazano, że intymina może przyczepiać się do nieufosforylowanej formy receptora Tir jak też obserwowano, że Tir wytwarzany przez szczepy EHEC grupy O157:H7 nie podlega procesowi fosforylacji, pełniąc jednak funkcję pełnoprawnego receptora intyminowego (31). Dodatkowo stwierdzono, że izolowane białko intymina wykazuje adhezję do enterocytów, na powierzchni których nie stwierdzono obecności cząstek Tir (12). Wydaje się więc, że intymina posiada zdolność przyczepiania się nie tylko do autoreceptora Tir, ale również do innych, bliżej nieokreślonych struktur nabłonkowych komórek eukariotycznych.

System sekrecyjny typu III. Ten sposób przemieszczania się i przekazywania różnych cząstek z komórki bakteryjnej do komórki efektorowej gospodarza, typowy dla drobnoustrojów grupy EPEC, charakteryzuje się bezpośrednią translokacją białek efektorowych, z udziałem ATPazy i białka EscN, w obecności tzw. białek opiekuńczych (17). W procesie tym bakterie tworzą często cylindryczne struktury o średnicy ok. 50 nm i długości do 2 μ m, przez które, jak przez igłę strzykawki, przemieszczane są cząstki białek biorących udział w aktywacji i działaniu systemu wydzielniczego typu III szczepów EPEC (12, 16). Podstawową rolę odgrywają w tym białka EspA, z którego tworzą się cylindryczne kanały przekaźnikowe, oraz EspB, odpowiedzialne za adhezję EspA do rąbka szczoteczki mikrokosmków i tworzenia się w nim mikropor, przez które przenika następnie białko wydzielnicze (zwłaszcza EscC) i cząstki receptora Tir. Analogiczne pory w błonie cytoplazmatycznej komórki bakteryjnej są wynikiem działania białka EscC, będącego także produktem genowym operonu LEE (ryc. 1). System ten zwany jest często „molekularną strzykawką”, pozwalającą na iniekcje do enterocytów różnych białek modyfikujących działalność komórek gospodarza (12). Modyfikacja ta polega głównie na reorganizacji cytoszkieletu za pomocą białek G, które odpowiadają na pozakomórkową stymulację ze strony komórek EPEC i uwalnianych przez nie białek sekrecyjnych. Białka G komórek eukariotycznych posiadają zdolność aktywacji fosfolipazy C, co prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i stymulacji kinazy białkowej (PKC) (2). Efektem tych przemian jest reakcja komórek nabłonkowych, prowadząca zwykle do zaburzeń ich funkcji metabolicznych, czego końcowym rezultatem jest zniszczenie struktury mikrokosmków oraz utrata powierzchni absorpcyjnej i zaburzenie równowagi elektrolitowo-wodnej enterocytów. Szczególnie silne zaburzenia dotyczą jonów chlorkowych (sekrecja pozakomórkowa) oraz sodowych i potasowych (napływ do wnętrza komórki), występujące z udziałem zaktywowanej białkami wydzielniczy-

mi EPEC kinazy tyrozynowej PKC. Obserwuje się też zniszczenie połączeń międzykomórkowych nabłonka jelitowego co zwiększa jego przepuszczalność dla wody, a tym samym wzmacnia efekt biegunkowy (12, 25).

Podsumowanie

Enteropatogenne szczepy *E. coli* stanowią grupę patogenów jelitowych, których mechanizm działania nie jest ciągle do końca wyjaśniony. Intensywne badania prowadzone w ostatnich latach, zwłaszcza na poziomie molekularnym i komórkowym, pozwoliły wyjaśnić wiele elementów istotnych w patogenezie biegunki na tle EPEC jak też określić szereg mechanizmów wpływających na zmianę funkcjonowania i organizacji komórek eukariotycznych, zachodzących pod wpływem tych patogennych drobnoustrojów. Zaproponowano trójstopniowy model zakażenia szczepami EPEC, którego najbardziej istotnymi elementami są:

1. stosunkowo luźna adhezja komórek *E. coli* do enterocytów przy pomocy kodowanych plazmidowo fimbrii BFP. Fimbrie te warunkują też tworzenie się mikrokolonii bakteryjnych, umożliwiających przyleganie do błony cytoplazmatycznej komórek gospodarza;

2. aktywacja regulonu *per* plazmidu EAF, który wpływa pozytywnie na transkrypcję genu *eaeA*, kodującego powierzchniowe białko adhezyjne intyminy oraz na chromosomalny gen *ler*, aktywujący transkrypcję genu układu wydzielniczego typu III;

3. inicjacja kaskadowych reakcji enzymatycznych w komórce gospodarza, za pośrednictwem bakteryjnych białek efektorowych EspA, EspB i EspD, prowadząca do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, aktywacji kinazy tyrozynowej PKC i stymulacji fosforanu inozytoli. Efektem tych przemian jest reorganizacja cytoskieletu komórki eukariotycznej, tworzenie się piedestałów, nagromadzenie aktyny i powstanie typowych dla infekcji EPEC zmian histopatologicznych typu AE.

Wykonane badania przyniosły szereg odpowiedzi na wiele pytań dotyczących patomechanizmów działania bakterii EPEC, zwłaszcza na poziomie molekularnym. Wciąż jednak nie jest dokładnie wyjaśniony sam proces rozwoju biegunki na tle enteropatogennych *E. coli*, która stanowi problem zdrowotny u dzieci i u niektórych zwierząt.

