

Received: 2009.02.23
Accepted: 2009.04.01
Published: 2009.04.27

Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej

Enterobacterial envelope proteins and their participation in pathogenicity and antibacterial immunity

Danuta Witkowska, Arkadiusz Bartyś, Andrzej Gamian

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

Streszczenie

W pracy opisano niektóre zagadnienia dotyczące chorobotwórczości i wirulencji wybranych przedstawicieli bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Na podstawie przedstawionej budowy osłony komórkowej tych bakterii omówiono strukturę i różnorodność funkcji białek błony zewnętrznej, które wyeksponowane na powierzchni komórki są dobrymi immunogenami. Białka te uczestniczą w stabilizacji struktury błony, wpływają na adhezję do innych komórek, służą jako receptory dla bakteriofagów, odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów komórkowych, w transporcie, procesach przetwarzania energii, warunkując prawidłowe funkcjonowanie komórki. Ponadto białka pełnią funkcje ochronne przed reakcjami immunologicznymi zakażonego organizmu. Na tle aktualnego piśmiennictwa omówiono badania własne dotyczące metod izolacji białek błony zewnętrznej, ich udziału w patogenności z uwzględnieniem zjawiska mimikry cząsteczkowej. Wyizolowane i scharakteryzowane enolazopodobne białko o ciężarze cząsteczkowym 45 kDa wykazując podobieństwo do enolazy ludzkiej nie może być składnikiem szczepionki, ale jest brane pod uwagę jako marker diagnostyczny. Przedstawiono także rezultaty badań nad udziałem białka błony zewnętrznej OMP38 rozpoznawanego przez układ immunologiczny człowieka jako ważny czynnik odporności przeciwbakteryjnej. Białko OMP38 jest brane pod uwagę nie tylko jako antygen lub nośnik w szczepionce koniugatowej, lecz także jako swoisty marker diagnostyczny niedoborów immunologicznych wykorzystywany do monitorowania poziomu odporności przeciw bakteriom z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Słowa kluczowe:

białka błony zewnętrznej • wirulencja • *Enterobacteriaceae* • mimikra cząsteczkowa • chorobotwórczość • odporność przeciwbakteryjna • szczepionki

Summary

The problems concerning the pathogenicity and virulence of some bacteria of the *Enterobacteriaceae* family are described. The structure and functional variety of the outer membrane proteins on the cell surface are presented as potent immunogens based on the structure of the cell envelope. These proteins participate in stabilization of the membrane structure and adhesion to other cells, are receptors for bacteriophages, and play a key role in signal transduction, intracellular transport, and energy transformation processes ensuring proper cell functioning. Moreover, these proteins have a protective function against immune reactions of the infected organism. Referring to current literature data, the authors' own results are reviewed on the methodology of isolating outer membrane proteins and their participation in pathogenicity with regard to molecular mimicry. The isolated and characterized 45-kDa enolase-like protein expressing similarity to hu-

man enolase should not be a component of vaccine, although it is considered a diagnostic marker of tissue damage. Presented are also results of studies on the role of the outer membrane protein OMP38, recognized by the human immune system as an important factor in antibacterial immunity. OMP38 is considered an antigen and carrier in conjugate vaccines, but also a specific diagnostic marker of immune deficiencies useful in monitoring the level of immunity against bacteria of the *Enterobacteriaceae* family.

Key words: outer membrane proteins • virulence • *Enterobacteriaceae* • molecular mimicry • pathogenicity • antibacterial immunity • vaccines

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=883994>

Word count: 10103

Tables: 3

Figures: 6

References: 264

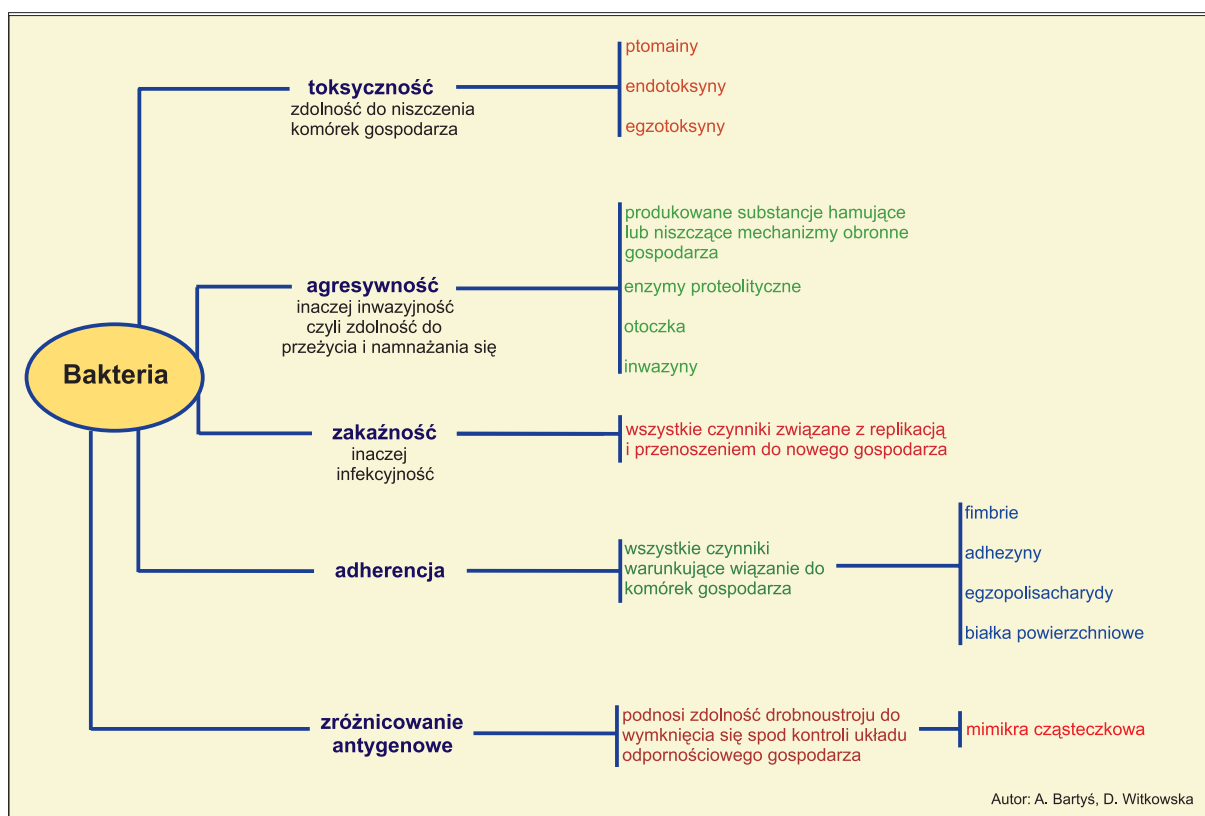
Adres autorki: doc dr hab. Danuta Witkowska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: witkows@iitd.pan.wroc.pl

1. BAKTERIE Z RODZINY *ENTEROBACTERIACEAE* I ICH CHOROBTWÓRCZOŚĆ

Chorobotwórczość czyli patogenność drobnoustroju, to zdolność do wywołania choroby w organizmie gospodarza z wystąpieniem klinicznie widocznych objawów, zależna też od wrażliwości organizmu gospodarza [58,225]. Drobnoustroje wyrażają swoją patogenność poprzez wirulencję, która określa ich stopień zjadliwości, zdolność do wywołania choroby tylko u gospodarza wrażliwego na te bakterie [35,36,37]. Jednoznaczne zdefiniowanie wirulencji nie jest proste. Według niektórych autorów wirulencja to nie jest niezależna cecha drobnoustroju, ponieważ ujawnia się dopiero w organizmie wrażliwego gospodarza. W związku z tym powinna być zawsze rozpatrywana w kontekście natury oddziaływań gospodarz-drobnoustroj [185]. Przez innych badaczy wirulencja definiowana była jako wewnętrzna właściwość drobnoustroju, która pozwala odróżnić drobnoustroje patogene od niepatogennych. Nie mniej jednak, biorąc pod uwagę fakt, że cechy organizmu gospodarza warunkują efekt oddziaływań drobnoustroj-gospodarz, ta ostatnia definicja jest raczej trudna do przyjęcia. Drobnoustroj nazywany wirulentnym jest awirulentny w organizmie gospodarza o swoistej odporności, a zazwyczaj awirulentny drobnoustroj wywołuje chorobę w organizmie człowieka z uszkodzonym układem immunologicznym [35,37]. Bakterie mogą być patogene nie będąc szczególnie wirulentne, jeśli powodują łagodną postać choroby u większości zainfekowanych osobników. Można zatem sądzić, że wirulencja to nie jest odrębna cecha drobnoustroju, lecz złożone, zmienne zjawisko, w którym uczestniczą zarówno elementy drobnoustroju jak i organizmu gospodarza, a także mają na niego wpływ czynniki środowiska (ryc. 1).

Należy podkreślić, że status immunologiczny gospodarza modyfikuje ekspresję czynników wirulencji bakterii, patogenność oraz możliwość spowodowania zniszczeń. Casadevall i Pirofski [35] uważają, że wirulencję bakterii definiuje obecność klasycznych atrybutów, takich jak: toksyczność, agresywność inaczej inwazyjność, zakaź-

ność inaczej infekcyjność, adherencja i wiązanie do komórek gospodarza oraz zróżnicowanie antygenowe [35,37]. Wirulencję bakterii warunkują cechy genetyczne, biochemiczne i strukturalne umożliwiające wywołanie choroby [136,192,234]. Dawniej sądzono, że czynnikami wirulencji są klasyczne składniki patogenu, których usunięcie powoduje brak wirulencji, bez wpływu na jego żywotność. Obecnie uważa się, że swoista inaktywacja genu lub genów wirulencji, powoduje zmianę lub brak wirulencji i mierzalną utratę chorobotwórczości. Natomiast rewersja lub podstawienie zmutowanego genu prowadzi do odbudowy chorobotwórczości, a przeciwciała przeciwko produktowi genu wirulencji chronią przed chorobą. Dwie szeroko pojęte cechy warunkujące wirulencję bakterii to agresywność i toksyczność [18,21,22,35,37,172,194]. W przypadku niektórych bakterii np. Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*), terminy te są trudne do oddzielenia, gdyż pewne toksyny (leukocydyny) warunkują zdolności drobnoustroju do wnिकnięcia, przeżycia i namnożenia się w organizmie gospodarza, a nie są one toksynami w takim znaczeniu jak toksyna błonicza [35]. Wynika z tego, że toksyczność i agresywność to często cechy od siebie zależne. Są szczepy bakterii toksyczne, ale mało agresywne, a także bardzo agresywne, ale słabo lub zmiennie toksyczne. Inwazyjność czyli zdolność wnikania bakterii do tkanek gospodarza, związana jest z mechanizmami warunkującymi zasiedlanie czyli kolonizację (adherencja i początkowe namnażanie) [42]. W przypadku pałeczek *Shigella* zdolność tę warunkują kodowane plazmidowo i chromosomalnie białka IpaA, Spa, Mxi oraz Vir [7,85,136,229]. Z wnikaniem pałeczek *Salmonella* do komórek gospodarza związane jest białko InvA, a białko LcrD warunkuje wnikanie pałeczek *Yersinia pseudotuberculosis* [7,80]. Inwazyjność to także zdolność bakterii do ominięcia lub przezwyciężenia mechanizmów obronnych gospodarza. Wytwarzanie pozakomórkowych substancji, które to wnikanie ułatwiają ma w tym przypadku również niebagatelne znaczenie [205]. Niektóre patogeny za pomocą białek powierzchniowych wiążą się do odpowiednich receptorów na komórkach eukariotycznych, uruchamiają szlak sygnałowy, a następnie



Ryc. 1. Klasykne atrybuty wirulencji bakterii [35,36,37,42,58,61,185,225]

mogą wnikać do nefagocytarnych komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego [42,83]. Dla pałeczek jelitowych charakterystyczne są dwa mechanizmy wnikania, z których jeden to mechanizm zamka (zipper) występujący u *Yersinia*, a drugi to mechanizm spustu (trigger) charakterystyczny dla rodzajów *Salmonella* i *Shigella*. U tych ostatnich kontakt między bakterią i komórką gospodarza jest związany z systemem wydzielniczym typu III (TTSS III) [28,42,83,202]. Bakterie występujące u człowieka są wyposażone w cząsteczki, takie jak fimbrie, adhezyny, polisacharydy otoczkowe, białka powierzchniowe, endotoksyny, enzymy, superantygeny, które pozwalają bakteriom zasiedlić komórki, przestrzenie międzykomórkowe, płyny ustrojowe i narządy gospodarza by przetrwać niekorzystne warunki [61]. Bakterie wykształciły też mechanizmy umożliwiające im dotarcie do komórek docelowych i manipulowanie wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowymi procesami, w celu wymknięcia się spod kontroli układu odpornościowego gospodarza [152,157,203,218]. Jednym z takich mechanizmów jest mimikra cząsteczkowa, czyli podobieństwo między antygenami bakterii i gospodarza, które sprawia, że odpowiedź na czynnik infekcyjny może wywołać reaktywność immunologiczną i prowadzić do rozwoju choroby autoimmunologicznej [87,130,131,241,256,262,263]. Patogenność bakterii i wrażliwość gospodarza mogą się zmieniać, bo bakterie stają się bardziej zjadliwe, a człowiek staje się na nie bardziej wrażliwy. Dlatego też w przypadku każdej infekcji bakteryjnej właściwa diagnoza uzależniona jest nie tylko od identyfikacji bakterii, lecz również od znalezienia związku między obecnością bakterii, a występującymi u pacjenta objawami klinicznymi choroby.

Do bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* należy ponad 160 różnych gatunków bakterii, z których większość stanowią warunkowe patogeny, a bezwzględnie chorobotwórcze znajdują się w rodzajach *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Yersinia* i *Citrobacter*. Połowa przypadków posocznicy notowanych w USA jest związana z bakteriami z rodzajów *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* czy gatunku *E. coli*, a śmiertelność w tych przypadkach waha się między 20–50% [202]. Zakażenia wywołane przez pałeczki *Klebsiella*, *Enterobacter* czy *Serratia*, to często zakażenia szpitalne, a nawracające zakażenia bakteriami z tej rodziny często występują u pacjentów, u których zdiagnozowano AIDS [166,199]. Nie bez znaczenia pozostaje również to, że wśród bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, notowany jest znaczny wzrost liczby szczepów opornych na antybiotyki [82,106,184,191,258].

Najlepiej poznanym gatunkiem w rodzinie *Enterobacteriaceae* jest *E. coli*, a patogenne szczepy tego gatunku zalicza się do różnych grup, w zależności od typu infekcji jaką wywołują [65,105]. Wymienić należy chorobotwórcze szczepy *E. coli*: enterotoksygenne (ETEC), enteropatogenne (EPEC), enterokrwotoczne (EHEC), enteroinwazyjne (EIEC), enteroagregacyjne (EAEC), uropatogenne (UPEC), a także szczepy odpowiedzialne za zapalenia otrzewnej, czy szczepy (MNEC) związane z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków [65,105,107,165]. Ciepłostabilne (ST) i ciepłolabilne (LT) toksyny, wytwarzane przez ETEC, wnikając do komórek gospodarza naruszają przepływ wody i jonów powodując biegunkę wydzielniczą, co u ludzi zdrowych może

być niezagrażającą życiu dokuczliwością [105], natomiast w przypadku niemowląt, ludzi starszych lub osób z uszkodzonym układem immunologicznym, może stanowić poważne zagrożenie i być nawet przyczyną śmierci [38,41]. Szczepy EPEC nie wytwarzają toksyn, ale wywołują charakterystyczne zmiany histopatologiczne w enterocytach, natomiast szczepy EHEC wywołują nie tylko zmiany histopatologiczne w komórkach nabłonkowych jelita, lecz również wytwarzają cytotoksynę (Stx, toksynę Shiga), która ma szkodliwy wpływ na komórki śródbłonkowe. Toksyna wnikając do krwiobiegu wędruje do nerek powodując uszkodzenie tego narządu [65,105]. Chorobotwórcze szczepy *E. coli* (UPEC) są także główną przyczyną wielu zakażeń układu moczowego [105].

Następstwem wniknięcia pałeczek *Shigella* do komórek nabłonkowych i rozprzestrzenienia się ich w śluzówce okrężnicy jest degeneracja nabłonka i zapalenie błony podstawnej [3,42,202,203], co prowadzi do złuszczenia i owrzodzenia śluzówki, a w konsekwencji do krwawienia, obecności czynników zapalnych oraz śluzu w świetle jelita i zniszczenia nieprzepuszczalnej bariery jelitowej [202,203,206]. Zakażenie pałeczkami *Shigella* określane mianem czerwionki bakteryjnej, występuje w liczbie 15000 przypadków rocznie w USA, natomiast w krajach rozwijających się rejestruje się około milion przypadków śmiertelnych, wynikających ze złych warunków sanitarnych. W krajach uprzemysłowionych zarejestrowano 1,5 miliona przypadków śmiertelnych [134,202], natomiast w Polsce notuje się rocznie 120–150 przypadków [221]. Do wywołania choroby wystarczy niewielka liczba 10–100 bakterii, które nie giną w kwaśnej treści żołądka. Często zakażenia takie występują u ludzi starszych i u dzieci w wieku 6 miesięcy – 5 lat [134,202], w tych grupach wiekowych takie zakażenie z powodu skutków jakie wywołuje w organizmie chorego, może stanowić zagrożenie życia [202,259].

Pałeczki *Salmonella* są czynnikiem etiologicznym zachorowań ludzi i zwierząt na całym świecie. Wyróżnia się dwie podstawowe postaci kliniczne: zatrucia pokarmowe (*Salmonella enteritidis* – gastroenteritis), przebiegające wśród objawów ograniczonych do przewodu pokarmowego oraz tzw. ‘gorączki durowe’ (jelitowe), w których dochodzi do uogólnienia procesu chorobowego w następstwie przeniesienia zarazki z jelit do krwiobiegu [89,150]. Bakterie docierając do jelita cienkiego penetrują tkankę. Wykazując zaś powinowactwo do komórek M wnikają do nich, kolonizują kępki Peyera i są wchłaniane przez makrofagi i tam się namnażają [1,97,206]. Wywołana przez bakterie odpowiedź zapalna uszkadza również komórki śluzówki, powodując biegunkę wywołaną złą absorpcją wody [201]. Dość powszechnym powikłaniem występującym po zakażeniu tymi bakteriami, jest zapalenie stawów ustępujące bez trwałego uszkodzenia stawów [81,86,134]. Niemniej jednak u osób bardzo młodych lub w zaawansowanym wieku i z niedoborem odpornościowym, może rozwinąć się postać ogólnoustrojowa, prowadząca do wstrząsu septycznego i śmierci [134]. Za właściwości chorobotwórcze tych bakterii odpowiada co najmniej 60 genów kodujących tzw. czynniki wirulencji i większość z nich kodowana jest przez geny umiejscowione w regionach bakteryjnego chromosomu zwanych wyspami patogenności. Regiony te są ograniczone sekwencjami insercyjnymi, genami bakteriofagów lub innymi ruchomymi elementami, a zawartość GC w ich obrębie różni

się od pozostałej części genomu, wskazując na ich pochodzenie od innych drobnoustrojów [58,128].

