

Barbara Katarzyna Pawłowska<sup>1\*</sup>, Beata Magdalena Sobieszkańska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wpłynęło w marcu 2014 r.  
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wyspa patogenności LEE. 2.1. Adhezja EPEC. 2.1.1. Fimbrie BFP. 2.1.2. Fimbrie typu 1. 2.1.3. Fimbrie powszechne *E. coli*. 2.1.4. Rzęski. 3. System sekrecji typu III. 3.1. Białka efektorowe EPEC. 3.2. Intimina. 3.3. Tir. 3.4. Destrukcja połączeń międzykomórkowych. 3.5. Zdolność inwazji i unikanie fagocytozy. 4. Wpływ EPEC na apoptozę komórek gospodarza. 5. Inne systemy sekrecji. 6. Typowe i atypowe EPEC. 7. Podsumowanie

### Model of enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenesis – a key role of adherence

**Abstract:** *Escherichia coli* is a highly diverse and one of the best characterized bacterial genus. The species comprises many commensal strains, colonizing human and animal intestines, as well as pathogenic strains, which can cause gastrointestinal infections. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) group strains is the pathotype of diarrheagenic *E. coli*, which is associated with infant diarrhea. The hallmark of EPEC infections is their ability to produce attaching and effacing (A/E) lesions as a result of intimate bacterial adherence to enterocytes and the translocation of bacterial proteins through type III secretion system. The multifunctional and interdependent properties of the effectors contribute to the host cell disruption. The consequences of EPEC infection are: the reorganization of the host cell cytoskeleton underneath adherent bacteria, inhibition of nutrient and water transport, mitochondrial dysfunctions, weak intestinal inflammation, epithelial barrier function disruption and severe watery diarrhea. Despite the recent knowledge development, the mechanism of EPEC diarrhea is still ambiguous. Due to the absence of a proper animal model, further studies should be conducted in volunteers or at least in primates to determine the underlying mechanisms.

1. Introduction. 2. Pathogenicity island LEE. 2.1. Adherence. 2.1.1. BFP pili. 2.1.2. Type 1 pili. 2.1.3. *E. coli* common pili. 2.1.4. Flagella. 3. Type III system of secretion. 3.1. Effector proteins of EPEC. 3.2. Intimin. 3.3. Tir. 3.4. Disruption of tight junctions. 3.5. Invasion ability and avoidance of phagocytosis. 4. Impact of EPEC on host cell apoptosis. 5. Other secretion systems. 6. Typical and atypical EPEC. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** typowe, atypowe EPEC, systemy sekrecji, adhezja

**Key words:** typical, atypical EPEC, secretion systems, adherence

## 1. Wprowadzenie

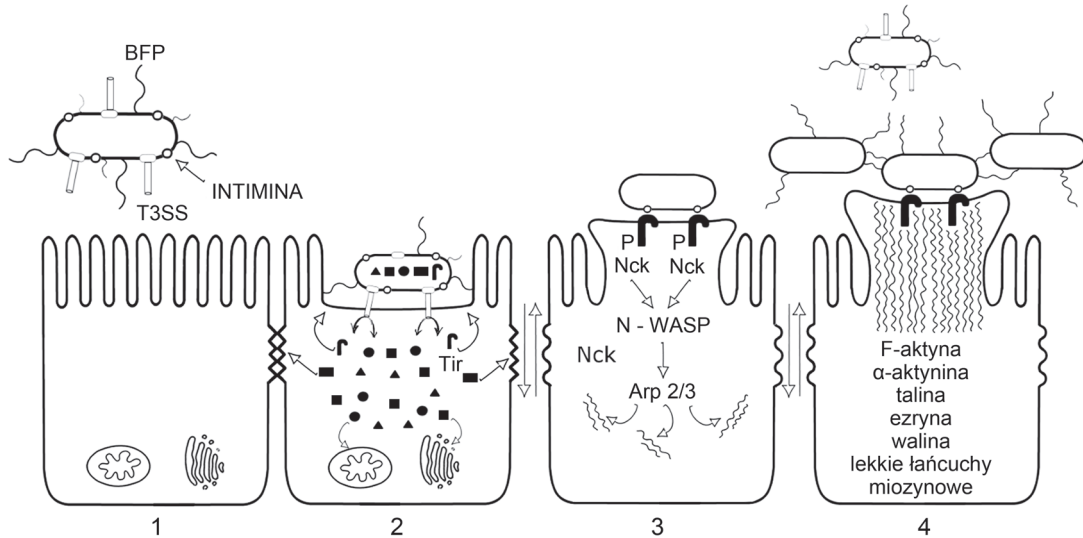
*Escherichia coli* (*E. coli*) jest jednym z najlepiej poznanych gatunków bakterii. Należąca do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczka okrężnicy zalicza się do drobnoustrojów Gram-ujemnych, względnie beztlenowych, fermentujących i oksydazo-ujemnych. Gatunek *E. coli* obejmuje szczepy niepatogenne, które stanowią składnik fizjologicznej flory jelit ludzi i zwierząt oraz szereg zróżnicowanych pod względem potencjału chorobotwórczego szczepów patogennych. Dotychczas opisano 6 grup chorobotwórczych odpowiedzialnych za zakażenia jelitowe: enterotoksynogenne *E. coli* (ETEC), enteropatogenne *E. coli* (EPEC), enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC), enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC), enterokrwtoczne *E. coli* (EHEC) lub shigatoksyczne *E. coli* (STEC) oraz *E. coli* o rozsianym typie adhezji (DAEC) [40].