Piśmiennictwo

- Albert M. J., Faruque S. M., Ansaruzzaman M., Islam M. M., Haider K., Alam K., Kabir I., Robins-Browne R.: Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* 1992, 37, 310-314.
- Barańska J.: Współzależność między szlakami przekazywania sygnałów w komórce – rola białka G w tych procesach. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1999, 53, 133-146.
- Bieber D., Ramer S. W., Cheng-Yen W., Murray W. J., Tobe T., Fernandez R., Schoolnik G. K.: Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1998, 280, 2114-2118.
- Cantey J. R., Blake R. K.: Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.* 1977, 135, 454-462.
- De Vinney R., Gauthier A., Abe A., Finlay B. B.: Enteropathogenic *Escherichia coli*: A pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol. Life Sci.* 1999, 55, 961-976.
- Donnenberg M. S., Kaper J. B., Finlay B. B.: Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* 1997, 5, 109-114.
- Donnenberg M. S., Kaper J. B.: Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1992, 60, 3953-3961.
- Donnenberg M. S.: Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 2000, 406, 768-774.

- Drolet R., Fairbrother J. M., Harel J., Helie P.: Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. *Can. J. Vet. Res.* 1994, 58, 87-92.
- Echeverria P., Orskov F., Orskov I., Knutton S., Scheutz F., Brown J. E., Lexomboon U.: Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. *J. Infect. Dis.* 1991, 164, 550-554.
- Fischer J., Maddox C., Moxley R., Kinden D., Miller M.: Pathogenicity of a bovine attaching effacing *Escherichia coli* isolate lacking Shiga-like toxins. *Am. J. Vet. Res.* 1994, 55, 991-999.
- Frankel G., Phillips A. D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J. B., Knutton S.: Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 1998, 30, 911-921.
- Giron J. A., Donnenberg M. S., Martin W. C., Jarvis K. G., Kaper J. B.: Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 1993, 168, 1037-1041.
- Giron J. A., Ho S. Y., Schoolnik G. K.: An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991, 254, 710-713.
- Holland R. E.: Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, 3, 345-375.
- Hueck C. J.: Type III protein secretion system in bacterial pathogenesis of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62, 379-433.
- Jarvis K. G., Giron J. A., Jerse A. E., McDaniel T. K., Donnenberg M. S., Kaper J. B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 7996-8000.
- Jerse A. E., Kaper J. B.: The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* 1991, 59, 4302-4309.
- Jerse A. E., Yu J., Tall B. D., Kaper J. B.: A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 7839-7843.
- Knutton S., Adu-Bobie J., Bain C. H., Phillips A. D., Dougan G., Frankel G.: Down regulation of enterin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect. Immun.* 1997, 65, 1644-1652.
- Knutton S., Baldini M. M., Kaper J. B., McNeish A. S.: Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 1987, 55, 78-85.
- Knutton S., Baldwin T., Williams P. H., McNeish A. S.: Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis for a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1989, 57, 1290-1298.
- Levine M. M., Edelman R.: Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infants with diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* 1984, 6, 31-51.
- Levine M. M.: *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 1987, 155, 377-389.
- Marewicz E.: Wpływ patogennych drobnoustrojów i ich toksyn na reorganizację cytoskieletu komórki. *Post. Mikrobiol.* 1996, 35, 79-96.
- McDaniel T. K., Jarvis K. G., Donnenberg M. S., Kaper J. B.: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 1664-1668.
- Moon H. W., Whipp S. C., Argenzio R. A., Levine M. M., Gianella R. A.: Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 1983, 41, 1340-1351.
- Nataro J. P., Kaper J. B., Robins Browne R., Prado V., Vial P., Levine M. M.: Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987, 6, 829-831.
- Nataro J. P., Kaper J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 142-201.
- Perna N. T., Mayhew G. F., Posfai G., Elliot S. J., Donnenberg M. S., Kaper J. B.: Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 1998, 66, 3810-3817.
- Rabinowitz R. P., Lai L. C., Jarvis K., McDaniel T. K., Kaper J. B., Stone K. D.: Attaching and effacing of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli* in the absence of detectable tyrosine kinase mediated signal transduction. *Microb. Pathogen.* 1996, 21, 157-171.
- Rosenshine I., Ruschowski S., Finlay B. B.: Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect. Immun.* 1996, 64, 966-973.
- Sanger J. M., Chang R., Ashton F., Kaper J. B., Sanger J. W.: Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surface of infected cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1996, 34, 279-287.
- Scateky I. C., Milania S. R., Trabulsi L. R., Travassos L. R.: Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1988, 56, 2979-2983.
- Schauer D. B., Falkow S.: Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* 1993, 61, 2486-2492.
- Sohel L., Puente J. E., Murray W. J., Vuopio-Varkila J., Schoolnik G. K.: Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol. Microbiol.* 1993, 7, 563-575.
- Stone K. D., Zhang H. Z., Carlson L. K., Donnenberg M. S.: A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the BFP ultrastructure. *Mol. Microbiol.* 1996, 20, 325-338.
- Thielman M. M.: Enteric *Escherichia coli* infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1994, 7, 582-591.
- Ulshen M. H., Rollo J. L.: Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man – another mechanism. *N. Engl. J. Med.* 1980, 302, 99-101.
- Vuopio-Varkila J., Schoolnik G. K.: Localised adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J. Exp. Med.* 1991, 174, 1167-1177.
- Zhu C., Harel J., Jacques M., Desautels C., Donnenberg M. S., Beaudry M., Fairbrother J. M.: Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* 1994, 62, 4153-4159.