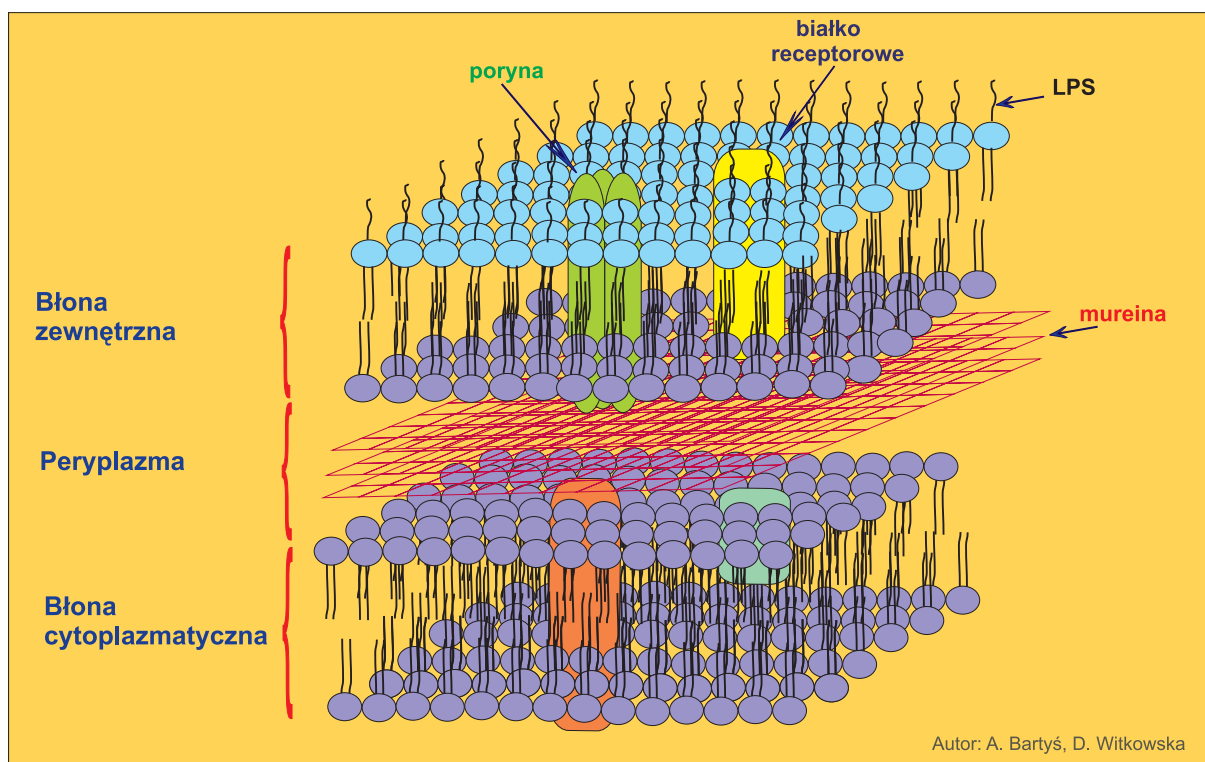
Yersinia, przenoszona z gryzoni i świń na człowieka, może się namnażać po wniknięciu do nieaktywowanych makrofagów. Większość makrofagów znajduje się w węzłach limfatycznych, gdzie pełnią rolę komórek prezentujących antygen, stąd też węzły są głównym miejscem infekcji [140,222], a odpowiedź zapalna na bakterie (*Yersinia pestis*) powoduje obrzęk węzłów limfatycznych [229]. Płuca również zawierają wiele makrofagów i bakterie mogą się przenosić z krwiobiegu do płuc wywołując dżumę płucną, a także rozprzestrzeniać się drogą kropelkową wywołując śmierć spowodowaną wstrząsem septycznym.

Zakażenie bakteriami organizmu gospodarza może powodować ostrą infekcję lub nieostre zakażenia chroniczne, ale wiadomo także, że skutki przebytych zakażeń i uznanych za wyleczone, mogą się ujawniać dużo później. Istnieje przekonanie, że u podłoża niektórych chorób o nieznaną dotąd etiologię leżą przebyte wcześniej zakażenia bakteriami [87,133,262,264]. Uważa się, że zespół Reitera (RS) rozwija się jako komplikacja u około 3% pacjentów, którzy przeszli zakażenie pałeczkami *Shigella flexneri* [15,86] lub *Yersinia pseudotuberculosis* [111,212], czy *Klebsiella pneumoniae* [68]. RS jest to choroba trudna do leczenia i prowadząca przede wszystkim do chronicznego stanu zapalnego w obrębie połączeń stawowych. Stwierdzono także, że po zakażeniach pałeczkami *Shigella dysenteriae* u dzieci może wystąpić hemolityczna uremia (HUS) powodująca prawie 50% śmiertelności chorych [65].

Wspomniane już wcześniej zjawisko mimikry cząsteczkowej, czyli występowania podobnych struktur na powierzchni komórki bakteryjnej do antygenów gospodarza, może znacznie opóźniać skuteczne działanie układu odpornościowego i sprawić, że nawet łagodne w przebiegu zakażenie może prowadzić do wytworzenia autoprzeciwciał, rozwoju reakcji krzyżowej, a w konsekwencji do choroby autoimmunologicznej, w której aktywność układu odpornościowego skierowana jest przeciwko własnym tkankom [108,239]. Choroba autoimmunizacyjna może zostać zapoczątkowana przez kompleksy antygen-przeciwciała zbyt długo przebywające w krążeniu [68,87,131,241]. Autoimmunizacja dotyczy nie tylko odpowiedzi humoralnej, lecz poprzez oddziaływanie autoreaktywnych limfocytów T z epitopami antygenów gospodarza, angażuje także odpowiedź komórkową, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia tkanek [130]. Do najczęściej cytowanych przykładów schorzeń autoimmunologicznych związanych z bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* należy choroba Gravesa-Basedowa, zeszytniające zapalenie stawów i przewlekły gościec postępujący [20,86,87,148,239,241,262,263].

2. BUDOWA OSŁONY KOMÓRKOWEJ BAKTERII Z RODZINY ENTEROBACTERIACEAE

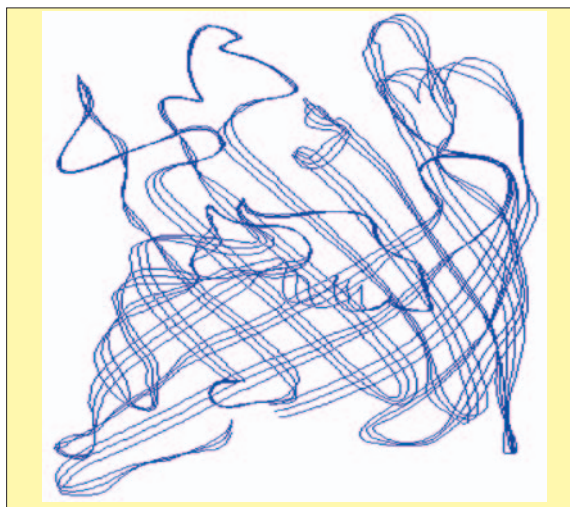
Osłona komórkowa (cell envelope – CE) bakterii to unikalna i wielofunkcyjna struktura warunkująca charakterystyczny kształt bakterii, chroniąca bakterię przed zmieniającym się ciśnieniem osmotycznym, stanowiąca podstawę dla elementów powierzchniowych bakterii, takich jak fimbrie czy rzeski [24]. Chroni ona bakterie przed środowiskiem zewnętrznym jakim może być układ odpornościowy



Ryc. 2. Struktura osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych [9,24,25,59,104,123,124,126,144,194,223,231,237]

gospodarza, a jej składniki są materiałem antygenowym rozpoznawanym przez układ immunologiczny człowieka. Osłonę komórkową bakterii Gram-ujemnych tworzy cytoplazmatyczna błona wewnętrzna (inner membrane – IM) i ściana komórkowa (cell wall – CW) czyli błona zewnętrzna (outer membrane – OM) wraz z peptydoglikanem i peryplazmą. Asymetryczną zewnętrzną błonę OM i wewnętrzną również dwuwarstwową błonę IM oddziela przestrzeń peryplazmatyczna zawierająca 2–3 warstwy peptydoglikanu [25,258]. Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych jest wytrzymała na ekstremalne temperatury i pH, jest mocna i elastyczna [123,124,258] (ryc. 2).

Błona zewnętrzna (OM) jest półprzepuszczalna, ma pory i nie jest tak szczelna jak błona cytoplazmatyczna [126]. Zarówno substancje odżywcze, jak i szkodliwe produkty metabolizmu muszą przechodzić przez błony komórki bakteryjnej, a odpowiednie mechanizmy zapewniają bakterii właściwy kierunek transportu tych substancji. OM zbudowana jest z białek, fosfolipidów i lipopolisacharydu. Białka stanowią około 50% jej masy i odgrywają ważną rolę w patobiologii bakterii Gram-ujemnych [126,237]. Jako cząsteczki wyeksponowane na powierzchni komórki są dobrymi immunogenami, stymulują odpowiedź immunologiczną gospodarza, są ważnymi czynnikami w rozwoju oporności drobnoustrojów, działają zarówno na powierzchni jak i wydzielane są przez bakterie [75,237]. Pełnią one funkcję integralnych białek spinających dwuwarstwą lipidową, lub jako lipoproteiny, których część jest kowalentnie związana z peptydoglikanem, warunkują stabilność ściany komórkowej i błony zewnętrznej (lipoproteina Brauna). Wiązanie lipoprotein z peptydoglikanem zachodzi poprzez N-końcową grupę C-końcowej lizyny lipoproteiny, z grupą karboksylową każdej 10–12 reszty kwasu di-aminopimeli-

Ryc.3. Schemat β-baryłki bakteryjnych białek błony zewnętrznej (OMP-38 *S. flexneri* 3a) [według: E. Ziomka dane nieopublikowane]

nowego (DAP) peptydoglikanu. Na każdą cząsteczkę lipoproteiny związanej z peptydoglikanem, przypadają dwie cząsteczki niezwiązanej [126]. Integralne białka OM zbudowane są z hydrofobowych segmentów transbłonowych, które zazwyczaj mają budowę typu β i reprezentują najbardziej konserwatywną część struktury. Transbłonowe odcinki β-nici są bogate w glicynę, reszty tryptofanu i tyrozyny [125,223]. Białka budujące kanały dyfuzyjne, przez które przechodzą wszystkie hydrofilowe substancje, to poryny, klasyczne białka transbłonowe. Pospolitym motywem strukturalnym białek transbłonowych błony zewnętrznej jest β-baryłka (ryc. 3).

Jest ona złożona z co najmniej 8 (OmpA) do 22 (FhuA) przeciwnoległych β -nici przylegających z jednej strony do części peryplazmatycznej, a z drugiej strony z długimi pętlami wyeksponowanymi na zewnątrz [125,175,176]. Baryłka przebija całą błonę, a pionowo ułożone nici przechodzą w jeden kanał. Światło porów ograniczone jest przez dłuższą pętlę wewnątrz tego kanału, co wyznacza wielkość porów i cząsteczek transportowanych [223]. Unikalne β -baryłki, warunkują zasadnicze funkcje błony, takie jak stabilność, integralność i przepuszczalność [33]. Wyeksponowane na zewnątrz pętle łączą β -nici i tworzą β -domeny odpowiedzialne za określone funkcje. Są one związane z rozpoznawaniem ligandów np. małych cząsteczek odżywczych, takich jak cukry czy kompleksy żelazo-siderofor, czynników toksycznych (np. kolicyn), czy bakteriofagów oraz eukariotycznych komórek docelowych dla patogenów bakteryjnych [2,125]. W badaniach z użyciem mutantów wykazano, że geny kodujące regiony pozamembranowe baryłki, zarówno skróty w peryplazmie, jak i pętle wyeksponowane na powierzchni, często ulegają delekcji lub insercji [114,120,121]. Stąd też istnieje przypuszczenie, że elementy te nie zawierają informacji topogenicznych, związanych z docelowym rozmieszczeniem białka. Natomiast fragmenty transmembranowe baryłki spełniają istotną rolę w prawidłowym umiejscowieniu białka [125]. Poziom ekspresji białek błonowych jest uzależniony od potrzeb komórki bakteryjnej i od czynników środowiska [187], a duże możliwości adaptacyjne bakterii odgrywają niezmiennie ważną rolę w ich patogeniezie [147]. Białka główne (major proteins) występują w dużej liczbie kopii, w odróżnieniu od białek drugorzędnych (minor proteins), których ekspresja w błonie jest zależna od potrzeb komórki. Do białek głównych należą: OmpA, OmpC, OmpF, OmpX, a białkami drugorzędnymi są: PhoE, LamB, FhuA, FepA [126]. Rola białek w błonie zewnętrznej jest bardzo różnicowana. Warunkują one dynamikę oddziaływań między komórkami bakteryjnymi a środowiskiem. Są one również odpowiedzialne za integralność komórki, stabilizację struktury błony i wiązanie jej ze sztywną warstwą mureiny. Białka te wpływają na zjawisko adhezji do innych komórek i wiązanie różnorodnych substancji, służą jako receptory dla swoistych bakteriofagów, wreszcie pełnią funkcje ochronne przed reakcjami immunologicznymi organizmu.

Lipopolisacharyd (LPS), to składnik błony zewnętrznej zwany także endotoksyną. Jest glikokonjugatem składającym się z trzech podstawowych regionów: wielocukru O-swoistego, regionu rdzeniowego oraz lipidu A [194]. Wielocukier O-swoisty zwany także antygenem O, to najbardziej peryferyjna część cząsteczki LPS, zbudowana z powtarzających się podjednostek oligocukrowych, w skład których wchodzi do ośmiu reszt cukrowych. Charakterystyczna jest zmienność w składzie cukrowym, rodzajach wiązań i podstawień w wielocukrach O-swoistych, a skład chemiczny antygenów O jest bardzo różnicowany, zarówno w obrębie rodzajów jak i gatunków bakterii [95,109,110,122,196,238]. Wielocukry O-swoiste lipopolisacharydu warunkują immunoswoistość komórki bakteryjnej, chronią bakterie przed litycznym działaniem przeciwciał i dopełniacza, nie dopuszczają do zniszczenia komórki bakteryjnej przez składniki surowicy i komórki fagocytyczne [91,99,100,208]. Region rdzeniowy lipopolisacharydu jest zbudowany z zewnętrznego regionu heksozowego i wewnętrznego hepto-

zowego, dodatkowo z unikalnym składnikiem jakim jest Kdo (kwas-3-deoksy-oktulozonowy), wiążącym część cukrową z lipidem A [194]. Najbardziej konserwatywną częścią LPS jest lipid A, który u większości bakterii Gramujemnych zawiera część cukrową złożoną zwykle z dwóch cząsteczek glukozaminy, połączonych wiązaniami β 1,6, w których grupy aminowe i hydroksylowe podstawione są kwasami tłuszczowymi zawierającymi 10–20 atomów węgla. Glukozamina od końca nieredukującego związana jest z częścią rdzeniową LPS. Lipid A to toksyczny składnik endotoksyny [194,258]. Lipopolisacharyd pełni ważną funkcję w utrzymaniu odpowiedzialnej przepuszczalności błony komórkowej oraz stanowi barierę przed wnikaniem do komórki bakteryjnej wysokocząsteczkowych substancji, takich jak antybiotyki, substancje toksyczne czy sole kwasów żółciowych. Jest on również odpowiedzialny za część objawów chorobowych obserwowanych w czasie zakażeń wywołanych przez bakterie [53,258]. Do efektów biologicznych jego działania należą: miejscowe reakcje skórne, wstrząs endotoksyczny, leukocytoza, gorączka, obniżenie ciśnienia krwi czy agregacja płytek krwi. LPS jest także mitogeny dla limfocytów B, indukuje wytwarzanie interferonu i ma właściwości adiuwantowe [72,158,261]. U niektórych bakterii występują także polisacharydy otoczkowe, które jako najbardziej zewnętrzna część ściany komórkowej uczestniczą w procesie adhezji bakterii do komórek gospodarza, a także chronią bakterie przed odvodnieniem.

Błona zewnętrzna to filtr molekularny dla związków hydrofobowych, które w zależności od ich masy cząsteczkowej przechodzą przez nią wolniej lub szybciej. Wykazuje ona natomiast dużą przepuszczalność dla cząsteczek hydrofilowych o ograniczonych wielkościach, uwarunkowanych średnicą kanałów porynowych [11]. Z błoną zewnętrzną są związane takie wypustki bakteryjne jak fimbrie, czy przechodzące przez nią, a zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, rzęski. Fimbrie, to relatywnie krótkie wyrostki, ważne w procesie wiązania się komórki bakteryjnej do zasiedlanej przez nią powierzchni stałej, na której bakterie często tworzą rodzaj biofilmu [228]. Są one heterokompleksami, w skład których wchodzi główne podjednostki białkowe (fimbrylina), tworzące strukturę wypustki i monomery mniejszych podjednostek, odpowiedzialne za wydłużanie wypustki, jej stabilność oraz funkcje adhezyjne. Do najlepiej poznanych należą fimbrie typu 1 obecne u większości gatunków rodziny *Enterobacteriaceae*, charakteryzujące się zdolnością wiązania łańcuchów oligomannozowych glikoprotein występujących na powierzchni komórek i w płynach ustrojowych gospodarza [112,113,135]. Na końcu fimbrii typu 1 znajduje się białko adhezyjne FimH, które poprzez wiązanie z receptorem daje kolonizację określonej powierzchni przez bakterie [144]. Zdolności adhezyjne ufimbriowanych bakterii umożliwiają im przyleganie do różnych powierzchni nabłonkowych, czy też do erytrocytów powodując ich hemaglutynację. Bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* wywołujące wiele poważnych zakażeń mają na swojej powierzchni wiele wypustek fimbrialnych [63,101,219]. Często utrata zdolności wytwarzania fimbrii wiąże się z utratą chorobotwórczości bakterii [163]. W błonie zewnętrznej oprócz fimbrii, zakotwiczone są również dłuższe, białkowe tzw. pilusy płciowe typu F, związane z przekazaniem materiału genetycznego w trakcie koniugacji [52,216,219]. Dłuższe od fimbrii białkowe wyrostki,

przechodzące przez ścianę komórkową, a zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej i warunkujące zdolność poruszania się niektórych bakterii, to rzęski. Aparat rzęskowy zbudowany z około 25 różnych białek składa się z systemu pierścieni tworzących ciało podstawowe, struktury przypominającej hak oraz z włókna rzęskowego [27], polimeru zbudowanego z 20000–30000 kopii helikalnie zwinionych łańcuchów jednego typu białka – flagelliny. System pierścieni i struktur o charakterze prętów stanowiący ciało podstawowe, to ten element rzęski, który umożliwia jej poruszanie się w środowisku. Zdolność do ruchu to ważny czynnik warunkujący rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie gospodarza, jest także brana pod uwagę jako czynnik chorobotwórczości bakterii [260].

Błona cytoplazmatyczna to selektywna bariera zbudowana z dwuwarstwy fosfolipidowej zawierającej białka. Występują w niej fosfolipidy, takie jak fosfatydyloetanolamina (70%), fosfatydyloglicerol (20%) i kardiolipina (10%) oraz białka pełniące funkcje transportowe, białka enzymatyczne związane z biosyntezą fosfolipidów, lipopolisacharydu, peptydoglikanu i innych składników osłony komórkowej [59,94,126]. Występują tam również białka związane z systemem przekazywania sygnału, włączając w to zarówno szlaki generujące energię, takie jak łańcuch oddechowy, a także i szlaki zużycia energii przez białka związane z poruszaniem wici czy też transhydrogenazy i permeazy [59,94]. Białka IM, w przeciwieństwie do integralnych białek OM, osadzone są w błonie za pomocą silnie hydrofobowych α -helikalnych segmentów transmembranowych. Sądzi się, że różnice w strukturze fragmentów transmembranowych białek IM (głównie nici typu α) i OM (głównie nici typu β), są konsekwencją wymagań niezbędnych do przemieszczania się łańcuchów polipeptydowych przez błonę cytoplazmatyczną. Zakłada się, że zbyt duża hydrofobowość mogłaby działać jako tzw. „sekwencja stopująca transfer” i w ten sposób hamować właściwe rozmieszczenie białka [43,125]. Do głównych funkcji IM należy selektywna przepuszczalność. Mechanizmy warunkujące tę funkcję to m.in. bierna dyfuzja gazów (N_2 , O_2 , CO_2) lub małych nienaładowanych polarnych cząsteczek (etanol, woda, mocznik). Dla IM charakterystyczny jest także transport substancji z wykorzystaniem nośników, takich jak białka transportowe (np. transport jonów potasu z wykorzystaniem uniporterów, transport wody przez akwaporyny). Charakterystyczny dla IM jest również aktywny transport, do którego konieczne są zarówno białka transportowe jak i ATP [59,94]. W aktywnym transporcie związanym z IM biorą udział: antyportery, symportery, białka substratowo swoiste systemy ABC, czy enzymy systemu PTS (phosphotranspherase system) związane z transportem glukozy, mannozy czy fruktozy [84,195].