W ramach niniejszego opracowania omówione zostały szczepy EPEC, które stanowią ważny czynnik etiologiczny biegunek u dzieci na całym świecie, choć w kra-

jach rozwiniętych zakażenia te występują rzadziej niż w krajach rozwijających się. Zakażenia szczepami EPEC dotyczą zarówno środowiska szpitalnego jak i pozaszpitalnego i charakteryzują się wodnistą biegunką, której towarzyszyć może wysoka gorączka oraz wymioty.

Szczepy EPEC indukują w enterocytach jelita rozwój charakterystycznych zmian histopatologicznych określanych akronimem A/E (attaching and effacing), polegających na zacieraniu struktury mikrokosmków poprzez reorganizację aktywnego cytoskieletu (Rys. 1). Poza EPEC zdolność wywoływania w nabłonku jelita zmian typu A/E posiadają m.in.: EHEC, *E. albertii* oraz patogeny zwierzęce takie jak *Citrobacter rodentium*, czy enteropatogenne *E. coli* chorobotwórcze dla królików (REPEC) [93]. Szczepy EHEC różnią się od EPEC zdolnością produkcji toksyny Shiga odpowiedzialnej za uszkodzenie nerek i rozwój zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS). *E. albertii* została opisana w 2003 roku wśród szczepów wykrytych w próbkach kału dzieci z biegunką zamieszkujących

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 71 7841278; e-mail: pawlowska.barba@gmail.com



Rys. 1. Model patogenez EPEC: 1–2. Adhezja EPEC do komórek nabłonka dystalnego odcinka jelita cienkiego połączona z translokacją białek efektorowych (oznaczonych na schemacie symbolami geometrycznymi wewnątrz komórki) poprzez T3SS. 3. Reorganizacja cytoszkieletu komórki nabłonka pod wpływem ścisłej adhezji EPEC. 4. Powstanie aktywnego piedestału bezpośrednio pod przylegającymi bakteriami.

Bangladesz [41]. REPEC jest przyczyną biegunki o ciężkim przebiegu u królików, ale cechy kliniczne typowe dla zakażenia tą grupą bakterii są podobne do zakażeń EPEC u ludzi. *C. rodentium* powoduje hiperplazję śluzówki jelita u myszy, a w przypadku ciężkiego przebiegu zakażenia może prowadzić do wypadnięcia odbytu. Cechą wspólną wszystkich patogenów A/E jest obecność w ich genomie chromosomalnej wyspy patogenności LEE (the locus of enterocyte effacement), która niesie geny konieczne do indukowania w zakażonych enterocytach zmian typu A/E.

## 2. Wyspa patogenności LEE

LEE występująca u EPEC posiada 35 624 bp, ale jej wielkość może się różnić u szczepów EPEC i EHEC w zależności od wielkości regionów flankujących. W skład regionów flankujących mogą wchodzić sekwencje insercyjne IS (insertion sequence), profagi i geny kodujące białka efektorowe. Obecny w regionie flankującym 3' LEE gen *lifA/efa* koduje limfostatynę, czyli białko odgrywające ważną rolę w patogenezie zakażeń ze względu na właściwości immunomodulujące. LEE zawiera w swoim składzie 38,36% glicyny i cytozyny, czyli mniej niż wynosi odsetek tych aminokwasów w reszcie genomu *E. coli* (50,8%) oraz w regionie flankującym zawierającym gen *lifA/efa* (44,4%). Różnica w zawartości glicyny i cytozyny pomiędzy wyspą patogenności, a regionem flankującym uniemożliwia potraktowanie tych elementów jako jednośc [78]. Różnicowanie w zawartości glicyny i cytozyny pomiędzy wyspą patogenności, a resztą genomu jest typowe dla różnych gatunków bakterii, co sugeruje nabycie tego

ruchomego elementu genetycznego od innego gatunku na drodze horyzontalnego przekazu genów. W przypadku większości szczepów EPEC wyspa patogenności LEE jest zlokalizowana na chromosomie blisko genów kodujących tRNA selenocysteiny (*selC*) lub fenyloalaniny (*pheU*, *pheV*). Wyspy LEE u różnych gatunków bakterii są wysoce konserwatywne pod względem wielkości i organizacji genów. W składzie LEE wyróżnia się 41 konserwatywnych, otwartych ramek odczytu ORF (open reading frame), które zawierają zwykle więcej niż 50 nukleotydów [27]. Większość genów LEE jest zlokalizowana w obrębie 5 operonów policistronowych (LEE 1–5) i koduje m.in.: białko adhezyjne (intiminę), system sekrecji typu III T3SS (type three secretion system) w tym białka sekrecyjne Sep (secretion of *E. coli* proteins) i Esc (*Escherichia* secretion component), chaperony Ces (chaperone of *E. coli* secretion), translokatory EspA, EspB, EspD i białka efektorowe EspF, EspG, EspH, EspZ (*E. coli* secretion protein), Map (methionine aminopeptidase) oraz receptor dla intiminy Tir (translocated intimin receptor). Dodatkowo, LEE zawiera również geny kodujące regulatory takie jak: Ler (LEE-encoded regulator), GlrR (global regulator of LEE proteins, repressor) i GlrA (global regulator of LEE proteins, activator). Regulacja LEE jest złożonym procesem, na który składa się wiele czynników regulacyjnych kodowanych przez LEE, ale również czynników środowiskowych i globalnych systemów regulacji *E. coli* (H+NS, IHF, FIS, Quorum sensing, odpowiedź SOS). Ler jest głównym regulatorem transkrypcyjnym, który działa jako represor dla LEE-1 i aktywator LEE2-5, tworząc ujemne sprzężenie zwrotne [25, 64]. Ze względu na różnorodność kodowanych białek, pełna sekwencja LEE jest zwykle dzielona na trzy regiony. Na jednym końcu

kodowane są wszystkie białka związane z T3SS, na drugim białka sekrecyjne, a gen kodujący intiminę znajduje się pośrodku i rozdziela oba skrajne regiony [22].

## 2.1. Adhezja EPEC

Spożyte wraz z pokarmem EPEC kolonizują dystalny odcinek jelita cienkiego za pośrednictwem adhezyn, tj. fimbrii, czynnika Efa1/LifA oraz intiminy. Wśród fimbrii adhezyjnych EPEC wyróżnia się: fimbrie typu 1, fimbrie BFP (bundle forming pilus), fimbrie ECP (*E. coli* common pilus) oraz obecne u szczepów pozbawionych genu *ler* trzy rodzaje fimbrii: a) długie, cienkie b) sztywne, wygięte oraz c) krótkie, cienkie [5, 26, 34, 35, 73].

### 2.1.1. Fimbrie BFP

Należące do rodziny fimbrii typu IV, fimbrie BFP przypominają długie, giętkie wypustki, które mają skłonność do splatania się na kształt sznurów. Do innych patogenów wykazujących ekspresję fimbrii typu IV zalicza się m.in. *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Clostridium perfringens*. Synteza fimbrii BFP kodowana jest przez 14 genów operonu zlokalizowanego na plazmidzie EAF (EPEC adherence factor) o masie 50–70 kDa. Produktem genów plazmidu EAF jest również regulator Per (plazmid encoded regulator), który należy do rodziny białek AraC. Obecność plazmidu EAF jest podstawą podziału EPEC na typowe i atypowe szczepy [85]. Regulator Per odpowiada za prawidłową transkrypcję genu *bfp* oraz aktywację transkrypcji genów zarówno na jak i poza LEE [86]. Analiza sekwencji aminokwasów pierwszego genu operonu *bfp*, tj. genu *bfpA*, u różnych szczepów EPEC wykazała istnienie 9 alleli tego genu, które na podstawie stopnia podobieństwa sekwencji podzielono na dwie grupy:  $\alpha$  lub  $\beta$  [51]. Gen *bfpA* koduje białko prekursorowe, z którego po odcięciu przez peptydazę BfpP hydrofilowego odcinka sygnałowego powstaje główna strukturalna podjednostka fimbrii BFP (bundlina) o masie 19 kDa. W przestrzeni periplazmatycznej oksydoreduktaza (DsbA) stabilizuje główną globularną domenę poprzez katalizowanie reakcji, prowadzących do powstania wysoce konserwatywnego wiązania dwusiarczkowego w C-końcowym odcinku białka budującego BFP. Obecność konserwatywnego wiązania dwusiarczkowego jest charakterystyczną cechą fimbrii typu IV. Pozostałe geny operonu *bfp*, tj. *bfpB*, *bfpL*, *bfpP*, *bfpU* odpowiadają za prawidłową biosyntezę fimbrii i ich funkcje. Rolę dostarczającej energię ATPazy podczas syntezy fimbrii BFP odgrywa białko BfpD [72]. Mutacje w wyżej wymienionych genach (oprócz *bfpH* i *bfgF*) uniemożliwiają biosyntezę fimbrii BFP, a nieprawidłowości w sekwencji genu *bfpF* prowadzą do zaburzeń ich funkcji. Dodatkowo,

brak fimbrii BFP wiąże się z utratą zlokalizowanego typu adhezji i właściwości autoagregacyjnych szczepów EPEC. Białko BfpH prawdopodobnie jest lityczną transglikozylazą, która przypuszczalnie hydrolizuje warstwę peptydoglikanu umożliwiając podjednostkom strukturalnym BFP osiągnięcie błony zewnętrznej. Adhezja szczepów EPEC do nabłonka jelita jest możliwa dzięki obecności na powierzchni komórek gospodarza odpowiednich receptorów wiążących adhezyny. Fimbrie BFP zbudowane z głównej podjednostki  $\alpha$  wiążą się z N-acetylolaktozaminą (LacNAc). Niewielkie powinowactwo do LacNAc jest kompensowane obecnością co najmniej dwóch miejsc wiążących na każdym monomerze białka budującego BFP. Podjednostka główna kodowana przez allel  $\beta$  genu *bfpA* wykazuje brak aktywności wiążącej LacNAc, co sugeruje obecność innych receptorów wiążących BFP na powierzchni komórek gospodarza [42].