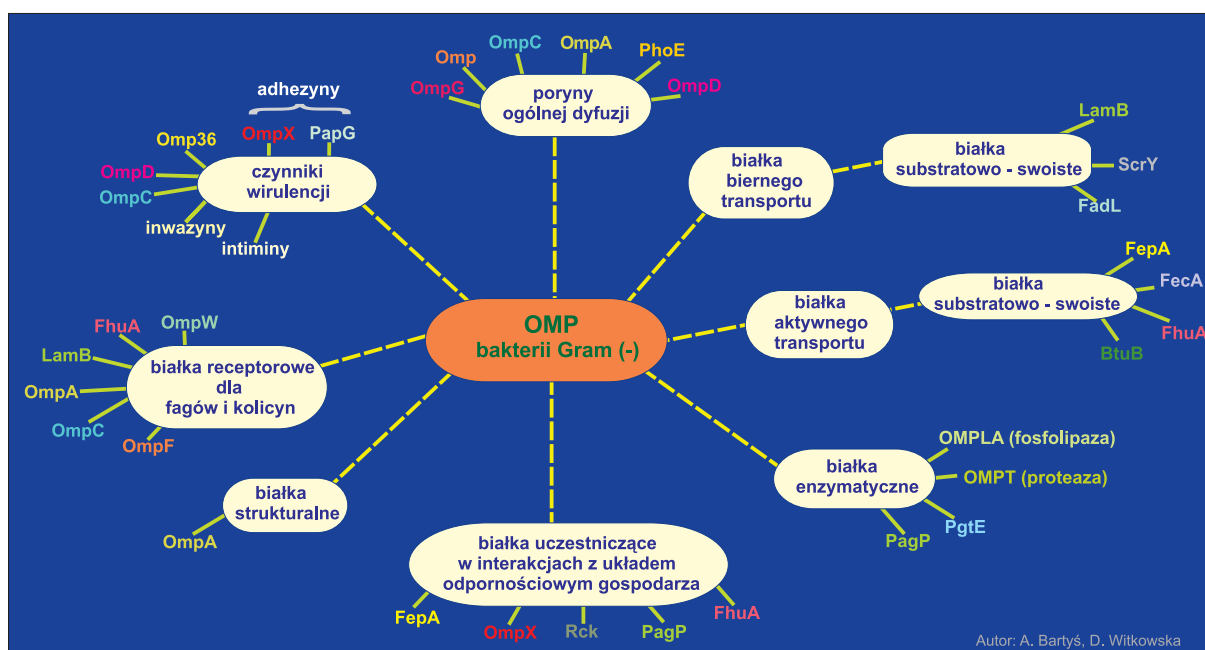
W ścianie komórkowej bakterii jest obecny peptydoglikan zwany także mureiną. Tworzy on u bakterii Gram-ujemnych cienką warstwę i stąd są one mniej odporne na czynniki szoku mechanicznego niż bakterie Gram-dodatnie z grubszą warstwą peptydoglikanu. Peptydoglikan jest zbudowany z połączonych wiązaniami β 1,4 glikozydowymi powtarzających się reszt N-acetylglukozaminy (NAG) i kwasu N-acetylmuraminowego (NAM), do którego przyłączony jest tetrapeptyd [231]. Syntetyzowane w cytosolu monomery peptydoglikanu z udziałem baktopenoli, czyli złożonych cząsteczek lipofilowych, są transportowane przez błonę cy-

toplazmatyczną. Następnie z udziałem transglikozydaz są one wbudowywane w już istniejący peptydoglikan, tworząc długie liniowe wstążki. Baktopenol nie tylko przenosi podjednostkę mureiny przez błonę cytoplazmatyczną, ale służy także jako substrat w biosyntezie. Między warstwami peptydoglikanu transpeptydazy tworzą poprzeczne mostki i dzięki temu powstaje ciągła, elastyczna sieć, zbudowana z równolegle ułożonych polimerów wielocukrowych połączonych peptydami [23]. Warstwa peptydoglikanu otaczająca błonę cytoplazmatyczną nadaje bakterii charakterystyczny kształt i chroni cytoplazmę bakterii przed lizą osmotyczną [231].

Między błoną zewnętrzną a cytoplazmatyczną jest przestrzeń peryplazmatyczna, miejsce aktywności wielu rozpuszczalnych białek uczestniczących w transporcie, przekazywaniu sygnału i chemotaksji. W przestrzeni peryplazmatycznej występują oligosacharydy. Są tam również białka transportowe zaangażowane w transport arabinozy, maltozy, galaktozy, histydyny, leucyny i wielu innych aminokwasów, aminocukrów, fosforanów, witaminy B_{12} czy witaminy B_1 [9,25,104]. Przestrzeń peryplazmatyczna to miejsce enzymów, takich jak asparaginaza, alkaliczna fosfataza, karboksypeptydaza II, endopeptydaza I. Występują w niej również enzymy, które inaktywują antybiotyki np. beta-laktamazy, fosfotransferaza neomycyny i inne enzymy degradujące. Przestrzeń peryplazmatyczna to ważny region, w którym sygnały pochodzące zarówno ze środowiska zewnętrznego jak i cytoplazmy bakterii, są przetwarzane i zachodzi odpowiednio synteza czy też sekrecja.

3. BIAŁKA BŁONY ZEWNĘTRZNEJ, BUDOWA I FUNKCJE

Białka błony zewnętrznej (OMP) to niezbędne elementy oporności drobnoustrojów na substancje chemiczne, ponieważ błona komórkowa to pierwsza bariera jaką napotykać czynniki antybakteryjne. Zdolność do jej penetracji to warunek niezbędny by zahamować podział lub zabić bakterię [237]. Z biomedycznego punktu widzenia są to również ważne składniki docelowe dla nowych leków i antybakteryjnych szczepionek. Białka błony zewnętrznej syntetyzowane są w cytoplazmie. Do ich przemieszczenia konieczna jest sekwencja sygnałowa, która następnie jest odcinana przez peptydazę sygnałową, a białka uwalniane są do peryplazmy, gdzie następuje pofałdowanie przed wbudowaniem ich w błonę zewnętrzną. Kolejne etapy biogenezy OMP nie są jednak dokładnie poznane [164,167,223,232]. W badaniach *in vitro*, w przypadku wielu białek błony zewnętrznej obserwowano spontaniczne fałdowanie białka wewnątrz dwuwarstwy lipidowej. Być może w warunkach *in vivo* jest to również proces spontaniczny i niewymagający energii metabolicznej. Istnieje hipoteza, że białka wiążą się i fałdują razem z lipopolisacharydem w przestrzeni peryplazmatycznej i tylko jako formy wstępnie pofałdowane w kompleksie z LPS mogą być wbudowywane w błonę zewnętrzną [223]. Integralne białka błony wewnętrznej (IM) mają zazwyczaj strukturę α -helisy, zaś dla białek błony zewnętrznej (OM) jest charakterystyczna β -baryłka, częściowo omówiona już w rozdziale 2. Budowę β -baryłki określa liczba β -nici oraz wartość liczby S (shear number). Ta ostatnia jest miarą nachylenia kąta β -nici w stosunku do osi baryłki i charakteryzuje oddziaływania między niemi [211]. Każda nić związana jest przez wiązanie wo-



Ryc. 4. Różnorodność funkcji białek błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych [16,17,26,33,57,62,70,71,103,126,129,137,147,153,159,176,188,200,211,220,233,236,237]

dorowe ze skierowaną przeciwnie do siebie sąsiadującą nicią, co warunkuje stabilność i prowadzi do wytworzenia pojedynczej β -harmonijki, która związa się i tworzy strukturę cylindryczną. Zależność między liczbą nici i wartością S najlepiej ilustruje porównanie budowy β -baryłki białek OmpX i OmpA. Obydwa białka to 8-niciowe β -baryłki różniące się wartością liczb S (dla OmpX $S=8$, a dla OmpA $S=10$), co w konsekwencji oznacza, że OmpA tworzy większą baryłkę niż OmpX [211,238]. Ze względu na pełnione funkcje białka błony zewnętrznej można podzielić na kilka grup (ryc. 4).

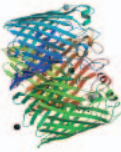
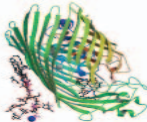
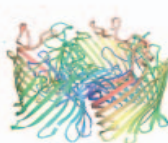
Do OMP należą zarówno białka strukturalne, enzymatyczne, klasyczne poriny, inaczej poriny ogólnej dyfuzji, a także białka biernego transportu, aktywnego transportu, białka uczestniczące w interakcjach z układem immunologicznym gospodarza, czynniki wirulencji oraz receptory dla bakteriofagów i kolicyn [126,129,211,223].

Jedną z ważniejszych funkcji błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych jest jej przepuszczalność, warunkowana przez poriny. Występują one w komórce w 200000 kopiach i charakteryzują się opornością na działanie proteaz, detergentów, rozpuszczalników organicznych, temperatury do 70°C i pH w zakresie 2,0–13,0 [2,8,126]. Poriny odgrywają ważną rolę jako determinanty patogenności, są wydzielane przez bakterie lub uwalniane na skutek ich lizy, mogą wchodzić w interakcje z czynnikami odpowiedzi komórkowej czy humoralnej gospodarza [75]. Niektóre bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* np. *Serratia marcescens* wykazują naturalną wysoką oporność na antybiotyki, która jest prawdopodobnie związana z formowaniem transmembranowych kanałów ograniczających dostęp antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej [187]. Redukcja poryn w ścianie komórkowej bakterii jest ściśle związana z obniżeniem ich oporności na antybiotyki β -laktamowe i wiele innych antybiotyków [90]. Białka porynowe mają także właści-

wości immunomodulatorowe [6,197]. Początkowo nazwę poryna stosowano jedynie dla białek budujących kanały nieswoistej dyfuzji. Obecnie nazwa ta używana jest często także w przypadku białek budujących kanały dyfuzji substratowo-swoistej, jak to jest w przypadku maltoporiny LamB [176]. Poriny tworzą kanały dla hydrofilowych cząsteczek różnego typu i uczestniczą w procesach ich biernego i aktywnego transportu [33,223]. Wiele z nich występuje w błonie w postaci monomeru, dimeru, pospolita jest również postać homotrimeru. Każdy monomer utworzony jest z określonej liczby β -nici. Powierzchnia poriny jest stosunkowo niepolarna i oddziałuje z węglowodorem rdzeniem błony, a wewnątrz kanału jest wyraźnie hydrofilowe i wypełnione cząsteczkami wody. Taka budowa jest związana z naprzemiennym występowaniem aminokwasów hydrofobowych i hydrofilowych wzdłuż każdej β -nici. W niciach tego typu istnieje wyraźna tendencja, by hydrofobowe i hydrofilowe aminokwasy zajmowały sąsiadujące miejsca [223]. Ogólna zasada przepuszczalności jest taka, że hydrofilowe roztwory przechodzą przez pokryte wodą kanały porynowe, dlatego cząsteczki lipofilowe przechodzą przez kanały porynowe dużo wolniej. Obecność cząsteczek wody wewnątrz kanału, jest konsekwencją występowania zasadowych i kwaśnych reszt aminokwasowych w przeciwstawnych miejscach kanału [177]. Najwięcej informacji dotyczących struktury poryn dostarczyłyby badania krystalograficzne, ale struktury kryształów niewielu z nich są znane. Białka błony zewnętrznej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* to cząsteczki wielofunkcyjne [126,211]. Struktury i funkcje niektórych z nich przedstawiają tabele 1 i 2.

Wśród wielu białek błony zewnętrznej unikalną budową wyróżnia się białko TolC należące do białek drugorzędowych (minor protein), ale bardzo ważnych ze względu na pełnioną funkcję. Białko to ma 2 domeny: membranową znajdującą się w błonie zewnętrznej o strukturze β -barył-

Tabela 1. Budowa i funkcje wybranych białek błony zewnętrznej (OmpA, OmpC, OmpF, FhuA, LamB) ściany komórkowej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* [16,17,26,33,57,62,70,71,103,126,129,137,147,153,159,176,188,200,211,220, 223,224,233,236]

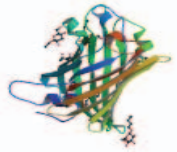
Białko	Struktura	Funkcje
	β-baryłka	
OmpA	 - monomer, 8-niciowa β-baryłka - jedno z białek głównych (major protein) - ma zdolność powrotu z formy rozfałdowanej do pofałdowanej wykazującej właściwości formy natywnej - gen ompA jest odporny na mutacje	- poryna ogólnej dyfuzji - białko strukturalne wiążące błonę zewnętrzną z peptydoglikanem - receptor dla fagów K3, M1, Tull* - receptor dla kolicyn K, L - czynnik wirulencji - uczestniczy w koniugacji bakterii
OmpC	 - trimer - monomerem jest 16-niciowa β-baryłka z krótkimi pętlami (T1-T8) w peryplazmie i długimi (L1, L2, L4-L8) na zewnątrz - białko homologiczne do OmpF i Omp36 - z systemem regulacji tego białka związane są białka błonowe EnvZ i OmpR	- poryna ogólnej dyfuzji - buduje kanały dla kationów - receptor dla fagów Tulb i Me1
OmpF	 - trimer - monomerem jest 16-niciowa β-baryłka - jedno z białek głównych (major protein) - białko homologiczne do OmpC i PhoE	- poryna ogólnej dyfuzji - buduje kanały dla kationów - receptor dla fagów Tulb i Me1
FhuA	 monomer 22-niciowa β-baryłka	- białko odpowiedzialne za aktywny transport kompleksu Fe-sideroforu - receptor dla fagów T1, T5, UC-1, F80 - receptor dla kolicyn -M, J25 - uczestniczy w interakcjach z komórkami układu - odpornościowego gospodarza
LamB	 - trimer - maltoporyna - monomerem jest 22-niciowa β-baryłka	- poryna substratowoswoista, tworzy kanały odpowiedzialne za bierny transport maltozy i maltodekstryn - receptor dla faga I

ki i peryplazmatyczną typu α . W odróżnieniu od typowych bakteryjnych OMP β -baryłka białka TolC zbudowana jest z 3 protomerów, z których każdy utworzony jest z czterech β -nici, baryłka jest otwarta i szeroko dostępna dla rozpuszczalników [129,236].

Adhezyny są tymi składnikami ściany komórkowej, które wiążąc się do swoistych receptorów obecnych na powierzchni komórki gospodarza, warunkują kolonizację i ochronę przed usunięciem bakterii. Większość bakterii używa jednej lub kilku adhezyn do zasiedlania gospodarza. Niektóre niefimbrialne adhezyny *E. coli*, to związane z amorfotycznymi strukturami błony zewnętrznej bakterii adhezyny rodziny Afa np. AfaE-III. Białka błony zewnętrznej *E. coli*, takie jak Ag 43, AIDA-I i TibA to adhezyny należące do klasy autotransporterów związanych z typem V systemu wydzielania [145]. Umieszczenie adhezyn i ich sposób zakotwiczenia w błonie wynikają

z budowy podjednostkowej (α i β) tych białek, a składnikiem błony zewnętrznej bakterii, który prawdopodobnie tworzy pory jest podjednostka β [145]. Adhezyna Ag43 uczestniczy w autoagregacji komórek bakterii, a jej występowanie jest ściśle skorelowane z możliwością tworzenia przez bakterie biofilmu. W ten sposób uropatogenne pałeczki *E. coli* zasiedlają pęcherz moczowy i tworząc biofilm mogą tam przetrwać przez wiele miesięcy [207]. Znane są adhezyny błony zewnętrznej *E. coli* nazywane intiminami α i γ , które uczestniczą w wiązaniu bakterii do komórek jelitowych gospodarza i uszkadzają kosmki jelitowe, doprowadzając do ich całkowitego zaniku [181]. Wszystkie intiminy to białka, które mają N-końcową część w peryplazmie i konserwatywną, przypominającą poryny, domenę transbłonową oraz C-końcową, pozakomórkową domenę wchodzącą w interakcje z receptorami. Intiminy to również białka błony zewnętrznej, które wiążą białka receptorowe obecne na powierzchni komórek gospodarza

Tabela 2. Budowa i funkcje niektórych OMP (OMPLA, OmpT, PagP, OmpX, ScrY) ściany komórkowej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* [16,17,26,33, 57,62,70,71,103,126,129,137,147,153,159,176,188,200,211,220, 223,224,233,236]

Białko	Struktura	Funkcje
	β-baryłka	
OMPLA	 - monomerem jest 16-niciowa β-baryłka - w obecności Ca^{2+} tworzy aktywny dimer	- fosfolipaza, której zadaniem jest hydroliza fosfolipidów prowadząca do destabilizacji błony - zaangażowana w proces uwalniania kolicyn
OmpT	 monomer, 10-niciowa β-baryłka	- serynowa proteaza z rodziny omptin - czynnik patogenności bakterii - aktywuje ludzki plazminogen - uczestniczy w degradacji defensyn
PagP	 monomer, 8-niciowa β-baryłka	- acylotransferaza związana z metabolizmem lipidów - odgrywa rolę w patogenie bakterii, przenosi z fosfolipidu resztę kwasu palmitynowego i wbudowuje ją do lipidu A. Palmitynowany lipid A chroni bakterie przed czynnikami obronnymi gospodarza - receptor dla fagów K20, Tula, T2
OmpX	 - monomer, 8-niciowa β-baryłka - syntetyzowana w dużych ilościach w warunkach ekstremalnych	- adhezyna - uczestniczy w interakcjach z układem odpornościowym gospodarza - czynnik wirulencji
ScrY	 - trimer - monomerem jest 18-niciowa β-baryłka	- porusza substratowo-swoista - odpowiedzialna za bierny transport cząsteczek sacharozy - białko homologiczne do LamB

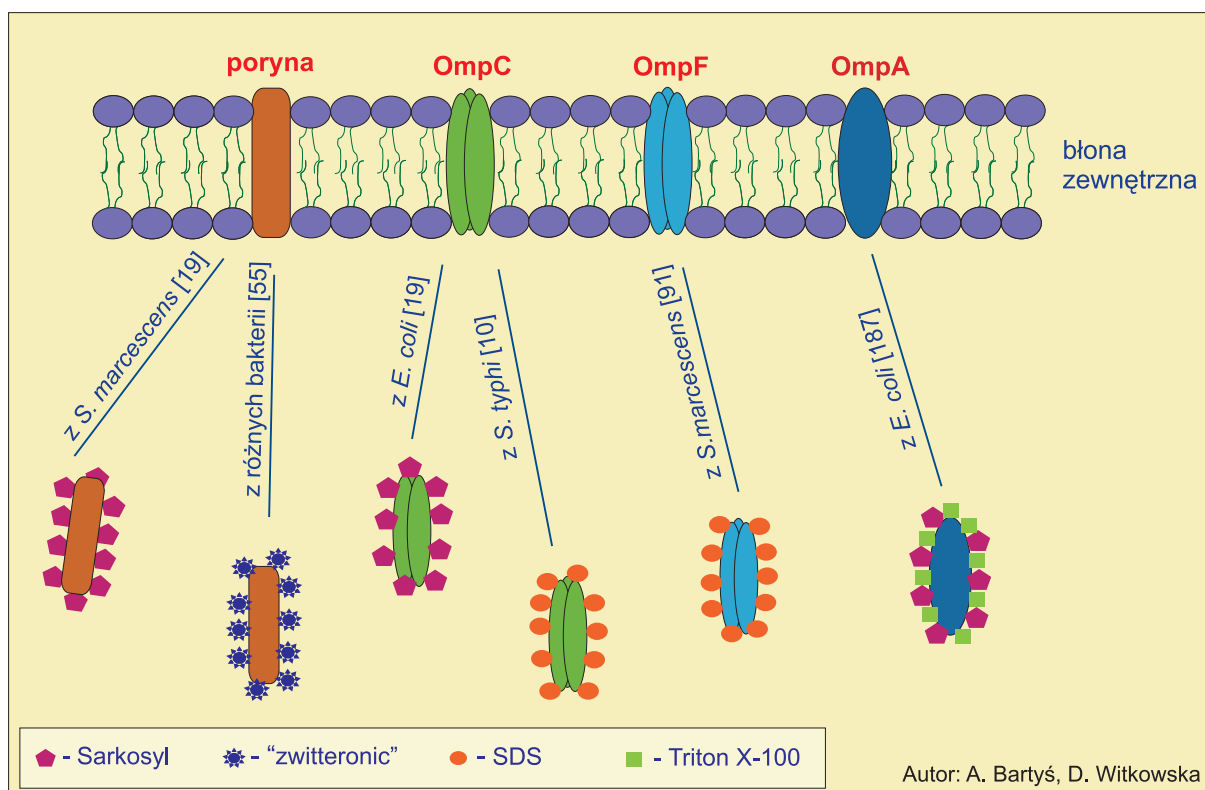
takie jak $\beta 1$ integryna i nukleolina [217]. Niektóre bakterie syntetyzują cząsteczki adhezyn nazywane inwazydami, które aktywują cytoszkielet komórki gospodarza i w ten sposób ułatwiają wejście bakterii do jego komórki. W błonie zewnętrznej *Y. pseudotuberculosis* występuje inwazyna, która wiążąc się do integryny komórek gospodarza, ułatwia wnikanie bakterii [92,93]. W wiązanie to zaangażowany jest pozakomórkowy C-końcowy fragment tej inwazy [93,200]. W komórkach nabłonkowych jelita, takich jak komórki M, pałeczki *Salmonella* wykorzystują adhezyny do wiązania się z mikrokosmkami komórek i w ten sposób otwierają je na działanie inwazy [42].