Fimbrie BFP są istotnym czynnikiem wirulencji EPEC. Pełnią one zasadniczą rolę podczas zakażenia, gdyż biorąc udział we wstępnej adhezji EPEC do enterocytów, odpowiadają za zlokalizowany typ adhezji (tzw. fenotyp LA) oraz przyczyniają się do rozwoju biofilmu. Rola w procesie tworzenia biofilmu przez EPEC polega na promowaniu interakcji pomiędzy komórkami bakteryjnymi, co prowadzi do ich autoagregacji, a następnie powstania trójwymiarowych mikrokolonii. [59] Retrakcja fimbrii BFP umożliwia natomiast rozprzestrzenianie się komórek bakteryjnych poza strukturę biofilmu na etapie dyspersji [13]. Proces retrakcji, który prowadzi do degradacji głównej podjednostki białkowej fimbrii BFP odgrywa również ważną rolę w ścisłej adhezji EPEC do komórek nabłonka, a dzięki temu w indukowaniu zmian histopatologicznych A/E poprzez translokację białek efektorowych T3SS. Za degradację białka BfpA budującego fimbrie BFP odpowiada podjednostka BfpF będąca ATPazą dostarczającą niezbędną energię podczas dysocjacji fimbrii [96]. Badania przeprowadzone na ochotnikach wykazały, że fimbrie BFP pełnią kluczową rolę w patogenezie zakażeń EPEC. Szczepy pozbawione genu *bfp* choć kolonizują jelito są około 200 razy mniej wirulentne niż szczepy posiadające *bfp* i powodują znacznie łagodniejszą biegunkę [7].

### 2.1.2. Fimbrie typu 1

Na powierzchni komórki bakteryjnej występuje od kilku do kilkuset fimbrii, które mogą należeć do różnych rodzajów. Większości bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazuje ekspresję fimbrii typu 1, które są kodowane przez chromosomalne geny operonu *fim*. Fimbrie typu 1 są zbudowane z wielu powtarzających się podjednostek białka strukturalnego (piliny) sztywne wypustki w kształcie helis. Fimbrie typu 1 mają długość ok. 1  $\mu$ m i średnicę ok. 7 nm. Na dystalnym końcu każdej wypustki znajduje się białko adhezyjne (FimH), które wiąże się z glikoproteinowym receptorem na



powierzchni komórki gospodarza. Bakterie posiadające fimbrie typu 1 są zdolne do adhezji do komórek nabłonka oraz hemaglutynacji erytrocytów. Proces aglutynacji jest hamowany przez mannozę lub jej analogi, dlatego fimbrie typu 1 są określane mianem fimbrii mannozo-wrażliwych MS (mannose-sensitive) [83, 92]. Badania przeprowadzone na grupie ochotników wykazały, że fimbrie MS typu 1 są immunogenne [24, 47].

### 2.1.3. Fimbrie powszechne *E. coli*

Odrębnie morfologicznie od fimbrii typu 1 oraz BFP są fimbrie powszechne *E. coli* ECP (*E. coli* common pilus), które występują zarówno u komensualnych jak i patogennych szczepów [71, 73]. Ekspresja ECP jest indukowana w odpowiednich warunkach hodowli, tj. w podłożach do hodowli linii komórkowych, w temperaturze 37°C oraz w obecności komórek nabłonka. Czas, po którym szczepy EPEC zaczynają produkować ECP zależy od rodzaju hodowli: bakterie hodowane w DMEM wykazują ekspresję ECP już po 1,5 godziny od zakażenia komórek, podczas gdy te hodowane w LB produkują tego rodzaju fimbrie dopiero po 4,5 godzinach. Analiza ultrastrukturalna wykazała, że równomiernie rozmieszczone na powierzchni bakterii, fimbrie ECP są cienkie (3 nm średnicy) oraz półgiętkie. Główna podjednostka strukturalna ECP jest kodowana przez wysoce konserwatywny gen *ecpA* (*yagZ* w przypadku szczepu K-12, *matB* u szczepów związanych z zapaleniem opon mózgowych). Badania przeprowadzone przez Saldana i wsp. [76] wykazały, że fimbrie ECP, rozpoznając receptory na powierzchni komórek nabłonka, odgrywają rolę podczas wstępnej adhezji. Sugeruje się również, że ECP są konieczne do stabilizacji adherujących bakterii, co sprzyja ich kolonizacji. Dodatkowo, wewnątrz mikrokolonii fimbrie ECP występują tylko wokół komórek EPEC, podczas gdy dłuższe wypustki fimbrialne BFP posiadają większy zasięg, wykraczają poza obszar pojedynczych bakterii i tworzą strukturę podobną do sieci [76].

### 2.1.4. Rzęski

Oprócz fimbrii udział w adhezji EPEC biorą rzęski. Są to długie (ok. 10 µm) wypustki białkowe zbudowane z trzech charakterystycznych części: ciała podstawowego, haka oraz włókna. Synteza rzęsek jest złożonym procesem, wymagającym obecności około 50 różnorodnych białek, które wchodzi w skład pojedynczych wypustek lub odpowiadają za ich prawidłowe funkcjonowanie. Ciało podstawowe jest odpowiedzialne za ruch rzęski i składa się z czterech pierścieni zakotwiczonych w błonie cytoplazmatycznej i zewnętrznej. Hak pełni funkcję elastycznego łącznika ciała podstawowego z włóknem i jest zbudowany z białka FlgE. Włókno składa się z lekko spiralnych rzędów osiowo ułożonych monomerów flageliny, czyli

białka FliC. Dystalny koniec włókna jest opłaszczony czapeczką z białka FliD [54, 79]. Obecność rzęsek na powierzchni bakterii umożliwia jej ruch, który jest niezbędny do rozprzestrzeniania się wielu patogenów wewnątrz organizmu gospodarza. Rzęski są kluczowym czynnikiem wirulencji m.in. *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, i *Helicobacter pylori*. Właściwości adhezyjne rzęsek zostały potwierdzone na podstawie wyników badań przeprowadzonych na szczepach należących do gatunków *Pseudomonas aeruginosa* i *Clostridium difficile*, które adherują do śluzu poprzez wiązanie mucyn. Rzęski biorą również udział w tworzeniu biofilmu przez *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* i *Aeromonas* spp. [28]. Dodatkowo, Zhou i wsp. [98] wykazali, że rzęski pełnią funkcję immunomodulującą, ponieważ indukują syntezę interleukiny 8 (IL-8) w komórkach nabłonka jelita. Bardziej szczegółowe badania przeprowadzili Khan i wsp. [50], którzy dowiedli, że rzęski silnie aktywują receptory TLR5 (toll-like receptor 5). FliC jest prawdopodobnie pierwszym i dominującym bodźcem prozapalnym podczas zakażenia *E. coli*.

Z badań Giron i wsp. [35] nad zdolnością adhezji szczepów EPEC wynika, że kontakt z powierzchnią nabłonka gospodarza oraz wydzielane przez komórki eukariotyczne cząsteczki sygnałowe prowadzą do indukcji syntezy rzęsek. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń badacze sugerują, że rzęski są u EPEC ważnym czynnikiem adhezji do komórek linii HeLa. Cząsteczki pobudzające ekspresję rzęsek, które są produkowane przez komórki eukariotyczne pozostają jak do tej pory nieznanne. Podobne wyniki otrzymali Erdem i wsp. [28], którzy wykazali zdolność wiązania szczepów EPEC do mucyn, czyli glikoprotein wchodzących w skład śluzu. Komórki nabłonka jelita wytwarzają śluz, który stanowi pierwszą linię obrony przed bakteriami chorobotwórczymi poprzez ograniczanie ich ruchliwości, wiązanie i usuwanie z przewodu pokarmowego wraz z ruchami perystaltycznymi. W związku z powyższym istnieje pogląd, że mucyny ograniczają adhezję szczepów EPEC do komórek nabłonka. Antagonistyczną hipotezę stawiają Erdem i wsp. [28], których doświadczenia przeprowadzone na tkankach bydłowych wykazały, że obecność rzęsek jest kluczowa podczas adhezji do komórek. Mutacje w genie *fliC* powodowały znaczący spadek adhezji badanych szczepów, co podkreśla istotność wiązania rzęsek z mucynami. Na tej podstawie Erdem i wsp. [28] sugerują, że wiązanie śluzu jest dla szczepów EPEC korzystne. Inni badacze, Cleary i wsp. [13], choć potwierdzili obecność rzęsek u adherentnych szczepów EPEC, nie stwierdzili ich wpływu na zdolność adhezji: pomimo, że badane szczepy UMD883 (*bfpA*<sup>-</sup> *espA*<sup>-</sup> *eae*<sup>+</sup>) i UMD888 (*bfpA*<sup>-</sup> *espA*<sup>-</sup> *eae*<sup>-</sup>) były urzęsione, nie posiadały zdolności adhezji do komórek linii Caco-2.