Białka błony zewnętrznej cechują się podobnymi zasadami budowy, mimo że pełnią różne funkcje, takie jak dyfuzja, transport, przekazywanie sygnału czy aktywność enzymatyczna. Podsumowując możemy powiedzieć, że białka bło-

ny zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych to ważne i wielofunkcyjne składniki błony [126,211].

4. METODY IZOLACJI I OCZYSZCZANIA BIAŁEK BŁONY ZEWNĘTRZNEJ

Białka ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych stanowią aż 50% błony zewnętrznej. Uważa się, że 1,5–2,5% genów bakterii Gram-ujemnych koduje β -baryłki OMP [126,240]. Badania ostatniej dekady wykazały także, że wiele białek błony zewnętrznej bakterii jest kojarzonych z określonymi schorzeniami. Do zrozumienia funkcji tych białek i ich udziału w patogenności bakterii ważne jest poznanie ich struktury, co z kolei może pozwolić na opracowanie skuteczniejszych leków. Poszukiwanie odpowiednich, wydajnych metod izolacji i oczyszczania białek jest w pełni uzasadnione. Łatwość z jaką można wydzielić białka (integralne i peryferyjne) z dwuwarstwy lipidowej wskazuje na stopień związania ich z błoną. Niektóre białka



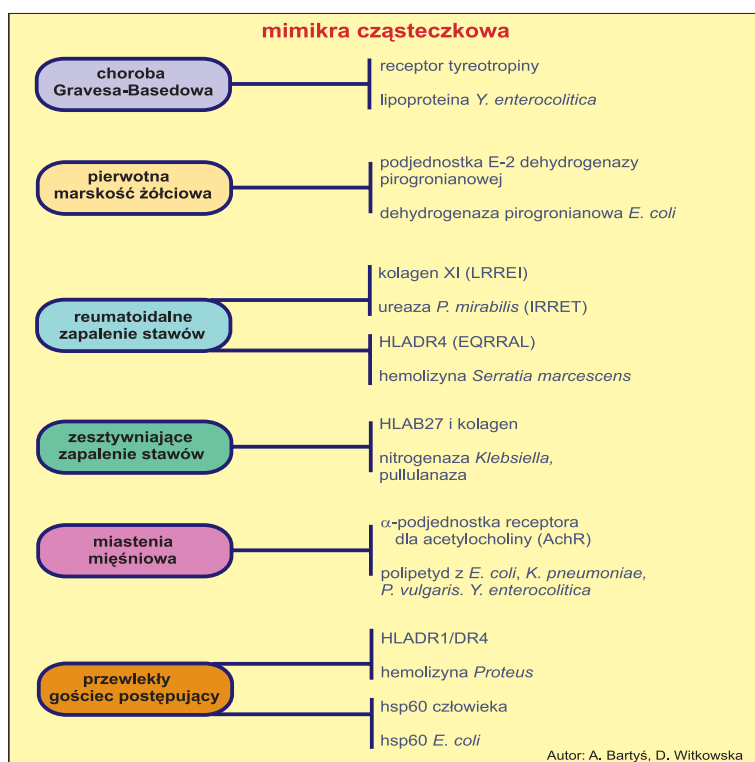
Ryc. 5. Metody izolacji białek błony zewnętrznej bakterii z użyciem detergentów [10,19,55,90,186,187,210]

(głównie peryferyjne) można łatwo rozpuścić i oddzielić od reszty błony używając stosunkowo łagodnych środków, takich jak np. 1M chlorek sodu. Błonowe białka integralne silnie oddziałują z węglowodorowymi łańcuchami lipidów błonowych i można je od nich uwolnić jedynie używając detergentów (ryc. 5).

Pierwszym i bardzo ważnym krokiem w ekstrakcji białek błonowych jest ich solubilizacja ze środowiska lipidowego, zależna głównie od wyboru odpowiedniego detergentu i jego stężenia, szczególnie wtedy, gdy chcemy oczyścić białka w formie natywnej. Przykłady takich zastosowań detergentów przedstawiono na ryc. 5. Jedną ze stosowanych od wielu lat metod izolacji białek OMP jest procedura wg Schnaitmanna [210] z wprowadzonymi przez autorów tej pracy modyfikacjami [244,245,247,252,256]. W tej metodzie niejonowym detergentem jest Triton X-100. Po rozbiciu komórek bakterii i usunięciu ich fragmentów, zastosowanie Tritonu X-100 w stężeniu 2% w buforze Tris-HCl o pH 7,6 z 10 mM $MgSO_4$ w obecności 5 mM EDTA jako czynnika chelatującego, pozwala po ultrawirowaniu uzyskać OMP w postaci rozpuszczonej. Dwukrotna ekstrakcja detergentem znacznie podwyższała wydajność uzyskiwanych preparatów białek błony zewnętrznej kilku gatunków bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* [244,245,247,252,256]. Obraz elektroforetyczny uzyskiwanych preparatów OMP z wielu szczepów różnych serotypów *Sh. flexneri* był podobny, z charakterystycznymi dwoma białkami głównymi o ciężarach cząsteczkowych 33 i 36 kDa. Wyjątek stanowił preparat OMP z *Sh. flexneri* 6, gdzie dwa białka główne miały ciężary cząsteczkowe oznaczone jako 32 i 37 kDa, co wyróżniało ten serotyp. Już wcześniej ze względu na inną wrażliwość na fagi oraz wła-

ściwości serologiczne i biochemiczne, był on traktowany jako odmienny wśród gatunku *Sh. flexneri* [244]. Metodą Schnaitmanna [210] wyizolowano także białka błony zewnętrznej 33 szczepów *H. alvei*. Okazało się, że białka główne tych preparatów OMP mają ciężar cząsteczkowy 34, 37, 39 i 41 kDa. W ścianie komórkowej wszystkich badanych szczepów występowało ciepłolabilne i wrażliwe na enzymy proteolityczne białko główne o ciężarze cząsteczkowym 34 kDa. Pozostałe białka główne (37, 39 i 41 kDa) to występujące w zmiennych ilościach białka związane z peptydoglikanem [242]. Poszukiwanie związku między różnicami jakościowymi i ilościowymi OMP a chorobotwórczością szczepów i otrzymanych z nich form niechorobotwórczych *Sh. flexneri* 3a i *Sh. sonnei* FI, nie dało satysfakcjonujących wyników [4,243].

W ostatnich latach Arcidiacono i wsp. [8] opracowali metodę izolacji białek porynowych *E. coli*, o dużej zawartości (76%) jednego z białek głównych jakim jest OmpF. Jest to jednostopniowa ekstrakcja z użyciem kwasu walerianowego. Liza komórek bakterii *E. coli* kwasem walerianowym i selektywna w nim rozpuszczalność OmpF, jest możliwa dzięki niezwyklej stabilności tego trimerycznego kompleksu. Oddziaływania elektrostatyczne i interakcje hydrofobowe, które stabilizują OmpF nie ulegają rozerwaniu w kwasie walerianowym. Zastosowanie jednoetapowej metody Arcidiacono i wsp. [8] do izolacji OMP *Sh. flexneri* 3a, znacznie skróciło i uprościło procedurę. Wydajność otrzymanego tą metodą preparatu OMP jest porównywalna z wydajnością preparatów OMP otrzymywanych z użyciem detergentu [210]. Oczyszczenie poszczególnych białek czy peptydów z mieszaniny jest ważnym zagadnieniem w biochemii białek. Chociaż w przypadku uzyskiwania czystych



Ryc. 6. Rola mimikry cząsteczkowej w etiopatogenezie niektórych schorzeń [87,130,131,152,155,203,218,241,256,262,263]

białek na skalę preparatywną preferowane są techniki chromatograficzne, niemniej jednak elektroforeza preparatywna w żelu poliakrylamidowym daje bardzo dobre rezultaty [252,253,256]. Metody elektroforetyczne są bardzo efektywne pod względem rozdzielczości, selektywności, szybkości, jak i relatywnie łagodnych warunków działania [78,160], są użyteczne zarówno dla hydrofilowych jak i hydrofobowych białek. Elektroforeza w połączeniu z techniką blotingu jest obecnie powszechnie stosowana w identyfikacji białek. El Hami i wsp. [64] otrzymywali białka główne, z wyizolowanej w gradiencie sacharozy błony zewnętrznej *Erwinia carotovora*, stosując elektroforezę preparatywną w obecności SDS. Zastosowana w naszym laboratorium elektroforeza preparatywna [143] z użyciem aparatu Prep Cell 491 BioRad, pozwoliła na oczyszczenie z pełnego preparatu OMP *K. pneumoniae* uzyskanego za pomocą Tritonu X-100 [210], białka o masie cząsteczkowej 45 kDa. Biorąc pod uwagę immunoreaktywność tego białka z przeciwciałami antyludzka enolazy mięśniowa, nazwano go białkiem enolazopodobnym, a oczyszczenie go pozwoliło na ustalenie, które fragmenty sekwencji aminokwasowej są identyczne z występującymi w sekwencji enolazy swoistej dla mięśni szkieletowych człowieka [256]. Kolejne białko oczyszczone do homogenności za pomocą elektroforezy preparatywnej, to jedno z białek głównych błony zewnętrznej *Sh. flexneri* 3a o masie cząsteczkowej 38 kDa nazywane przez nas OMP38 [252]. Białko to, po trawieniu trypsyną i rozdzieleniu uzyskanych peptydów za pomocą HPLC, analizowano z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii masowej LC-MS/MS. Analiza otrzymanych wyników za pomocą programu Mascot i ClustalW oraz porównanie sekwencji otrzymanych peptydów ze znanymi z baz danych NCBI i Swiss-Prot dla innych bakteryjnych białek błonowych, wykazała identyczność sekwencji peptydów do: omp1b z *Sh. flexneri* 2a gi/24113600, ompC z *E. coli* gi/9714150 oraz z białkiem

prekursorowym nmpC z *E. coli* gi/26247429. Znalaziono podobieństwo sekwencji peptydów białka OMP38 z *Sh. flexneri* do ompC: z *E. coli* (OMPC-ECOL6 Q8CVW1), *S. typhi* (OMPC-SALTI P0A264), *K. pneumoniae* (OMPC-KLEPN Q48473) [252].

5. UDZIAŁ BIAŁEK BŁONY ZEWNĘTRZNEJ W PATOGENNOŚCI, ZJAWISKO MIMIKRY CZĄSTECZKOWEJ

Główny układ zgodności tkankowej (MHC) jest odpowiedzialny za wiązanie i prezentację antygenów limfocytom T. Różnorodne receptory na komórkach T (TCR) i na komórkach B (BCR), są zdolne do rozpoznania wnikających czynników infekcyjnych [196]. Wytwarzane przeciwciała mogą unieczynniać drobnoustroje atakujące organizm lub neutralizować toksyczne produkty bakteryjne. Zadaniem układu odpornościowego jest odróżnienie tego co „obce” od tego co „własne” [131]. Wśród wielu mechanizmów chorobotwórczości, należy podkreślić istotne następstwo posiadania przez niektóre drobnoustroje struktur podobnych do antygenów gospodarza, nierozpoznawanych przez system immunologiczny gospodarza jako obcych. Mamy wtedy do czynienia ze zjawiskiem mimikry cząsteczkowej, polegającym na homologii strukturalnej, serologicznej lub biologicznej między bakteriami a gospodarzem [87,108,131,239,241,262,263]. Mimikra cząsteczkowa zatem może być strategią wykształconą przez patogeny, która umożliwia im wniknięcie do organizmu gospodarza, dotarcie do komórki docelowej, a następnie manipulowanie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi procesami w celu wymknięcia się spod kontroli układu odpornościowego gospodarza [54,130,241]. Dzięki tolerancji immunologicznej nie ma destrukcyjnego działania na własne antygeny, ale też obecna na powierzchni bakterii cząsteczka o strukturze podobnej do cząsteczki gospodarza, nie wywołuje natychmiastowej odpowiedzi immunologicznej.

Tolerancja immunologiczna na obce antygeny, lecz tożsame z własnymi strukturami powoduje, że bakteria nierozpoznana jako obcy czynnik może wnikać, migrować i namnażać się, prowadząc do zakażeń, a nawet wstrząsu septycznego [108]. W pewnych warunkach jednak, nawet niewielkie różnice między cząsteczkami czy determinantami antygenowymi bakterii i gospodarza, zostają rozpoznane i są wystarczające do wywołania antybakteryjnej odpowiedzi immunologicznej. Wtedy to, poprzez reaktywne limfocyty T, które oddziałują zarówno na antygeny bakterii, jak i na podobne do nich antygeny gospodarza, dochodzi do przerwania tolerancji na antygeny gospodarza, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia tkanek gospodarza. W ten sposób odpowiedź na antygen bakteryjny może powodować reaktywność autoimmunologiczną [130,224] i nawet łagodne w przebiegu zakażenie może prowadzić do rozwoju reaktywności krzyżowej, a w konsekwencji do choroby autoimmunologicznej [108]. Przykłady schorzeń, w których podobieństwo między strukturami białkowymi bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i antygenami człowieka odgrywa ważną rolę przedstawia ryc. 6.

Mimikra cząsteczkowa ma bardzo istotne znaczenie, dlatego też prowadzi się analizy białek powierzchniowych bakterii pod kątem ich podobieństwa do antygenów gospodarza. Przy konstruowaniu szczepionek i leków należy unikać indukcji autoprzeciwciał, niezależnie od tego czy białko ma pełnić rolę antygeny czy nośnika. Preparaty OMP uzyskane z wielu szczepów rodziny *Enterobacteriaceae* i stanowiące mieszaninę białek były badane pod kątem ich reaktywności z przeciwciałami skierowanymi przeciw ludzkiej enolazie mięśniowej. Zaobserwowano swoistą krzyżową reaktywność przede wszystkim w przypadku OMP z *K. pneumoniae*, lecz również z *E. coli*, *P. vulgaris*, *Citrobacter* czy *H. alvei* [256]. O swoistości świadczyło blokowanie tej reaktywności przez ludzką enolazę mięśniową oraz brak reaktywności preparatów OMP z surowicami: anty-*Propionibacterium propionicum*, anty-BSA czy z surowicą królika nieimmunizowanego [256]. Z nieopublikowanych jeszcze danych Pietkiewicz i wsp. wynika, że powierzchniowe białko enolazopodobne *K. pneumoniae* zachowuje natywną strukturę centrum katalitycznego enolazy. Świadczy o tym to, że całe komórki bakterii były zdolne do przemiany 2-fosfoglicerynianu w fosfoenolopirogronian (PEP), takiej samej jak przemiana zachodząca na szlaku glikolizy w cytoplazmie komórki. Być może powstający wysokoenergetyczny produkt, jakim jest PEP jest postacią magazynowania energii w najbliższym otoczeniu komórki. Ciekawym spostrzeżeniem była także krzyżowa reaktywność białka 45 kDa z różnych bakterii z surowicami pacjentów z chorobą Buergera i miażdżycą. Choroby te należą do schorzeń o nieznaney etiologii, ale infekcje bakteryjne są brane pod uwagę jako jeden z czynników sprawczych [66,183]. Obecność białka podobnego do ludzkiej α -enolazy wykazywano dotąd w warstwach powierzchniowych komórek Gram-dodatnich paciorkowców *Streptococcus pneumoniae* i *Str. pyogenes*, przypisując mu prawdopodobną rolę receptora plazminogenu [66,212]. Być może taką patogenną rolę może pełnić enolazopodobne białko błony zewnętrznej u badanych przez nas przedstawicieli *Enterobacteriaceae*. Układ plazminogen-plazmina to ważny i ściśle regulowany system proteolityczny. Patogenne bakterie mając na swojej powierzchni białka receptorowe plazminogenu, mogą zaburzać ten precyzyjny system proteolityczny [102,127,141,183,213].

Poprzez degradację krążących inhibitorów plazminy mogą wpływać na poziom ekspresji aktywatorów plazminogenu i aktywację inhibitorów [102,127,140,141,142,183]. Bakterie przez wpływ na niekontrolowaną proteolizę mogą się przyczyniać do degradacji bariery tkankowej i migracji bakterii do narządów i tkanek jako kolejnych miejsc infekcji, jak to się dzieje np. w przypadku *Y. pestis* – do węzłów limfatycznych [140,142,213]. Oczyszczone białko metodą elektroforezy preparatywnej poddano trawieniu trypsyną. Uzyskane w ten sposób peptydy rozdzielono metodą HPLC i poddano analizie za pomocą spektrometrii masowej oraz badanom porównawczym z wykorzystaniem baz danych NCBI nr i ClustalW. Białko to wykazywało podobieństwo sekwencji nie tylko do bakteryjnej enolazy z *Erwinia carotovora* (Blast gi/50122487; Blast/gi 16761724) oraz *S. typhi* CT18, ale także do ludzkiej enolazy mięśniowej. Kilka fragmentów białka miało sekwencje identyczne do sekwencji występujących w C-końcowej części ludzkiej enolazy mięśniowej, obejmującej zarówno domenę katalityczną jak i miejsca wiążące ligandy, odgrywające ważną rolę w funkcji nieenzymatycznej [256]. Sekwencje wspólne dla białka enolazopodobnego z *Klebsiella* i ludzkiej enolazy mięśniowej zaznaczono poniżej czcionką pogrubioną:

³⁰¹WATWTSFLSG VNIQIVGDDL TVTNPKRIAQ
AVEKKACNCL LLKVNQIGSV³⁵⁰ TESIQAACKLA
QSNGWGVMSVSHRSGETEDTF FIADLVVGLC
TGQIKTGAPC⁴⁰⁰ RSERLAKYNQL MRIEEALGDK
AIFAGRKFNR PKAK⁴³⁴

Oddziaływanie bakterii z układem plazminogen-plazmina może być regulowane poprzez warunki środowiskowe (obecność i stężenie jonów metali, pH). Enolaza do działania wymaga jonów Mg^{+2} , jeden jon to magnez konformacyjny, a drugi to jon katalityczny [31,32]. Wydzielone z komórek *K. pneumoniae* dwie formy enolazy: cytosolowa i błonowa różnią się zdolnością wiązania plazminogenu. Jedynie białko wydzielone z błony zewnętrznej komórek bakterii jest receptorem plazminogenu, co może świadczyć o występowaniu pewnych różnic strukturalnych w obu formach enolazy [12,161,182,183,190]. Istniejące różnice wynikające z potranslacyjnej modyfikacji mogą determinować oddziaływanie z plazminogenem [Bednarz I., praca doktorska].