### 3. System sekrecji typu III

Bezpośrednia adhezja do komórek gospodarza umożliwia patogenom translokację różnorodnych cząsteczek efektorowych. Odpowiedzialny za wydzielanie białek efektorowych, aparat sekrecji typu III, występuje u EPEC oraz u *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Chlamydia* spp. oraz *Vibrio* spp. Ze względu na budowę T3SS porównywany jest do „molekularnej strzykawki”. Kompleks ten posiada masę ~3,5 MDa i składa się z zakotwiczonej w ścianie komórkowej podstawy oraz struktury podobnej do igły, która rozciąga się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej bakterii. „Tłok strzykawki” przechodzi przez błonę wewnętrzną, przestrzeń periplazmatyczną oraz błonę zewnętrzną bakterii. W przypadku EPEC w obrębie podstawy wyróżnia się pierścien wewnętrzny (EscJ, EscD) i zewnętrzny (EscC) oraz cylindryczny kanał (EscI), który łączy oba pierścienie [65]. Dodatkowym elementem systemu sekrecji na poziomie części podstawnej jest aparat eksportu. Jest to wysoce konserwatywna grupa białek błony wewnętrznej (EscR, EscS, EscT, EscU, EscV), która nadzoruje transport cząsteczek efektorowych poprzez kontrolę swoistości substratów [1]. W skład kompleksu „igły” wchodzi wiele kopii białka EscF, tworzących cienką rurkę, która na dystalnym końcu przechodzi w osłonę zbudowaną z białka EspA [91]. Długość „igły” zależy od ilości włókien EspA. Zadaniem tego elementu systemu sekrecji jest połączenie bakterii z komórką gospodarza, czyli utworzenie mostu, przez który transportowane są cząsteczki efektorowe [65, 81]. Końcówka „igły” służy jako platforma, na której mocuje się translokon, czyli struktura odpowiedzialna za przenoszenie cząsteczek efektorowych przez membranę. Translokon jest zbudowany z białek przezbłonowych (EspB, EspD) tworzących kanał wewnątrz błony komórki nabłonka jelita [53]. W celu uniknięcia przedwczesnych interakcji pomiędzy transportowanymi cząsteczkami a czynnikami degradującymi, powstają kompleksy efektorów z białkami opiekuńczymi. Są to znajdujące się w bakteryjnej cytoplazmie proteiny o małej masie molekularnej (< 15 kDa) i kwaśnym odczynie, które chronią i stabilizują cząsteczki efektorowe oraz regulują ich wydzielanie [15]. Na podstawie homologii w sekwencji aminokwasów oraz pełnionej funkcji wewnątrz rodziny białek opiekuńczych T3SS wyróżniono 4 klasy (IA, IB, II, III) [67]. Efektywny transport cząsteczek bezpośrednio do komórki gospodarza jest możliwy dzięki obecności wysoce konserwatywnej ATPazy, która hydrolizuje ATP. Ze względu na dynamiczne interakcje z wieloma białkami (np. EscL i EscQ), Tir oraz ze składnikami błonowymi aparatu sekrecji typu III proces hydrolizy ATP przebiega jednocześnie z wydzielaniem białek efektorowych. Szczepy EPEC pozyskują energię za pomocą

wykazującego homologię z  $F_0F_1$  ATP-azą białka EscN. Efektywność hydrolizy ATP zależy od obecności jonów  $Mg^{2+}$  oraz stężenia i struktury oligometrycznej EscN [3]. Pozyskiwanie energii jest głównym zadaniem EscN, ale ATP-aza jest również odpowiedzialna za uwalnianie cząstek efektorowych z wiązań z białkami opiekuńczymi przed wejściem do „igły”. Po rozpadzie kompleksów, białka opiekuńcze wracają do cytoplazmy komórki bakteryjnej i ulegają ponownemu wiązaniu z kolejnymi wydzielanymi cząsteczkami [90].

#### 3.1. Białka efektorowe EPEC

T3SS transportuje wiele bakteryjnych czynników wirulencji wprost do cytozolu komórki gospodarza, co umożliwia bakterii skuteczne zakłócanie procesów fizjologicznych przebiegających w atakowanej komórce [17]. Geny kodujące białka efektorowe znajdują się zarówno w obrębie jak i poza LEE. Rodzina cząsteczek efektorowych jest zróżnicowana i wykazuje wielokierunkowe działanie nakierowane na większość struktur w komórce gospodarza. Dodatkowo, cząsteczki efektorowe są wielofunkcyjnymi białkami, które mogą ze sobą współpracować w sposób synergiczny lub osiągając redundancję [18]. System sekrecji typu III rozpoznaje efekторы na podstawie sekwencji składającej się z około 15–20 reszt aminokwasowych znajdujących się w obrębie regionu N-końcowego. W tym regionie znajduje się również sekwencja (między 50 a 150 resztą aminokwasową), którą rozpoznają swoiste białka opiekuńcze. W przypadku niektórych cząsteczek efektorowych (np. Tir) duże znaczenie w przebiegu prawidłowej sekrecji i translokacji ma dodatkowo region C-końcowy [17]. W celu osiągnięcia zamierzonego efektu hierarchia transportowanych cząsteczek jest ściśle zdefiniowana. Geny kodujące cząsteczki efektorowe ulegają ekspresji w określonym czasie i z odpowiednim nasileniem, ale na efektywną translokację cząsteczek mają również wpływ czynniki takie jak: stężenie białka efektorowego wewnątrz komórki bakteryjnej, prawidłowe połączenie z białkiem opiekuńczym oraz trwała i właściwa adhezja bakterii do komórki gospodarza [57].

Pełen zestaw cząsteczek efektorowych EPEC jest prawdopodobnie kodowany przez 21 genów oraz co najmniej 5 pseudogenów (zawierających błędy w obszarze kodującym). Do białek efektorowych kodowanych na LEE zalicza się białka: Tir, Map, EspB, EspF, EspG, EspH, oraz EspZ. Wszystkie odkryte tzw. LEE-efektory posiadają destrukcyjne działanie, które w znacznym stopniu zmienia prawidłową budowę i funkcje komórek nabłonka jelita człowieka [18]. W skład drugiej grupy cząsteczek efektorowych T3SS wchodzi białka kodowane poza obszarem LEE (tzw. non-LEE effectors), a ich geny znajdują się na rozproszonych wewnątrz genomu sześciu wyspach patogenności. Niski odsetek

glicyny i cytozyny w sekwencji aminokwasów tych fragmentów DNA oraz sąsiedztwo genów pochodzących od profagów świadczą o pozyskaniu wysp kodujących białka efektorowe na drodze horyzontalnego przekazu genów. Częsteczki efektorowe pochodzące spoza LEE są bardziej konserwatywne wśród patogenów A/E w porównaniu z częsteczkami kodowanymi na LEE, które wykazują dużą zmienność [43]. Większość białek efektorowych kodowanych poza LEE ma niewyjaśniony mechanizm działania wewnątrz komórki gospodarza, ale sugeruje się, że są one wymagane do osiągnięcia pełnej zjadliwości EPEC. Dotychczas poznano rolę m.in. białka NleA, hamującego transport cząsteczek pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego w komórce gospodarza, cząsteczek efektorowych NleE i NleH, które aktywują wrodzoną odpowiedź immunologiczną oraz białka EspJ odpowiedzialnego za hamowanie fagocytozy. Podczas zakażenia szczepu EPEC hamują aktywność układu immunologicznego jelita, co kontrastuje z niedawno poznaną rolą NleE oraz NleH. Poznane cząstki efektorowe T3SS działają przeciwzapalnie, natomiast NleE oraz NleH indukują reakcje prozapalne. Ze względu na przeciwny efekt działania cząsteczek efektorowych na układ odpornościowy gospodarza istnieje hipoteza, że szczep EPEC przejściowo wzbudza, a następnie hamują odpowiedź prozapalną przed destrukcją ciasnych połączeń międzykomórkowych [18].

### 3.2. Intimina

Rozwój zmian w cytoszkielecie gospodarza jest poprzedzony ścisłą adhezją EPEC do błony enterocytów. Za przyleganie bakterii do komórek gospodarza odpowiada intimina, czyli obecne u wszystkich wirulentnych szczepów EPEC powierzchniowe białko adhezyjne. Intimina ma masę 94 kDa i jest kodowana przez gen *eae*, który wchodzi w skład LEE. Produkt genu *eae* składa się ze ściśle konserwatywnego regionu zawierającego około 700 aminokwasów, wewnątrz którego znajduje się domena w kształcie beta cylindra o właściwościach autotransportera oraz z karboksykońcowego regionu złożonego z 280 aminokwasów (Int<sub>280</sub>). Wewnątrz Int<sub>280</sub> cysteina w położeniu 937 (Cys<sub>937</sub>) posiada właściwości wiążące receptor [31]. Region Int<sub>280</sub> składa się z dwóch domen immunoglobulinopodobnych oraz z łatwo dostępnej domeny przypominającej lektynę typu C [52]. Dotychczas opisano 27 typów intiminy, ponieważ domena Int<sub>280</sub> wykazuje wysoki stopień zróżnicowania. Najczęściej występujące typy intiminy to:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  oraz  $\epsilon$  [30, 94]. Intimina  $\alpha$  jest charakterystyczna dla szczepów należących do klonu 1 (posiadających antygen rzęskowy H6), intimina  $\beta$  występuje u szczepów klonu 2 (posiadających antygen rzęskowy H2), intimina  $\gamma$  ulega ekspresji u szczepów serotypu O55:H7. Dodatkowo przypuszcza

się, że różne warianty intiminy są odpowiedzialne za zróżnicowany tropizm tkankowy prezentujących je szczepów *E. coli* [32, 69, 97]. Co więcej istnieją dowody na to, że intimina wiąże również receptory inne niż Tir, obecne na powierzchni komórek gospodarza, w tym  $\beta_1$ -integryny oraz nukleolinę [36, 82].