Wykazanie mimikry danego antygeny czy cząsteczki jest uwarunkowane odpowiednią metodologią, pozwalającą na określenie rodzaju mimikry czy to strukturalnej, epitopowej inaczej serologicznej czy też funkcjonalnej. Kilka metod zastosowanych w tych badaniach pozwoliło jednoznacznie określić, że enolazopodobne białko 45 kDa spełnia warunki mimikry. Oznacza to przede wszystkim, że ten antygen, jak też cały wyjściowy preparat białek OMP, nie może być użyty do szczepionki. Istnienie w białku bakteryjnym epitopów podobnych strukturalnie do antygenów gospodarza, może indukować przeciwciała przeciw własnym strukturom białkowym gospodarza. Wyniki te oznaczają, że pełny preparat OMP może potencjalnie wzbudzać autoprzeciwciała i jako szczepionka nie jest bezpieczny.

6. UDZIAŁ BIAŁEK BŁONY ZEWNĘTRZNEJ W ODPORNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ

Białka błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych to struktury mające także właściwości immunogenne i wywołana

odpowiedź immunologiczna gospodarza może mieć przeciwbakteryjny charakter ochronny, a doniesienia o ochronnym działaniu OMP z *S. Typhimurium* pojawiły się już pod koniec lat siedemdziesiątych ub.w. [139]. Izolowane metodą Schnaitmana [209] preparaty OMP pałeczek *Sh. flexneri* 3a i *Sh. sonnei* FI są dobrymi immunogenami [5]. Podane podskórnie świnkom morskim chroniły je przed zapaleniem rogówki i spojówki wywołanym doświadczalnie za pomocą chorobotwórczego homologicznego lub heterologicznego szczepu bakterii. Działanie ochronne można było przenieść biernie na zwierzęta nieimmunizowane za pomocą surowicy z przeciwciałami [5]. Właściwości ochronne OMP potwierdzono także na modelu mysim [169,170,245,247,254,255]. Wykazano, że niewielkie dawki OMP (5 µg/mysz) różnych serotypów *Sh. flexneri* podane zwierzętom, chroniły je całkowicie przed rozwojem zakażenia po podaniu im dawki LD₁₀₀ chorobotwórczego szczepu *Sh. flexneri* 3a. Działanie ochronne obserwowano również po immunizacji zwierząt preparatami OMP izolowanymi z innych gatunków bakterii, takich jak *Sh. sonnei* FI, *E. coli* czy *H. alvei*, co mogło świadczyć o szerokiej swoistości takiej ochrony. Wcześniejsze przypuszczenia, że ochrona przed zakażeniem jest związana z białkami o masie cząsteczkowej 93 i 98 kDa, nie potwierdziły się [170]. Użyte do badań preparaty OMP zawierały niewielką ilość LPS (poniżej 5%), którego obecność oznaczano przez pomiar Kdo w preparatach metodą kolorymetryczną [235]. Przypuszczenie, że działanie ochronne OMP może być związane z obecnością LPS w preparatach wykluczono, przeprowadzając kolejne doświadczenia na szczepie myszy C3H/HeJ. Są to myszy z defektem genetycznym, których układ immunologiczny nie odpowiada na LPS. Stwierdzono, że immunizacja tych myszy niewielkimi dawkami (0,5–5 µg) białka *Sh. flexneri* 3a związanego z peptydoglikanem (PGP), chroniła je przed zakażeniem nie tylko śmiertelną dawką (LD₁₀₀) chorobotwórczego szczepu *Sh. flexneri*, ale także dawką 100 i 500 razy wyższą [169]. Przeciwbakteryjne działanie ochronne pojawiało się już po dwóch dniach od immunizacji i utrzymywało się do 12 tygodni po szczepieniu zwierząt. Uzyskane wyniki pozwalały przypuszczać, że za działanie ochronne może być odpowiedzialne jedno lub kilka białek głównych błony zewnętrznej *Sh. flexneri*. Badania modelowe dotyczące mechanizmów ochrony, jej swoistości oraz oceny możliwości wykorzystania przeciwbakteryjnych właściwości ochronnych wykazały, że wzbudzaną ochronę można przenieść na zwierzęta nieimmunizowane, za pomocą splenocytów pochodzących od zwierząt immunizowanych jedną lub kilkoma dawkami preparatu. Monitorując kinetykę odpowiedzi immunologicznej stwierdzono, że w pierwszym etapie po immunizacji ma ona charakter komórkowy. Aktywne komórki zdolne do przeniesienia właściwości ochronnych pojawiały się na trzeci dzień po immunizacji, a limfocyty T i B podane zwierzętom nieimmunizowanym, chroniły je przed śmiertelną dawką homologicznego chorobotwórczego szczepu *Sh. flexneri* 3a [252,253]. Poszukując wyjaśnienia roli makrofagów w indukowanej przez OMP odporności komórkowej, określono właściwości fagocytarne i bakteriobójcze makrofagów otrzymanych pochodzących od myszy immunizowanych różnymi dawkami OMP z *Sh. flexneri* 3a, w stosunku do homologicznego szczepu *Sh. flexneri* 3a lub *S. Typhimurium*. Stwierdzono, że tylko niewielkie dawki OMP (1 µg, 5 µg) działają na obydwie te cechy makrofagów stymulująco. Nieco wyższe dawki OMP

pozostawały bez wpływu lub działały supresorowo [46], zaobserwowano zatem immunomodulatorowe działanie preparatu. Udział odpowiedzi komórkowej wzbudzanej przez OMP z *Sh. flexneri* 3a potwierdziły badania nadwrażliwości typu późnego (DTH), którą można było przenieść na myszy nieimmunizowane, za pomocą splenocytów pochodzących od zwierząt, którym podano wcześniej OMP [171]. Immunomodulatorowe działanie preparatu OMP z *Sh. flexneri* 3a na odpowiedź komórkową, obserwowano również w doświadczeniu modelowym, badając wpływ OMP z *Sh. flexneri* 3a na nadwrażliwość typu późnego na krwinki baranie (SRBC). To stymulacyjne lub supresorowe działanie można było przenieść na zwierzęta nieimmunizowane za pomocą splenocytów myszy immunizowanych preparatem OMP [45]. Wykazano, że tylko populacja limfocytów T myszy immunizowanych preparatem OMP *Sh. flexneri* 3a jest odpowiedzialna za supresorowe działanie na nadwrażliwość typu późnego na SRBC [49]. Preparat białek błony zewnętrznej ze ściany komórkowej *Sh. flexneri* 3a działał również immunomodulacyjnie na indukowaną u myszy odpowiedź humoralną na SRBC [48]. Stwierdzono także immunomodulacyjny wpływ OMP *Sh. flexneri* 3a na wydzielanie przez mysie splenocyty i makrofagi: TNF i czynników zapalnych, takich jak IL-6 oraz IL-2 [50,51]. Utrzymywanie się przez długi okres u zwierząt przeciwbakteryjnej ochronnej odpowiedzi immunologicznej, wskazywało na odporność humoralną związaną z tym procesem, co potwierdziło badanie kinetyki tej odpowiedzi. Po jednorazowym podaniu niewielkiej dawki OMP z *Sh. flexneri* 3a pojawiały się w surowicy zwierząt przeciwciała na czwarty dzień po szczepieniu i utrzymywały się przez kolejne trzy tygodnie. Poziom przeciwciał w surowicy wzrastał po podaniu kolejnych dawek preparatu OMP i utrzymywał się przez 16 tygodni. Surowica z przeciwciałami podana zwierzętom nieimmunizowanym skutecznie chroniła je przed rozwojem zakażenia po podaniu dawki LD₅₀ nie tylko homologicznego szczepu, lecz także szczepów o innym serotypie, a nawet innego gatunku np: *Sh. sonnei*, *E. coli* czy *P. vulgaris* [245]. Potwierdzało to zaobserwowaną wcześniej szeroką swoistość ochrony, kiedy szczepiono zwierzęta preparatami OMP wyizolowanymi z kilku szczepów pałeczek należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, a immunizacja ta w różnym stopniu chroniła zwierzęta przed zakażeniem śmiertelną dawką (LD₁₀₀) homologicznego szczepu. Pełną ochronę stwierdzono w przypadku OMP z *E. coli* O111, *Sh. sonnei* i *P. vulgaris* (100%), a 80% ochrony uzyskano dla OMP z *S. Typhimurium*. W układach heterologicznych poziom ochrony był niższy (50–60%) i był najprawdopodobniej związany ze stopniem pokrewieństwa serologicznego między użytymi do zakażenia szczepami należącymi do tej samej rodziny *Enterobacteriaceae* [47,255]. Preparaty OMP *Sh. flexneri* 3a i *Sh. sonnei* FI jako potencjalne składniki szczepionek należało jednak poddać dalszemu oczyszczeniu ze względu na ich toksyczność, pirogenność i zdolność indukcji lokalnego odczynu Schwartzmana [246]. Interesujące wyniki badań nad OMP *Sh. flexneri*, stały się punktem wyjścia do izolacji i charakterystyki białek błony zewnętrznej *Hafnia alvei*. Stwierdzono, że OMP wielu szczepów *H. alvei* mają właściwości immunogenne i ochronne. Podanie zwierzętom nawet stosunkowo niewielkiej dawki (5 µg) OMP z *H. alvei* chroniło je przed zakażeniem śmiertelną dawką nie tylko homologicznego, lecz także heterologicznego szczepu *Hafnia*, a także w różnym stopniu przed za-

Tabela 3. Poziom przeciwciał klasy IgA i IgG anty-OMP38 *Sh. flexneri* 3a w surowicach ludzkich mierzony testem ELISA [252]

Grupy doświadczalne	Liczba	Wiek $\pm$ SD [#]	Anty-OMP IgA $\pm$ SD (p)*	Anty-OMP IgG $\pm$ SD (p)
Krwiodawcy	13	34,8 $\pm$ 10.9	0,6012 $\pm$ 0,509 (0,0392)*	1,5432 $\pm$ 0,291 (0,1322)
Dzieci zdrowe	15	5,4 $\pm$ 6,4	0,2720 $\pm$ 0,273	1,3038 $\pm$ 0,484
Dzieci z nawracającymi infekcjami	14	2,1 $\pm$ 3,1	0,2661 $\pm$ 0,226 (0,9503)	1,0496 $\pm$ 0,391 (0,1331)
Dzieci z wrodzonymi chorobami serca	30	7,1 $\pm$ 6.2	0,2977 $\pm$ 0,258 (0,7591)	1,2849 $\pm$ 0,461 (0,8990)
Dzieci z cukrzycą	16	9,4 $\pm$ 5,1	0,6325 $\pm$ 0,483 (0,0060)*	1,5729 $\pm$ 0,375 (0,0790)
Dzieci z nawracającymi infekcjami układu oddechowego	21	6,5 $\pm$ 4,5	0,2798 $\pm$ 0,167 (0,9159)	0,9878 $\pm$ 0,393 (0,0379)
Dzieci z niedoborem IgG	13	6,2 $\pm$ 5,2	0,0943 $\pm$ 0,132 (0,0422)*	0,6891 $\pm$ 0,340 (0,0007)*
Dzieci z niedoborem IgA	36	6,7 $\pm$ 4,5	0,0960 $\pm$ 0,165 (0,0073)*	0,9792 $\pm$ 0,329 (0,0076)*
Dzieci z niedoborem IgG i IgA	11	8.1 $\pm$ 4.9	0,1176 $\pm$ 0,237 (0,1459)	0,5113 $\pm$ 0,213 (0,0001)*
Osocze krwi pępowinowej	12		0,0793 $\pm$ 0,015 (0,0225)*	1,069 $\pm$ 0,493 (0,0225)**

* znamienne różnice w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla surowic dzieci zdrowych;

** grupa kontrolna krwiodawców (test *t* Studenta);[#] wiek pacjentów w chwili przyjęcia do szpitala; SD – odchylenie standardowe; p – istotność statystyczna.

każeniem pałeczkami *E. coli*, *Proteus*, *Shigella* i *Salmonella*. Efektywne przeciwbakteryjne działanie ochronne preparatów OMP z *H. alvei* zaobserwowano nawet w przypadku zakażenia zwierząt dawką bakterii wielokrotnie przewyższającą dawkę śmiertelną [247]. Podobnie jak *Sh. flexneri*, działanie ochronne OMP *Hafnia alvei* ma również szeroką swoistość. Z indukcją tej ochrony związana jest odpowiedź komórkowa gospodarza, co potwierdziły badania kinetyki DTH i przeniesienie jej za pomocą limfocytów. Działanie ochronne białek OMP z *H. alvei* można było przenieść na zwierzęta nieimmunizowane za pomocą limfocytów izolowanych ze śledziony zwierząt immunizowanych, a aktywne komórki zdolne do przeniesienia odporności pojawiały się już 4 dnia po immunizacji białkami OMP [248]. Białka OMP z *H. alvei* podane zwierzętom wzbudzały również odpowiedź humoralną gospodarza, a przeciwciała o wysokim mianie pojawiały się w 3 tygodniu po immunizacji. Stwierdzono także, że odporność humoralną można przenieść biernie na nieimmunizowanych biorców za pomocą surowicy odpornościowej. Jednakże odpowiedź humoralna wzbudzana tymi preparatami ma charakter swoisty, a przeciwciała z surowicy zwierząt immunizowanych chronią nieimmunizowanych biorców tylko w układach homologicznych [250,251]. Oznaczając właściwości biologiczne preparatów OMP z *H. alvei* wykazano, że podobnie jak w przypadku OMP *Sh. flexneri*, charakteryzują się niewielką toksycznością i zmiennym efektem pirogennym. Ich wpływ na poziom leukocytów we krwi obwodowej był typowy, jak w przypadku innych preparatów pochodzenia bakteryjnego [249]. Preparaty OMP *Shigella* i *Hafnia* podawane zwierzętom wzbudzały odpowiedź o ochronnym działaniu przeciwbakteryjnym i miały właściwości immunomodulacyjne [4,5,243,244,245,246,247,248,249,250,251,255,256]. O działaniu ochronnym białek błony zewnętrznej *Salmonella* pisało wielu badaczy [6,138,174,197,214,215,226,227], którzy wykazali immunomodulacyjne działanie białek błony zewnętrznej.

W kontekście wyników innych autorów i badań własnych niezwykle interesujące było z kolei poszukiwanie w całej mieszaninie białek preparatów OMP składnika o aktywności ochronnej. Nie było bowiem wiadomo, czy mamy do czynienia z kilkoma składnikami, które synergistycznie działają ochronnie, czy mógłby to być jeden składnik preparatu OMP. Przeciwciała indukowane i rozpoznające taki składnik stanowią istotę przeciwbakteryjnej aktywności ochronnej.

Poszukując zatem białka działającego ochronnie zbadano reaktywność preparatów OMP z surowicą zdrowego człowieka i pacjentów z niedoborami immunoglobulin [252]. To szczególne podejście badawcze miało na celu poszukiwanie ochronnych przeciwciał wobec OMP. Szczególnie interesująca była odpowiedź, dotycząca reaktywności przeciwciał krwi pępowinowej z pulą białek OMP. Założenie badawcze polegało na tym, że pępowinowe immunoglobuliny mogą zawierać przeciwciała o ochronnej aktywności przeciwbakteryjnej, które są przekazywane przez łożysko od matki do płodu. W celu określenia reaktywności surowic ludzi zdrowych i z niedoborami immunoglobulinowymi, białka błony zewnętrznej wyizolowano metodą Schnaitmana z wielu szczepów różnych serotypów *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *C. freundii*, *P. vulgaris*, *H. alvei* oraz *P. aeruginosa*. Reaktywność rozdzielonych w elektroforezie białek z surowicami dzieci i dorosłych oraz z osoczem krwi pępowinowej badano w immunoblotingu. Stwierdzono, że obecne w surowicach ludzi zdrowych przeciwciała klasy IgG i IgA, a także IgM, reagowały przede wszystkim z jednym z białek głównych OMP o masie cząsteczkowej 38 kDa [252]. W przypadku OMP szczepów należących do rodziny *Enterobacteriaceae* profil reaktywności przeciwciał IgG, IgM surowicy ludzi zdrowych, a także przeciwciał IgG osocza krwi pępowinowej był podobny, a odmienny jedynie dla OMP *P. aeruginosa* [252]. Taki profil

reaktywności sugeruje, że białko OMP38 jest głównym białkiem *Enterobacteriaceae* rozpoznawanym przez układ immunologiczny człowieka.

Za pomocą elektroforezy preparatywnej z preparatu OMP szczepu *Sh. flexneri* 3a wyizolowano i oczyszczono białko OMP38 [252]. Stwierdzono identyczność sekwencji peptydów OMP38 z sekwencją peptydów białka omp1b *Sh. flexneri* 2a i białka prekursorowego nmpC *E. coli*, a także podobieństwo sekwencji jego peptydów do ompC: *E. coli*, *S. typhi* i *K. pneumoniae* [252]. Następnie za pomocą testu ELISA [252,256] wykazano, że poziom swoistych reaktywności tego białka OMP38 z surowicami był uzależniony od wieku, wzrastając stopniowo od niskiej reaktywności w wieku niemowlęcym, aż do poziomu odpowiedniego dla dorosłych krwiodawców [252]. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 3. Taki poziom reaktywności był zgodny z klasycznym profilem rozwoju odporności, w którym najpierw przeciwciała IgG są przekazywane od matki do układu krążenia płodu, a następnie poziom IgA i IgG rozwija się w miarę kontaktu dziecka z patogenami [74,149]. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że białko OMP38 jest głównym enteropatogennym białkiem rozpoznawanym przez układ immunologiczny człowieka i w związku z tym może być brane pod uwagę jako potencjalny antygen lub nośnik w konstruowaniu szczepionek [252].

Poziom swoistych przeciwciał anty-OMP38 klasy IgA i IgG u dzieci z niedoborami immunologicznymi był znacznie niższy niż w surowicach dzieci zdrowych. W surowicach dzieci z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych poziom przeciwciał był wyższy, porównywalny z poziomem przeciwciał u dzieci zdrowych. Statystycznie znamienne dodatnie korelacje, poziomu swoistych przeciwciał IgA anty-OMP38 w stosunku do całkowitych przeciwciał IgA, wykazano w przypadku surowic dzieci z niedoborami IgA+IgG i dzieci z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych. Korelacje takie wykazano również dla poziomu swoistych przeciwciał IgG [252].

Można zatem przypuszczać, że białko OMP38 z *S. flexneri* 3a może być użyte nie tylko jako bezpieczny nośnik do szczepionki koniugatowej, lecz również jako potencjalny antygen do indukowania przeciwciał o właściwościach ochronnych. Uzyskane wyniki wskazują również, że białko OMP38 *Sh. flexneri* może być brane pod uwagę jako swoisty marker diagnostyczny niedoborów immunologicznych i wykorzystane do monitorowania poziomu odporności przeciwenterykcyjnej, głównie w niedoborach IgA oraz w przypadku nawracających infekcji dróg oddechowych [252].

7. BIAŁKA BAKTERII JAKO ANTYGENY DO SZCZEPIONEK I MARKERY DIAGNOSTYCZNE

Podstawową cechą skutecznej szczepionki jest wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej gospodarza, która długotrwale chronić go będzie przed zakażeniem bakteriami, a podanie jej nie będzie wywoływało działań niepożądanych lub będą minimalne. Szczepionka powinna być przede wszystkim bezpieczna, a jej podanie jednorazowe i proste. Skuteczna szczepionka powinna być stosowana powszechnie, a w przypadku ludzi niezależnie od wieku. Nie bez znaczenia pozostają również koszty jej uzyskania. Ważne jest wyprodukowanie wieloważnej, właściwie skonstruowa-

nej szczepionki, która wzbudzałaby zarówno odpowiedź humoralną jak i komórkową gospodarza. Spośród szczepionek przeciwko enterobakteriom były takie jak stosowana pozajelitowo szczepionka przeciw shigellozie z lat 50 ub.w. Zawierała ona całe, zabite bakterie i indukowała wysoki poziom przeciwciał anty-LPS, ale nie działała ochronnie [14]. Podobny brak działania ochronnego obserwowano po podaniu doustnym zabitych lub pozajelitowym żywych, atenuowanych bakterii *Shigella* [69].

W badaniach na ochotnikach, podając wielokrotnie dawkę 1×10^{11} żywych, nieinwazyjnych szczepów *Sh. flexneri* z mutacją chromosomową lub mutacją w obszarze plazmidu wirulencji, uzyskiwano 85% ochrony [154]. Przygotowywano także szczepionki z żywych, inwazyjnych szczepów *Sh. flexneri* z mutacją w obszarze genów wirulencji lub w obszarze genów metabolicznych. Stosowano je u zwierząt i u ochotników uzyskując po kilkukrotnym podaniu dawki rzędu 5×10^{10} – 1×10^{11} ochronę rzędu 70–100%. Niemniej jednak była to ochrona przede wszystkim w układzie humologicznym i ze sporadycznie występującymi ubocznymi objawami klinicznymi [204]. Przygotowanie szczepionki skutecznej, bezpiecznej, o szerokim zakresie działania, nie jest sprawą łatwą i stąd też wiele strategii jest branych pod uwagę. Jedną z możliwości są szczepionki hybrydowe. Znanie są badania nad użyciem hybrydy *Shigella* – *E. coli*, w której szczep *E. coli* K-12 miał grupowo i typowo swoje antygeny *Sh. flexneri* 2a i plazmid wirulencji z *Sh. flexneri* 5, która jednak podana ochotnikom nie działała ochronnie [132,133]. Natomiast szczepionka zawierająca szczep *Sh. flexneri* 2a T32, noszący plazmid z genami kodującymi O-antygen *Sh. sonnei*, chroniła w 100% myszy przed rozwojem zakażenia wirulentnymi szczepami *Sh. flexneri* i *Sh. sonnei* [198]. Należy jednak zauważyć, że w przypadku stosowania szczepionek, których składnikami są żywe osłabione bakterie, zawsze istnieje zagrożenie związane z możliwością powrotu szczepu do zjadliwej postaci dzikiej. Takie szczepionki nie nadają się także dla ludzi z uszkodzonym układem immunologicznym. W związku z tym wiele grup badawczych koncentruje się na konstruowaniu szczepionek podjednostkowych lub koniugatowych, w których w przypadku enteropatogenów antygenami czy nośnikami mogą być elementy związane ze ścianą komórkową bakterii, takie jak LPS, białka błony zewnętrznej, toksyny, czy białka fimbrii [189]. Odtoksyczniony LPS lub jego fragment polisacharydowy związane z białkiem nośnikowym mogą być celem przeciwbakteryjnej odpowiedzi ochronnej. Natomiast użycie LPS z kilku serotypów stwarza możliwość uzyskania szczepionki wieloważnej. Wybierając odpowiedni nośnik białkowy można uzyskać rozszerzenie działania ochronnego szczepionki. T-niezależne antygeny polisacharydowe mogą poprzez wiązanie z białkowym nośnikiem przekształcać się w antygeny T-zależne, co znacznie podnosi ich skuteczność działania [195]. NPS (nucleoprotein subcellular complex) to również szczepionki podjednostkowe, składające się z kompleksów cząstek rybosomalnych i wielocukru O-swoistego wolnego od lipidu A [146]. Z raportu WHO za rok 2008 wynika [257], że wspomniane typy szczepionek są obecnie w mniej lub bardziej zaawansowanej fazie badań na świecie (NIH-USA, Uniwersytet Maryland USA, Instytut Pasteura, Francja). Nie zmienia to jednak faktu, że najintensywniej poszukiwane są antygeny czy nośniki do szczepionek koniugatowych, a do składników bakterii

branych pod uwagę jako potencjalne elementy szczepionki, należą białka fimbrii. Fimbrie, to charakterystyczne struktury powierzchniowe bakterii warunkujące adhezję bakterii do komórek gospodarza, które mają silne właściwości antygenowe. Najlepiej poznane są mannozosoiste fimbrie typu 1, wytwarzane przez wiele bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, natomiast u większości szczepów *Klebsiella* są obecne fimbrie typu 3, dla których receptory znajdują się w substancji międzykomórkowej tkanki gospodarza. Fimbrie są heterokompleksami, w skład których wchodzi głównie podjednostki strukturalne, takie jak białko fimbrylina o masie cząsteczkowej około 20 kDa i monomery mniejszych podjednostek. Fimbrie K88, K99 i 987P *E. coli* wykazywały przeciwbakteryjne właściwości ochronne u zwierząt, a białka fimbrii były już używane do szczepionki zarówno w postaci nieskoniugowanej jak i antygeny w postaci koniugatu [115]. Dotąd używano różnych metod oczyszczania fimbrii stosując po homogenizacji komórek etapowo wysalanie, chromatografię jonowymienną, deterenty, ultrawierowanie w gradiencie sacharozy czy chlorku cezu [56,67,79,88,116,118,119].

W naszym laboratorium skoncentrowaliśmy się na izolacji, oczyszczaniu i charakterystyce immunochemicznej fimbrii typu 1 z *K. pneumoniae* i typu 3 z *K. oxytoca*, jako nośników oraz jako koniugatu z oligosacharydem, zawierającym glicynę, haptenem z *E. coli*, lecz powszechnym w lipopolisacharydach bakteryjnych [76]. W oparciu o znane metody [67,79,88] opracowaliśmy metodę własną izolacji fimbrii [77,253], która jest wydajna, prosta i łatwa w stosowaniu dla różnych typów fimbrii. Oczyszczanie obejmowało homogenizację i wysalanie fragmentów błon 5% siarczanem amonu, następnie filtrację żelową na kolumnie Sepharose 4B w obecności 6M mocznika oraz ostatni etap, w którym oczyszczano fimbrie od lipopolisacharydu i białek nefimbrialnych za pomocą chromatografii hydrofobowej na kolumnie phenyl-Sepharose. Ostatni etap oczyszczania zastąpić można było przez elektroforezę preparatywną [253]. Uzyskano wolne od endotoksyny preparaty fimbrii, białka stabilne i odporne na czynniki denaturujące. Obydwa typy fimbrii *Klebsiella* są łagodnymi induktorami IL-6 i IFN, a nie wpływają na stymulację wytwarzania TNF.

Fimbrie typu 1 i 3 skoniugowano z zawierającym glicynę oligosacharydowym rdzeniem lipopolisacharydu *E. coli* C600 K12 wysokotemperaturową metodą wg Boratyńskiego i Roya [30]. Analiza koniugatów metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF pozwoliła stwierdzić, że około 10% monomeru białka ma podstawienie oligosacharydem. Uzyskany koniugat badany jako induktor czynników prozapalnych, wykazywał jedynie nieco podwyższoną aktywność stymulującą wytwarzanie TNF. W związku z niską aktywnością prozapalną fimbrii typu 1 i typu 3 *Klebsiella*, mogą być zatem brane pod uwagę jako dobry nośnik w przypadku szczepionki koniugatowej. Uzyskane przez nas oligosacharydowo-białkowe koniugaty wykazywały właściwości immunogenne i podane zwierzętom wywoływały odpowiedź immunologiczną. Oznaczało to, że sposób wiązania składników koniugatu nie niszczy ani immunogenności oligosacharydowego rdzenia, ani białkowego nośnika. Metodą immunoblotingu wykazano, że surowice zwierząt immunizowanych koniugatem reagowały z węglowodanowym epitopem i fimbriami [252]. Obecność w surowicy antykoniugatowej przeciwciał an-

tyfimbrie i antyoligosacharyd z glicyną świadczy o tym, że te epitopy są dostępne dla komórek układu immunologicznego gospodarza, czego potwierdzeniem jest szeroka reaktywność surowicy z lipopolisacharydami różnych przedstawicieli *Enterobacteriaceae*. Wykazano także szerokie działanie bakteriobójcze surowic antyglukoniugatowych. Dane literaturowe [39,79,88,117,230] i nasze wyniki [77,253] pozwalają zatem przypuszczać, że fimbrie bardzo dobrze spełniają warunki odpowiednie dla nośników w szczepionce koniugatowej. Stabilność uzyskanych białek fimbrialnych, odporność na czynniki denaturujące, proteolizę, brak toksyczności, to cechy niezmiennie ważne dla białkowego nośnika do bezpiecznej szczepionki koniugatowej. Należy podkreślić, że fimbrie występują u bakterii stanowiących florę fizjologiczną, zaś indukcja ochronnych przeciwciał ma za zadanie zapobieganie niekorzystnym skutkom towarzyszącym translokacji bakterii do krążenia. Ponadto, fimbrie są strukturami konserwatywnymi, co zapewnia szeroką ochronę przeciwbakteryjną, czyli fimbrie mogłyby być wspólnym antygenem o szerokiej swoistości, dobrym nośnikiem do wielowalencyjnej szczepionki koniugatowej.

Antygenem i nośnikiem do szczepionki koniugatowej może być także oczyszczone przez nas ze ściany komórkowej *Sh. flexneri* białko OMP38 [252]. Profil reaktywności plazmy pepwinowej oraz surowicy dzieci i dorosłych krwiodawców sugeruje, że białko OMP38 jest głównym enteropatogennym białkiem rozpoznawanym przez układ immunologiczny człowieka, co jest związane z podobieństwem jego sekwencji aminokwasowej u różnych przedstawicieli *Enterobacteriaceae* [252]. W ostatnich latach wzrosła lista markerów diagnostycznych służących do rozpoznania choroby w przypadkach, w których bakterie brane są pod uwagę jako czynniki etiologiczne. U pacjentów z ostrym kłębuszkowym zapaleniem nerek (PSAGN) podwyższony poziom przeciwciał klasy IgG przeciw regionowi C białka M *Streptococcus*, może być traktowany jako dodatkowy marker diagnostyczny [168]. U pacjentów ze schorzeniami wieńcowymi serca związek między podwyższonym poziomem przeciwciał antybiałkom hsp60 i omp2 *Chlamydia* jest również traktowany jako wskaźnik diagnostyczny [40]. W surowicach pacjentów ze schorzeniami żołądkowo-jelitowymi związanymi z *Helicobacter pylori*, obecność przeciwciał wobec białek błony zewnętrznej *H. pylori* o masie cząsteczkowej 18 i 26 kDa ma znaczenie diagnostyczne, co jest szczególnie ważne w przypadku raka żołądka, bo dotyczy prognozowania przerzutowania [98]. Proteomika i immunoproteomika szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów z owrzodzeniem dwunastnicy i nowotworem żołądka, pozwoliła na określenie trzech antygenowych wzorców dla tych bakterii, które mogą być rodzajem markera diagnostycznego do prognozowania rozwoju choroby w określonym kierunku [162]. Endotoksyna w płynach stawowych u pacjentów z chorobami reumatycznymi może stanowić marker podejrzananej etiologii infekcyjnej tych schorzeń [179]. Znaczenie diagnostyczne mają również markery serologiczne, jak np. przeciwciała anty-OmpC *E. coli* i antyflagellina CBir1 w nieswoistym zapaleniu jelit (IBD), w którym progresja może prowadzić do choroby Leśniewskiego-Crohna (CD) [96]. Markery te umożliwiają odróżnienie złożonego schorzenia o bardzo zróżnicowanym fenotypie jakim jest CD od innej postaci IBD jaką jest wrzodziejące zapalenie okrężnicy (UC) [96,173,201].

W przypadku CD u dzieci obecność podwyższonego poziomu przeciwbakteryjnej odpowiedzi immunologicznej, związana jest z rokowaniem znacznie bardziej agresywnej postaci tej choroby [60,264].

Białka błony zewnętrznej: enolazopodobne białko o masie cząsteczkowej 45 kDa ze ściany komórkowej *K. pneumoniae* i białko *Sh. flexneri* 3a o masie cząsteczkowej 38 kDa mogą być brane pod uwagę jako potencjalne markery diagnostyczne [252,256]. Enolaza to jeden z enzymów glikolizy, występujący w tkankach ssaków w formie trzech izoenzymów [193]. Homodimer $\alpha\alpha$ jest obecny w większości tkanek dorosłego człowieka, izoforma $\gamma\gamma$ -enolazy w mózgu a $\beta\beta$ -izoenzym w mięśniach poprzecznie prążkowanych szkieletowych i mięśni serca [73,156]. U osobników dorosłych charakterystyczny jest wysoki poziom β -enolazy w mięśniach kurczliwych [156,180]. Uszkodzenie mięśni powoduje gwałtowny spadek poziomu enzymu, jego „wyciekanie” z komórek mięśniowych, co w konsekwencji prowadzi do degeneracji włókien. Dla fazy regeneracji włókien charakterystyczny jest wzrost poziomu β -enolazy [155]. Stwierdzono, że w wyniku uszkodzenia mięśni szkieletowych czy mięśnia sercowego człowieka, w surowicy ludzkiej może się pojawiać enolaza mięśniowa i jest wtedy markerem uszkodzenia tkanki [151]. W przypadku zakażenia organizmu bakteriami z gatunku *K. pneumoniae*, które w błonie zewnętrznej mają enolazopodobne białko naśladujące β -enolazę człowieka, odpowiedź układu immunologicznego człowieka skierowana przeciw bakteriom, będzie również skierowana przeciw własnemu antygenowi. Wyizolowane w naszym laboratorium z błony zewnętrznej ściany komórkowej *K. pneumoniae* białko enolazopodobne ze względu na swoją immunoreaktywność z przeciwciałami antyludzka β -enolazy, można więc wykorzystać nie tylko w czasie ewidentnej infekcji bakteryjnej, ale także do wykrywania w surowicach ludzkich obecności autoprzeciwciał. Tego typu białko występuje również w błonie zewnętrznej innych gatunków bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Hafnia*) i stąd przy przerzucaniu bariery tolerancji immunologicznej dla własnych antygenów istnieje realna możliwość autoimmunizacji, a w konsekwencji uszkodzenie własnych tkanek czy organów na skutek wytwarzania kompleksów immunologicznych [256]. Enolazopodobne białko bakterii oraz identyfikacja autoprzeciwciał w surowicach mogłaby zatem służyć także do wczesnego wykrywania uszkodzenia mięśni, zwłaszcza mięśnia sercowego. Drugim ważnym aspektem istnienia enolazopodobnego

białka w błonie zewnętrznej bakterii jest możliwość izolacji go z bakterii oraz wykorzystania jako antygeny do wytwarzania przeciwciał, które reagując w teście z ludzką enolazą mięśniową wykrywałyby jej obecność w surowicy pacjentów z uszkodzonym mięśniem serca. Zgodnie z danymi Matsudy i wsp. [151] takie przeciwciała można by wykorzystać nie tylko w diagnostyce medycznej do oznaczeń β -enolazy w surowicy, lecz także w laboratoriach sądowych do charakteryzowania plam krwi.

Przyczyną niedoborów odporności immunologicznych człowieka są wrodzone zaburzenia dojrzewania oraz różnicowania narządów i komórek, które prowadzą do osłabienia humoralnej i komórkowej reaktywności immunologicznej [13,34,38,149]. Skutkiem niedoborów immunologicznych jest wrażliwość człowieka na chroniczne lub nawracające infekcje i szczególne przypadki zakażeń związane z odbiegającym od normy naciekaniem limfocytów w tkankach i organach, nowotwory (głównie chłoniaki) oraz choroby autoimmunologiczne [29,44]. Ze względu na poważne konsekwencje niedoborów immunologicznych u człowieka, istnieje potrzeba szerokich badań niezbędnych do określenia stanu układu odpornościowego. Do takiego zestawu należą: określenie liczby limfocytów CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD25+, CD69+, odpowiedzi proliferacyjnej na mitogeny, stężenia immunoglobulin w surowicy, stężenia podklas IgG, IgA, IgM i IgE w surowicy, a także ocena swoistych przeciwciał poszczepiennych, ocena metabolizmu tlenowego neutrofilów oraz badanie aktywności dopełniacza [149,178]. Określanie niedoborów immunologicznych może opierać się na ilościowym oznaczaniu w surowicy całkowitych IgG, IgA czy IgM. Biorąc pod uwagę uzyskane przez nas rezultaty dotyczące reaktywności białka błony zewnętrznej *Shigella flexneri* 3a o masie cząsteczkowej 38 kDa z surowicami dzieci zdrowych i dzieci z niedoborami immunologicznymi, można przypuszczać, że białko to może być potencjalnym markerem diagnostycznym [252]. Nasze wstępne badania stwarzają nadzieję na użycie białka OMP38 *S. flexneri* jako swoistego markera diagnostycznego niedoborów immunologicznych i wykorzystanie go do monitorowania poziomu odporności przeciwbakteryjnej, głównie w niedoborach IgA oraz w przypadkach nawracających infekcji dróg oddechowych. Ma to niebagatelne znaczenie, ponieważ brak czy niedobór IgA może czynić dziecko bardziej predysponowane do alergii, do nawracających zakażeń dróg oddechowych, zakażeń przewodu pokarmowego, zakażeń układu moczowo-płciowego, nowotworów i chorób autoimmunologicznych [13,38,41,44].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Acheson D.W., Luccioli S.: Mucosal immune responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2004; 18: 387–404
- [2] Achouak W., Heulin T., Pages J.M.: Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001; 199: 1–7
- [3] Adam T.: Exploitation of host factors for efficient infection by *Shigella*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2001; 291: 287–298
- [4] Adamus G., Mulczyk M., Witkowska D.: Characterization of outer membrane proteins of virulent phase I *Shigella sonnei* strains and their avirulent phase I derivatives. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1986; 34: 513–516
- [5] Adamus G., Mulczyk M., Witkowska D., Romanowska E.: Protection against keratoconjunctivitis shigellosis induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. *Infect. Immun.*, 1980; 30: 321–324
- [6] Alurkar V., Kamat R.: Immunomodulatory properties of porins of some members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 2382–2388
- [7] Andrews G.P., Maurelli A.T.: mxiA of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 3287–3295
- [8] Arcidiacono S., Butler M., Mello C.M.: A rapid selective extraction procedure for the outer membrane protein (OmpF) from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 2002; 25: 134–137
- [9] Arie J.P., Miot M., Sassoon N., Betton J.M.: Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2006; 62: 427–437

- [10] Arockiasamy A., Krishnaswamy S.: Purification of integral outer membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer membrane protein. *Anal. Biochem.*, 2000; 283: 64–70
- [11] Arora A., Rinehart D., Szabo G., Tamm L.K.: Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* form ions channels with two conductance in planar bilayers. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 1594–1600
- [12] Arza B., Felez J., Lopez-Aleman R., Miles L.A., Munoz-Canoves P.: Identification of an epitope of α -enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage-display. *Thromb. Haemost.*, 1997; 78: 1097–1103
- [13] Ballou M.: Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002; 109: 581–591
- [14] Barnes L.A., Cooper M.L., Jerome E.A., Durant R.C., Smith A.B.: Field trial of *Shigella flexneri* III vaccine. VI. Mouse protective studies. *J. Immunol.*, 1951; 66: 515–524
- [15] Barth W.F., Segal K.: Reactive arthritis (Reiter's syndrome). *Am. Fam. Physician.*, 1999; 60: 499–503
- [16] Basle A., Rummel G., Storici P., Rosenbusch J.P., Schirmer T.: Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J. Mol. Biol.*, 2006; 362: 933–942
- [17] Batchelor E., Goulian M.: Imaging OmpR localization in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2006; 59: 1767–1778
- [18] Baudry B., Maurelli A.T., Clerc P., Sadoff J.C., Sansonetti P.J.: Localization of plasmid *loci* necessary for the entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells and characterization of one locus encoding four immunogenic polypeptides. *J. Gen. Microbiol.*, 1987; 133: 3403–3413
- [19] Beis K., Whitfield C., Booth I., Naismith J.H.: Two-step purification of outer membrane proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2006; 39: 10–14
- [20] Benjamin R., Parham P.: Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today*, 1990; 11: 137–142
- [21] Bernardini M.L., Mounier J., d'Hauteville H., Coquis-Rondon M., Sansonetti P.J.: Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs intra- and inter-cellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 3867–3871
- [22] Bernardini M.L., Sanna M.G., Fontaine A., Sansonetti P.J.: OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 3625–3635
- [23] Basche U., Breukink E., Kast T., Vollmer W.: *In vitro* murein (peptidoglycan) synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 38096–38101
- [24] Beveridge T.J.: Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int. Rev. Cytol.*, 1981; 72: 229–317
- [25] Beveridge T.J.: Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 4725–4733
- [26] Bishop R.E.: The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 2005; 57: 900–912
- [27] Blair D.F.: Fine structure of fine machine. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 7033–7035
- [28] Blocker A., Komoriya K., Aizawa S.: Type III secretion systems and bacterial flagella: insight into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 3027–3030
- [29] Bonilla F.A., Geha R.S.: Primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111: S571–S581
- [30] Boratyński J., Roy R.: High temperature conjugation of proteins with carbohydrates. *Glycoconjugate J.*, 1998; 15: 131–138
- [31] Brewer J.M.: Specificity and mechanism of action of metal ions in yeast enolase. *FEBS Lett.*, 1985; 182: 8–14
- [32] Brewer J.M., Ellis P.D.: ³¹P-NMR studies of the effect of various metals on substrate binding to yeast enolase. *J. Inorg. Biochem.*, 1983; 18: 71–82
- [33] Buchanan S.K.: Beta-barrel protein from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999; 9: 455–461
- [34] Buckley R.H.: Primary cellular immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002; 109: 747–757
- [35] Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 3703–3713
- [36] Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: the basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6511–6518
- [37] Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.*, 2001; 184: 337–344
- [38] Champi C.: Primary immunodeficiency disorder in children: prompt diagnosis can lead to lifesaving treatment. *J. Pediatr. Health Care*, 2002; 16: 16–21
- [39] Choi J.I., Schifferle R.E., Yoshimura F., Kim B.W.: Capsular polysaccharide-fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 391–393
- [40] Ciervo A., Visca P., Petrucci A., Biasucci L.M., Maseri A., Cassone A.: Antibodies to 60-kilodalton heat shock protein and outer membrane protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary heart disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002; 9: 66–74
- [41] Cooper M.A., Pommering T.L., Koranyi K.: Primary immunodeficiencies. *Am. Fam. Physician.*, 2003; 68: 2001–2008
- [42] Cossart P., Sansonetti P.J.: Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 2004; 304: 242–248
- [43] Cowan, S.W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Paupit R.A., Jansson J.N., Rosenbusch J.P.: Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature*, 1992; 358: 727–733
- [44] Cunningham-Rundles C.: Hematologic complication of primary immune deficiencies. *Blood Rev.*, 2002; 16: 61–64
- [45] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Effect of outer membrane proteins of *Shigella* on delayed hypersensitivity in mice to sheep red blood cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1987; 35: 439–446
- [46] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Phagocytic and bactericidal properties of macrophages and mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1988; 36: 701–709
- [47] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Studies on nonspecific protection induced with OMP of *Shigella flexneri* and other genera of *Enterobacteriaceae*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1990; 38: 353–357
- [48] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Effect of outer membrane proteins from *Shigella* on humoral immunity induced in mice by SRBC. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1992; 40: 129–134
- [49] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Fraction of spleen cells responsible for suppression of cellular immune response to SRBC treated with outer membrane proteins of *Shigella*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1992; 40: 135–137
- [50] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Induction of tumor necrosis factor and interleukin 6 by outer membrane proteins of *Shigella* in spleen and macrophages of mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1993; 41: 153–157
- [51] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Effect of outer membrane proteins (OMP) of *Shigella* on interleukin-2 (IL-2) production by spleen cells of mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1994; 42: 159–161
- [52] Daehnel K., Harris R., Maddera L., Silverman P.: Fluorescence assay for F-pili and their application. *Microbiology*, 2005; 151: 3541–3548
- [53] Danner R.L., Elin R.J., Hosseini J.M., Wesley R.A., Reilly J.M., Parillo J.E.: Endotoxemia in human septic shock. *Chest*, 1991; 99: 169–175
- [54] Davies J.M.: Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol. Cell Biol.*, 1997; 75: 113–126
- [55] de Geus P., Riegman N.H., Horrevorts J.G., Verheij H.M., de Haas G.H.: Overproduction and high-yield purification of phospholipase A from outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.*, 1986; 161: 163–169
- [56] de Graaf F.K., Klemm P., Gaastra W.: Purification, characterization and partial covalent structure of *Escherichia coli* adhesive antigen K99. *Infect. Immun.*, 1981; 33: 877–883
- [57] Dekker N.: Outer membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol. Microbiol.*, 2000; 35: 711–717
- [58] de Souza C.P.: Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2003; 7: 23–31
- [59] Doerrler W.T.: Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2006; 60: 542–552
- [60] Dubinsky M.C., Lin Y.C., Dutridge D., Picornell Y., Landers C.J., Farrior S., Wrobel I., Quiros A., Vasiliauskas E.A., Grill B., Israel D., Bahar R., Christie D., Wahbeh G., Silber G., Dallazadeh S., Shah P., Thomas D., Keltz D., Hershsberg R.M., Elson C.O., Targan S.R., Taylor K.D., Rotter J.I., Yang H., Western Regional Pediatric IBD Research Alliance: Serum immune responses predict rapid disease: immune responses predict disease progression. *Am. J. Gastroenterol.*, 2006; 101: 360–367

- [61] Duncan M.J., Mann E.L., Cohen M.S., Ofek I., Sharon N., Abraham S.N.: The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 37707–37716
- [62] Dutzler R., Rummel G., Alberti S., Hernandez-Alles S., Phale P.S., Rosenbusch J.P., Benedi V.Jr., Schirmer T.: Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*, 1999; 7: 425–434
- [63] Edwards R.A., Schifferli D.M., Maloy S.R.: A role for *Salmonella fimbriae* in intraperitoneal infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 1258–1262
- [64] El Hamel C., Chevalier S., De E., Orange N., Molle G.: Isolation and characterisation of the major outer membrane protein of *Erwinia carotovora*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1515: 12–22
- [65] Elliott E.J., Robins-Browne R.M.: Hemolytic uremic syndrome. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, 2005; 35: 310–330
- [66] Epstein S.E., Zhu J., Burnett M.S., Zhou Y.F., Vercellotti G., Hajjar D.: Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20: 1417–1420
- [67] Fader R.C., Duffy L., Davis C.P., Kurosky A.: Purification and chemical characterization of type 1 pili isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 1982; 257: 3301–3305
- [68] Fielder M., Pirt S.J., Tarpey I., Wilson C., Cunningham P., Ettelaie C., Binder A., Bansal S., Ebringer A.: Molecular mimicry and ankylosing spondylitis: possible role a novel sequence in pullulanase of *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett.*, 1995; 369: 243–248
- [69] Formal S.B., LaBrec E.H., Palmer A., Falkow S.: Protection of monkeys against experimental shigellosis with attenuated vaccines. *J. Bacteriol.*, 1965; 90: 63–68
- [70] Forst S.A., Roberts D.L.: Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res. Microbiol.*, 1994; 145: 363–373
- [71] Forst D., Welte T., Wacker T., Diederichs K.: Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.*, 1998; 5: 37–46
- [72] Fouada S.I., Molski T.F., Ashour M.S., Sha'afi R.I.: Effect of lipopolysaccharide on mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2. *Biochem. J.*, 1995; 308: 815–822
- [73] Fougereousse F., Edom-Vovard F., Merkulova T., Ott M.O., Durand M., Butler-Browne G., Keller A.: The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2001; 22: 535–544
- [74] Gajewska E., Czyżewska M., Szafrńska A., Lachowska M.: The role intravenous immunoglobulins in modern neonatology. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2002; 56(Suppl.): 103–126
- [75] Galdiero M., Vitiello M., Galdiero S.: Eukaryotic cell signalling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003; 226: 57–64
- [76] Gamian A., Mieszala M., Katzenellenbogen E., Czarny A., Żal T., Romanowska E.: The occurrence of glycine in bacterial lipopolysaccharides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996; 13: 261–268
- [77] Gamian A., Witkowska D., Mieszala M., Staniszevska M., Przondo-Mordarska A.: Fimbriae as a carrier for antibacterial vaccines. *Nova Acta Leopoldina*, 1999; 80: 265–272
- [78] Garfin D.: Two dimensional gel electrophoresis: an overview. *Trends Analyt. Chem.*, 2003; 22: 263–272
- [79] Gerlach G.F., Clegg S.: Cloning and characterization of gene cluster encoding type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988; 49: 377–383
- [80] Ginocchio C.C., Galan J.E.: Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 729–732
- [81] Goodman L., Segreti J.: Infectious diarrhea. *Dis. Mon.*, 1999; 45: 268–299
- [82] Gootz T.D.: The forgotten Gram-negative bacilli: What genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 1073–1084
- [83] Gruenheid S., Finlay B.: Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, 2003; 422: 775–781
- [84] Higgins C.F.: ABC transporters: physiology, structure and mechanisms-an overview. *Res. Microbiol.*, 2001; 152: 205–210
- [85] High N., Mounier J., Prevost M.C., Sansonetti P.J.: IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.*, 1992; 11: 1991–1999
- [86] Hill Gaston J.S., Lillicrap M.S.: Arthritis associated with enteric infection. *Best Pract. Res. Clin. Rheum.*, 2003; 17: 219–239
- [87] Hirata D., Hirai I., Iwamoto M., Yoshio T., Takeda A., Masuyama J.I., Mimori A., Kano S., Minota S.: Preferential binding with *Escherichia coli* hsp60 of antibodies prevalent in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1997; 82: 141–148
- [88] Honda T., Arita M., Miwatani T.: Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. *Infect. Immun.*, 1984; 43: 959–963
- [89] Humphries A.D., Townsend S.M., Kingsley R.A., Nicholson T.L., Tsolis R.M., Bäumlér A.J.: Role of fimbriae and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001; 20: 121–125
- [90] Hutsul J.A., Worobec E.: Molecular characterization of the *Serratia marcescens* OmpF porin, and analysis of *S. marcescens* OmpF and OmpC osmoregulation. *Microbiology*, 1997; 143: 2797–2806
- [91] Inzana T.J., Glindemann G., Cox A.D., Wakarchuk W., Howard M.D.: Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 4870–4879
- [92] Isberg R.R., Hamburger Z., Dersch P.: Signaling and invasion-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.*, 2000; 7: 793–801
- [93] Isberg R.R., Leong J.M.: Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 1990; 60: 861–871
- [94] Ivetać A., Campbell J.D., Sansom M.S.: Dynamic function in bacterial ABC transporter: simulation studies of the BtuCDF system and its components. *Biochemistry*, 2007; 46: 2767–2778
- [95] Jansson P.E.: The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides. W: Endotoxin in Health and Disease, red.: Brade H., Opal S.M., Vogel S.N., Morrison D.C. M. Dekker New York, USA, 1999; 55–178
- [96] Jaskowski T.D., Litwin C.M., Hill H.R.: Analysis of serum antibodies in patients suspected having inflammatory bowel disease. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006; 13: 655–660
- [97] Jepson M.A., Clark M.A.: The role M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect.*, 2001; 3: 1183–1190
- [98] Jiang Z., Huang A.L., Tao X.H., Wang P.L.: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and diseases associated with *Helicobacter pylori* by *Helicobacter pylori* outer membrane proteins. *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10: 3464–3469
- [99] Joiner K.A., Grossman N., Schmetz M., Leive L.: C3 binds preferentially to long chain lipopolisaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*. *J. Immunol.*, 1986; 136: 710–715
- [100] Joiner K.A., Schmetz M.A., Goldman R.C., Leive L., Frank M.M.: Mechanism of bacterial resistance to complement killing: inserted C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O111B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infect. Immun.*, 1984; 45: 113–117
- [101] Jones C.H., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Nicholas A.V., Abraham S.N., Hultgren S.J.: FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 2081–2085
- [102] Jong A.Y., Chen S.H., Stins M.F., Kim K.S., Tuan T.L., Huang S.H.: Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.*, 2003; 52: 615–622
- [103] Kaeriyama M., Machida K., Kitakaze A., Wang H., Lao Q., Fukamachi T., Saito H., Kobayashi H.: OmpC and OmpF are required for growth under hyperosmotic stress above pH 8 in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006; 42: 195–201
- [104] Kandt C., Xu Z., Tieleman D.P.: Opening and closing motions in the periplasmic vitamin B12 binding protein BtuF. *Biochemistry*, 2006; 45: 13284–13292
- [105] Kaper J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. *Inter. J. Med. Microbiol.*, 2005; 295: 355–356
- [106] Kar A.K., Ghosh A.S., Chauhan K., Ahamed J., Basu J., Chakrabarti P., Kundu M.: Involvement of 43-kilodalton outer membrane protein in β -lactam resistance of *Shigella dysenteriae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997; 41: 2302–2304
- [107] Karch H., Tarr P.I., Bielaszewska M.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2005; 295: 405–418

- [108] Karlsen A.E., Dyrberg T.: Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin. Immunol.*, 1998; 10: 25–34
- [109] Katzenellenbogen E.: Badania strukturalne części cukrowej lipopolisacharydów *Hafnia alvei*. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1996; 50: 435–445
- [110] Kenne L., Lindberg B.: Bacterial polysaccharides. W: *The Polysaccharides*, red.: Aspinall G.O. Acad. Press, New York-London, 1983; 2: 287–363
- [111] Kingsley G., Sieper J.: Current perspectives in reactive arthritis. *Immunol. Today*, 1993; 14: 387–391
- [112] Kisiela D., Laskowska A., Sapeta A., Kuczkowski M., Wieliczko A., Ugorski M.: Function characterization of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Microbiology*, 2006; 152: 1337–1346
- [113] Kisiela D., Sapeta A., Kuczkowski M., Stefaniak T., Wieliczko A., Ugorski M.: Characterization of FimH adhesins expressed by *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum*: reconstitution of mannose-binding properties by single amino acid substitution. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 6187–6190
- [114] Klebba P.E., Hofnung M., Charbit A.: A model of maltodextrin transport through the sugar-specific porin, LamB, based on deletion analysis. *EMBO J.*, 1994; 13: 4670–4675
- [115] Klemm P.: Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.*, 1985; 7: 321–340
- [116] Klemm P., Orskov I., Orskov F.: Isolation and characterization of F12 adhesive fimbrial antigen from uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.*, 1983; 40: 91–96
- [117] Klemm P., Schembri M.A.: Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology*, 2000; 12: 3025–3032
- [118] Klemm P., Schembri M.A.: Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2000; 290: 27–35
- [119] Klemm P., Schembri M.A.: Fimbriae-assisted bacterial surface display of heterologous peptides. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2000; 290: 215–221
- [120] Klose M., Jahnig F., Hindennach I., Henning U.: Restoration of membrane incorporation of an *Escherichia coli* outer membrane protein (OmpA) defective in membrane insertion. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 21842–21847
- [121] Klose M., Schwarz H., Mac Intyre S., Freudl R., Eschbach M.L., Henning U.: Internal deletion in the gene for *Escherichia coli* outer membrane protein define an area possibly important for recognition of the outer membrane by this polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 13291–13296
- [122] Knirel Y.A., Kotchetkov N.K.: The structure of lipopolisaccharides of Gram-negative bacteria. III. The structure of O-antigens: a review. *Biochemistry (Moscow)*, 1994; 59: 1325–1383
- [123] Koch A.L.: The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1998; 24: 23–59
- [124] Koch A.L., Woeste S.W.: The elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 4811–4819
- [125] Koeblnik R.: Membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpA: exploring constraints on transmembrane β -strands. *J. Mol. Biol.*, 1999; 285: 1801–1810
- [126] Koeblnik R., Locher K.P., van Gelder P.: Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels and nutshell. *Mol. Microbiol.*, 2000; 37: 239–253
- [127] Kolberg J., Aase A., Bergmann S., Herstad T.K., Rodal R., Rohde M., Hammerschmidt S.: *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiol.*, 2006; 152: 1307–1317
- [128] Kołodyński J., Jankowski S.: The pathogenicity islands as a factors determining the virulence of bacteria. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2002; 11: 357–363
- [129] Koronakis V., Sharff A., Koronakis E., Luisi B., Hughes C.: Crystal structure of bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000; 405: 914–919
- [130] Korzeniowska-Kowal A., Witkowska D., Gamian A.: Mimikra cząsteczki bakteryjnych antygenów polisacharydowych i jej rola w etiologii chorób infekcyjnych i autoimmunologicznych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2001; 55: 211–232
- [131] Kotb M.: Short analytical review. Infection and autoimmunity: a story of the host, the pathogen and copathogen. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1995; 74: 10–22
- [132] Kotloff K.L., Herrington D.A., Hale T.L., Newland J.W., van de Verg L.L., Cogan J.P., Snoy P.J., Sadoff J.C., Formal S.B., Levine M.M.: Safety, immunogenicity and efficacy in monkeys and human of invasive *Escherichia coli* K-12 vaccine candidates expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2218–2224
- [133] Kotloff K.L., Losonsky G.A., Nataro J.P., Wasserman S.S., Hale T.L., Taylor D.N., Newland J.W., Sadoff J.C., Formal S.B., Levine M.M.: Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy in healthy adults of four doses of live oral hybrid *Escherichia coli*–*Shigella* 2a vaccine strain EcSf2a-2. *Vaccine*, 1995; 13: 495–502
- [134] Kotloff K.L., Winickoff J.P., Ivanoff B., Clemens J.D., Swerdlow D.L., Sansonetti P.J., Adak G.K., Levine M.M.: Global burden of *Shigella* infection: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ.*, 1999; 77: 651–656
- [135] Krogfelt K.A., Bergmans H., Klemm P.: Direct evidence that the FimH protein is adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.*, 1990; 58: 1995–1999
- [136] Kuehn M.J., Kesty N.C.: Bacterial outer membrane vesicles and host-pathogen interaction. *Genes Dev.*, 2005; 19: 2645–2655
- [137] Kukkonen M., Korhonen T.K.: The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Intern. J. Med. Microbiol.*, 2004; 294: 7–14
- [138] Kuusi N., Nurminen M., Saxen H., Makela P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 1981; 34: 328–332
- [139] Kuusi N., Nurminen M., Saxen H., Valtanen M., Makela P.H.: Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.*, 1979; 25: 857–862
- [140] Lahteenmaki K., Edelman S., Korhonen T.K.: Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.*, 2005; 13: 79–85
- [141] Lahteenmaki K., Kuusela P., Korhonen T.K.: Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods*, 2000; 21: 125–132
- [142] Lahteenmaki K., Kuusela P., Korhonen T.K.: Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001; 25: 531–552
- [143] Lammlie K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680–685
- [144] La Ragione M., Cooley W.A., Woodward M.J.: The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78: K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J. Med. Microbiol.*, 2000; 49: 327–338
- [145] Le Bouguenec C.: Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Inter. J. Med. Microbiol.*, 2005; 295: 471–478
- [146] Levenson V.J., Mallet, C.P., and Hale T.L.: Protection against local *Shigella sonnei* infection in mice by parenteral immunization with nucleoprotein subcellular vaccine. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 2762–2765
- [147] Lin J., Huang S., Zhang Q.: Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microb. Infect.*, 2002; 4: 325–331
- [148] Luo G., Seetharamaiah G.S., Niesel D.W., Zhang H., Peterson J.W., Prabhakar B.S., Klimpell G.R.: Purification and characterization of *Yersinia enterocolitica* envelope proteins which induce antibodies that react with human thyrotropin receptor. *J. Immunol.*, 1994; 152: 2555–2561
- [149] Madaliński K., Gregorek H., Chrzanowska K., Michałkiewicz J., Bernatowska E.: Diagnostyka laboratoryjna niedoborów immunoglobulin. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2002; 56(Suppl.): 13–21
- [150] Mastroeni P., Chabalgoity J.A., Dunstan S.J., Maskell D., Dougan G.: Salmonella: immune responses and vaccines. *Vet. J.*, 2000; 161: 132–164
- [151] Matsuda H., Seo Y., Takahama K.: A sandwich enzyme immunoassay for human muscle-specific β -enolase and its application for the determination of skeletal muscle injury. *Forensic Sci. Int.*, 1999; 99: 197–208
- [152] Mavris M., Sansonetti P.: Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell response. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2004; 18: 373–386
- [153] McCarter J.D., Stephens D., Shoemaker K., Rosenberg S., Kirsch J.F., Georgiu G.: Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 5919–5925

- [154] Meitert T., Pencu E., Ciudin L., Tonciu M.: Vaccine strain *Sh. flexneri* T-32-ISTRATI. Studies in animals and volunteers. Antidysentery immunoprophylaxis and immunotherapy by live vaccine VADIZEN (*Sh. flexneri* T-32 ISTRATI). Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 1984; 43: 251–278
- [155] Merkulova T., Dehaupas M., Nevers M.C., Creminon C., Alameddine H., Keller A.: Differential modulation of α , β and γ enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. Eur. J. Biochem., 2000; 267: 3735–3743
- [156] Merkulova T., Thornell L.E., Butler-Browne G., Oberlin C., Lucas M., Lamande N., Lazar M., Keller A.: The beta enolase subunit displays three different patterns of microheterogeneity in human striated muscle. J. Muscle Res. Cell Motil., 1999; 20: 55–63
- [157] Merrell D.S., Falkow S.: Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. Nature, 2004; 430: 250–256
- [158] Mey A., Revillard J.P.: Mitogenic response of murine B lymphocytes to *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide requires protein kinase C-dependent late tyrosine phosphorylations. Infect. Immun., 1998; 66: 2547–2552
- [159] Meyer J.E., Schulz G.E.: Energy profile of maltooligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from statistical analysis of saccharide-protein interactions. Protein Sci., 1997; 6: 1084–1091
- [160] Michalski W.P., Shiell B.J.: Strategies for analysis of electrophoretically separated proteins and peptides. Anal. Chim. Acta, 1999; 383: 27–46
- [161] Miles L.A., Dahlberg C.M., Plescia J., Felez J., Kato K., Plow E.F.: Role of cell-surface lysine on plasminogen binding cells: identification of α -enolase as a candidate plasminogen receptor. Biochemistry, 1991; 30: 1682–1691
- [162] Mini R., Bernardini G., Salzano A.M., Renzone G., Scaloni A., Figura N., Santucci A.: Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. J. Chromatogr. B., 2006; 833: 63–79
- [163] Mitsumori K., Teraï A., Yamamoto S., Ishitoya S., Yoshida O.: Virulence characteristics of *Escherichia coli* in acute bacterial prostatitis. J. Infect. Dis., 1999; 180: 1378–1381
- [164] Mogensen J.E., Otzen D.E.: Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. Mol. Microbiol., 2005; 57: 326–346
- [165] Mokady D., Gophna U., Ron E.Z.: Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. Inter. J. Med. Microbiol., 2005; 295: 455–462
- [166] Moonsikapun P.: Bacteremia in adult patients with acquired immunodeficiency syndrome in the northeast of Thailand. Int. J. Infect. Dis., 2007; 11: 226–231
- [167] Mori H., Ito K.: The Sec protein-translocation pathway. Trends Microbiol., 2001; 9: 494–500
- [168] Mori K., Ito Y., Kamikawaji N., Sasazuki T.: Elevated IgG titer against the C region of streptococcal M protein and its determinants in patients with poststreptococcal acute glomerulonephritis. J. Pediatr., 1997; 131: 293–299
- [169] Mulczyk M., Adamus G., Witkowska D.: Protective properties of peptidoglycan associated protein of *Shigella flexneri*. Arch. Immunol. Ther. Exp., 1984; 32: 631–635
- [170] Mulczyk M., Adamus G., Witkowska D., Romanowska E.: Studies on virulence of *Shigella flexneri*: Protective effect of outer membrane proteins. Arch. Immunol. Ther. Exp., 1981; 29: 85–90
- [171] Mulczyk M., Witkowska D., Mleczko J.: Hypersensitivity to *Shigella* outer membrane proteins in mice. Arch. Immunol. Ther. Exp., 1987; 35: 763–768
- [172] Nair G.B., Takeda Y.: The heat-stable enterotoxins. Microb. Pathog., 1998; 24: 123–131
- [173] Nakamura R.M., Matsutani M., Barry M.: Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. Clin. Chim. Acta, 2003; 335: 9–20
- [174] Natarajan M., Udhayakumar V., Krishnaraju K., Muthukkaruppan V.: Role of outer membrane proteins in immunity against murine salmonellosis. I. Antibody response to crude outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1985; 8: 9–16
- [175] Nikaido H.: Porins and specific channels of bacterial outer membranes. Mol. Microbiol., 1992; 4: 435–442
- [176] Nikaido H.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2003; 67: 593–656
- [177] Nikaido H., Rosenberg Y.E., Foulds J.: Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. J. Bacteriol., 1983; 153: 232–240
- [178] Notarangelo L., Casanova J.L., Fischer A., Puck J., Rosen F., Seger R., Geha R.: Primary immunodeficiency diseases: an update. J. Allergy Clin. Immunol., 2004; 114: 677–687
- [179] Noworyta J., Ząbek J., Brasse-Rumin M., Gago J., Rell-Bakalarska M.: Obecność endotoksyny w płynach stawowych u pacjentów z chorobami narządu ruchu jako marker podejrzewanej etiologii infekcyjnej. Reumatologia, 2006; 44: 26–33
- [180] Nozais M., Merkulova T., Keller A., Janmot C.H., Lomprie A.M., D'Albis A., Lucas M.: Denervation of rabbit gastrocnemius and solus muscles. Effect on muscle-specific enolase. Eur. J. Biochem., 1999; 263: 195–201
- [181] Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A.: Typing of intimins genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect. Immun., 2000; 68: 64–71
- [182] Pancholi V.: Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. Cell Mol. Life Sci., 2001; 58: 902–920
- [183] Pancholi V., Fischetti V.A.: α -enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface pathogenic *Streptococci*. J. Biol. Chem., 1998; 273: 14503–14515
- [184] Paterson D.L.: Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am. J. Med., 2006; 119: S20–S28
- [185] Poulin R., Combes C.: The concept virulence: interpretations and implications. Parasitol. Today, 1999; 15: 474–475
- [186] Prasadarao N.V., Wass C.A., Weiser J.N., Stins M.F., Huang S.H., Kim K.S.: Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun., 1996; 64: 146–153
- [187] Puig M., Fuste C., Vinas M.: Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol., 1993; 39: 108–111
- [188] RCSB Protein Data Bank: An information portal to biological macromolecular structures. <http://www.rcsb.org> (13.01.2009)
- [189] Reddin K.M., Crowley-Luke A., Clark S.O., Vincent P.J., Gorringe A.R., Hudson M.J., Robinson A.: Bordetella pertussis fimbriae are effective carrier proteins in *Neisseria meningitidis* serogroup C conjugate vaccines. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2001; 31: 153–162
- [190] Redlitz A., Fowler B.J., Plow E.F., Miles L.A.: The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. Eur. J. Biochem., 1995; 227: 407–415
- [191] Replogle M.L., Fleming D.W., Cieślak P.R.: Emergence of antimicrobial-resistant shigellosis in Oregon. Clin. Infect. Dis., 2000; 30: 515–519
- [192] Revell P.A., Miller V.L.: *Yersinia virulence*: more than plasmid. FEMS Microbiol. Lett., 2001; 205: 159–164
- [193] Rider C.C., Taylor C.B.: Enolase isoenzymes in rat tissues. Electrophoretic, chromatographic, immunological and kinetic properties. Biochim. Biophys. Acta, 1974; 365: 285–300
- [194] Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahring U., Seydel U., Di Padova F., Schreier M., Brade H.: Bacterial endotoxin: molecular relationship of structure to activity and function. FASEB J., 1994; 8: 217–225
- [195] Robbins J.B., Schneerson R.: Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. J. Infect. Dis., 1990; 161: 821–832
- [196] Rose N.R.: The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. Semin. Immunol., 1998; 10: 5–13
- [197] Roy S., Das A.B., Ghosh A.N., Biswas T.: Purification, pore-forming ability, and antigenic relatedness of the major outer membrane protein of *Shigella dysenteriae* type 1. Infect. Immun., 1994; 62: 4333–4338
- [198] Rui X., Xu Y., Wan H., Su G., Huang C.: Construction of a stable and non-resistant bivalent vaccine candidate strain against *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei*. Clin. J. Biotechnol., 1996; 12: 89–97
- [199] Salami A.K., Olatunji P.O., Oluboyo P.O., Akanbi A.A. II, Fawibe E.A.: Bacterial pneumonia in the AIDS patients. West Afr. J. Med., 2006; 25: 1–5
- [200] Samuelson P., Gunneriusson E., Nygren P.A., Ståhl S.: Display of proteins on bacteria. J. Biotechnol., 2002; 96: 129–154
- [201] Sandborn W.J.: Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. Rev. Gastroenterol. Disord., 2004; 4: 167–174

- [202] Sansonetti P.J.: Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001; 280: G319–G323
- [203] Sansonetti P.J.: The bacterial weaponry: lessons from *Shigella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006; 1072: 307–312
- [204] Sansonetti P.J., Arondel J.: Construction and evaluation of a double mutant of *Shigella flexneri* as a candidate for oral vaccination against shigellosis. *Vaccine*, 1989; 7: 443–450
- [205] Sansonetti P.J., Tran Van Nhieu G., Egile C.: Rupture of the intestinal epithelial barrier and mucosal invasion by *Shigella flexneri*. *Clin. Infect. Dis.*, 1999; 28: 466–475
- [206] Sansonetti P.J., Phalipon A.: M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.*, 1999; 11: 193–203
- [207] Schembri M.A., Hjerrild L., Gjermansen M., Klemm P.: Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 2236–2242
- [208] Schiller N.L., Joiner K.A.: Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 1986; 54: 689–694
- [209] Schmidt H., Hensel M.: Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004; 17: 14–56
- [210] Schnaitman C.A.: Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. 3. Evidence that the major protein of *Escherichia coli* O111 outer membrane consists of four distinct polypeptide species. *J. Bacteriol.*, 1974; 118: 442–453
- [211] Schulz G.E.: The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1565: 308–317
- [212] Schwimmbeck P.L., Yu D.T., Oldstone M.B.: Autoantibodies to HLA B27 in the sera of HLA B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J. Exp. Med.*, 1987; 166: 173–181
- [213] Seweryn E., Pietkiewicz J., Szamborska A., Gamian A.: Enolaza na powierzchni komórek eukariota i prokariota jako receptor plazminogenu ludzkiego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 672–682
- [214] Sharma P., Ganguly N.K., Sharma B.K., Sharma S., Rawal I.J., Saxena S.N., Sehgal R.: Humoral and cell mediated immune responses to porins of *Salmonella typhi*. *Jpn. J. Exp. Med.*, 1989; 59: 73–77
- [215] Sharma P., Sharma B.K., Sharma S., Rawal I.J., Saxena S.N. Panigrahi D., Ganguly N.K.: Mechanism of protection provided by active immunization with porins in mice challenged with *Salmonella typhi*. *Jpn. J. Exp. Med.*, 1990; 60: 247–252
- [216] Silverman P.M.: Towards a structural biology of bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.*, 1997; 23: 423–429
- [217] Sinclair J.F., O'Brien A.D.: Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 2876–2885
- [218] Staniszevska M., Witkowska D., Gamian A.: Fimbrie jako czynnik patogenności bakterii i nośnik w szczepionkach koniugatowych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2000; 54: 727–747
- [219] Stebbins C.E., Galán J.E.: Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature*, 2001; 412: 701–705
- [220] Stumpe S., Schmid R., Stephens D.L., Georgiou G., Bakker E.P.: Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1998; 180: 4002–4006
- [221] Stypułkowska-Misiurewicz H., Gónera E.: Dysentery in Poland in 2001. *Przegl. Epidemiol.*, 2002 56: 77–84
- [222] Sulakwelidze A.: *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect.*, 2000; 2: 497–513
- [223] Tamm L.K., Hong H., Liang B.: Folding and assembly of β -barrel membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1666: 250–263
- [224] Theofilopoulos A.N.: The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol. Today*, 1995; 16: 90–98
- [225] Thomas S.R., Elkinton J.S.: Pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.*, 2004; 85: 146–151
- [226] Udhayakumar V., Muthukkaruppan V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.*, 1987; 55: 816–821
- [227] Udhayakumar V., Muthukkaruppan V.R.: Protective immunity induced by porin against *Salmonella* infection in mice. *Indian J. Med. Res.*, 1989; 89: 121–127
- [228] Van Houdt R., Michiels C.W.: Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.*, 2005; 156: 626–633
- [229] Vazques-Torres A., Fang F.C.: Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000; 3: 54–59
- [230] Verdonck F., De Hauwere V., Bouckaert J., Goddeeris B.M., Cox E.: Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* function as a mucosal carrier for a coupled heterologous antigen. *J. Control Release*, 2005; 104: 243–258
- [231] Vollmer W., Höltje J.V.: The architecture of the murein (peptidoglycan) in Gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 5978–5987
- [232] Voulhoux R., Bos M.P., Geurtsen J., Mols M., Tommassen J.: Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*, 2003; 299: 262–265
- [233] Wang Y.: The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 292: 396–401
- [234] Wassenaar T.M., Gastra W.: Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001; 201: 1–7
- [235] Weissbach A., Hurwitz J.: The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. *J. Biol. Chem.*, 1959; 234: 705–709
- [236] Werner J., Augustus A.M., Misra R.: Assembly of TolC, a structurally unique and multifunctional outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 6540–6547
- [237] Wexler H.M.: Outer-membrane pore-forming proteins in Gram-negative anaerobic bacteria. *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 35(Suppl.1): S65–S71
- [238] Wilkinson S.G.: Bacterial lipopolysaccharides – themes and variations. *Prog. Lipid Res.*, 1996; 35: 283–343
- [239] Wilson C., Tiwana H., Ebringer A.: Molecular mimicry between HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis and *Proteus mirabilis* as the aetiological basis for autoimmunity. *Microbes Infect.*, 2000; 2: 1489–1496
- [240] Wimley W.C.: The versatile β -barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003; 13: 404–411
- [241] Witkowska D.: Mimikra cząsteczkowa jako czynnik patogenności bakterii. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 545–559
- [242] Witkowska D., Adamus G., Mulczyk M.: Outer membrane protein composition of *Hafnia alvei*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1988; 36: 711–715
- [243] Witkowska D., Adamus G., Mulczyk M., Romanowska E.: Composition of cell envelope proteins of virulent and avirulent variants *Shigella flexneri* 3a. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1980; 8: 225–227
- [244] Witkowska D., Adamus G., Mulczyk M., Romanowska E.: Outer membrane protein composition of *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1982; 13: 109–111
- [245] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Humoral response in mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1986; 34: 499–504
- [246] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Some biological properties of outer membrane proteins of *Shigella*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1987; 35: 759–762
- [247] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Immunogenic and protective properties of outer membrane proteins of *Hafnia alvei*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1990; 38: 387–393
- [248] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Studies on immunity in mice immunized with outer membrane proteins of *Hafnia*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1992; 40: 119–124
- [249] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Some biological properties of outer membrane proteins of *Hafnia*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1992; 40: 125–128
- [250] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Humoral response in mice immunized with outer membrane proteins of *Hafnia alvei*. Protective activity of anti-OMP-antibodies. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1992; 40: 301–304
- [251] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Studies of humoral immunity induced by proteins of the cell wall of *Hafnia alvei*. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1993; 45: 307–310
- [252] Witkowska D., Masłowska E., Staniszevska M., Szostko B., Jankowski A., Gamian A.: Enterobacterial 38-kDa outer membrane protein is an age-dependent molecular marker of innate immunity and immunoglobulin deficiency as results from its reactivity with IgG and IgA antibody. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006; 48: 205–214

- [253] Witkowska D., Mieszala M., Gamian A., Staniszevska M., Czarny A., Przondo-Mordarska A., Jaquinod M., Forest E.: Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella fimbriae* are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005; 45: 221–230
- [254] Witkowska D., Mleczko J., Mulczyk M.: Transfer of immunity by means of spleen cells from mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1985; 33: 629–635
- [255] Witkowska D., Mulczyk M., Adamus G.: Studies on specificity of protection induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1985; 33: 625–628
- [256] Witkowska D., Pietkiewicz J., Szostko B., Danielewicz R., Masłowski L., Gamian A.: Antibodies against human muscle enolase recognize a 45-kDa bacterial cell wall outer membrane enolase-like protein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005; 45: 53–62
- [257] World Health Organization report 2008. <http://www.who.int/whr/previous/en/index> (15.12.2008)
- [258] Wyckoff T.J., Raetz C.R., Jackman J.E.: Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. *Trends Microbiol.*, 1998; 6: 154–159
- [259] Yen J.B., Chang K.W., Wu T.L., Kuo A.J., Su L.H.: *Shigella flexneri* sepsis in an infant. *Chang Gung Med. J.*, 2003; 26: 611–614
- [260] Yona-Nadler C., Umanski T., Shin-Ichi A., Friedberg D., Rosenshine I.: Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2003; 149: 877–884
- [261] Yoshino S., Sasatomi E., Ohsawa M.: Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunology*, 2000; 99: 607–614
- [262] Zhang H., Kaur I., Niesel D.W., Seetharamaiah G.S., Peterson J.W., Prabhakar B.S., Klimpel G.R.: Lipoprotein from *Yersinia enterocolitica* contains epitopes that cross-react with the human thyrotropin receptor. *J. Immunol.*, 1997; 158: 1976–1983
- [263] Zhang H., Kaur I., Niesel D.W., Seetharamaiah G.S., Peterson J.W., Justement L.B., Prabhakar B.S., Klimpel G.R.: *Yersinia enterocolitica* envelope proteins that are crossreactive with thyrotropin receptor (TSHR) also have B-cell mitogenic activity. *J. Autoimmun.*, 1996; 9: 509–516
- [264] Zholudev A., Zurakowski D., Young W., Leichtner A., Bousvaros A.: Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am. J. Gastroenterol.*, 2004; 99: 2235–2241

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.