### 3.3. Tir

Receptor Tir dla intiminy (niefimbrialnej adhezyjny błony zewnętrznej EPEC) jest białkiem o masie 78 kDa kodowanym na LEE przez gen *tir*. Był to pierwszy odkryty receptor bakteryjny, który jest wbudowany w błonę plazmatyczną komórki eukariotycznej na skutek „wstrzyknięcia” przez T3SS. Przed właściwą translokacją dochodzi do powstania przejściowego kompleksu Tir z jego białkiem opiekuńczym CesT, który następnie rozpada się i umożliwia wbudowanie receptora w błonę komórkową gospodarza. Tir zawiera dwie domeny transbłonowe oraz centralną domenę wystającą poza komórkę i tworzy tzw. „spinkę do włosów”. Domeny amino- i karboksykońcowe Tir są zakotwiczone w cytoplazmie i ulegają interakcji z białkami gospodarza. Odcinek C-końcowy zawiera wiele reszt tyrozynowych, treoninowych i serynowych, które potencjalnie mogą ulegać fosforylacji. Po fosforylacji treoniny i seryny dochodzi do zwiększenia masy cząsteczkowej Tir do 90 kDa [49]. Intimina wiąże się z wysoce konserwatywną częścią centralną Tir, czyli z pozakomórkową pętlą „spinki” [16, 38, 87]. Przyłączenie intiminy indukuje oligomeryzację Tir w błonie plazmatycznej komórki gospodarza bezpośrednio pod przylegającą bakterią, co jest sygnałem do fosforylacji tyrozyny w domenie C-końcowej. Za proces fosforylacji tyrozyny w położeniu 474 (Y474) oraz 454 (Y454) odpowiedzialna jest kinaza c-Fyn z rodziny Src oraz kinazy należące do rodziny Abl, które przejściowo wiążą się z Tir [70]. Fosforylacja tyrozyny jest sygnałem do rekrutacji białek adaptorowych Nck1 i Nck2, które pełnią rolę aktywatorów procesu polimeryzacji aktyny. Proces ten zależy od białka N-WASP, należącego do rodziny białek syndromu Wiskott-Aldrich (Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP) [10]. Czynniki N-WASP jest odpowiedzialny za aktywację białek Arp2/3 spokrewnionych z aktyną (actin related proteins 2/3), które są niezwykle istotne w nukleacji *de novo* monomerów F-aktyny [11]. Opisana powyżej kaskada reakcji prowadzi ostatecznie do powstania struktur podobnych do piedestału, czyli nagromadzenia się, tuż pod przylegającymi bakteriami, włókien spolimeryzowanej F-aktyny,  $\alpha$ -aktyniny, taliny, ezryny, waliny oraz lekkich łańcuchów miozynowych [22]. Nasilenie procesu tworzenia piedestału zależy od warunków, w jakich znajdują się zakażone komórki nabłonka. Badania *in vivo* i *ex vivo* wykazują mniejszą zdolność EPEC do tworzenia tych struktur w porów-



naniu z komórkami hodowanymi *in vitro* [29]. Dodatkowo, badania *ex vivo* dowiodły, że fosforylacja Tir jest nieistotna podczas kolonizacji ludzkiego nabłonka jelita, a aktywacja kompleksu N-WASP jest niezależna od Nck. Powstawanie zmian A/E *ex vivo* wydaje się być bardziej złożone niż w przypadku badań prowadzonych na liniach komórkowych, ponieważ w komórkach jelita występuje więcej różnorodnych białek, które przypuszczalnie mogą uczestniczyć w tym procesie [80].

Intimina i Tir są kluczowymi czynnikami wirulencji EPEC, ponieważ biorą aktywny udział w procesie kolonizacji i rozwoju zakażenia, choć rola polimeryzacji aktyny nie została do końca wyjaśniona. Kaskady reakcji prowadzące do polimeryzacji aktyny są nieistotne podczas tworzenia zmian A/E, tym nie mniej znacznie wpływają na dopasowanie się patogenu i skuteczną kolonizację. Bakterie wykorzystują ruchliwość piedestałów aktynowych (wydłużanie się i skracanie) do poruszania się po powierzchni nabłonka oraz rozprzestrzeniania komórek potomnych [77]. Współpraca Tir z innymi białkami efektorowymi może mieć dodatkowy wpływ m.in. na połączenia międzykomórkowe oraz na zdolność inwazji EPEC.

### 3.4. Destrukcja połączeń międzykomórkowych

Komórki nabłonka połączone są za pomocą ciasnych połączeń, które składają się z kilku rodzajów białek (głównie kładyny i okładyny). Połączenia międzykomórkowe zapewniają integralność nabłonka i zapobiegają przypadkowym odkształceniom lub rozluźnieniu się przestrzeni pomiędzy pojedynczymi komórkami. Tkanka nabłonkowa stanowi przede wszystkim barierę ochronną, w której ciasne połączenia blokują przepływ molekuł przez przestrzeń pomiędzy sąsiadującymi ze sobą komórkami. Zaburzenia w tym obszarze nabłonka prowadzą do zmian przepuszczalności i prawdopodobnie przyczyniają do rozwoju biegunki [19, 52]. Kluczowa w procesie destrukcji ciasnych połączeń jest intimina oraz dwa białka efektorowe: EspF i Map. Wpływ intiminy polega na kontrolowaniu efektorów i efekt ten jest niezależny od Tir, co sugeruje jej zdolność wiązania z receptorami komórek gospodarza. Sugeruje się, że bakterie mogą regulować działanie cząsteczek efektorowych wewnątrz komórek gospodarza w sposób zależny i niezależny od Tir. EspF oraz Map działają zdecydowanie skuteczniej jeśli działają synergicznie, choć dominującą rolę odgrywa Map [19].

### 3.5. Zdolność inwazji i unikanie fagocytozy

Szczepy EPEC, które wykazują ekspresję EspT indukują przebudowę powierzchni nabłonka i wykazują zdolność inwazji [8]. Tworzenie charakterystycznych marszczeń błony cytoplazmatycznej komórek nabłonka

i lamellipodiów jest procesem wykorzystywanym przy inwazji takich patogennych bakterii jak *Salmonella* spp. czy *Shigella* spp. [66, 68]. Białko EspT należy do grupy efektorów WxxxE, czyli do białek wykazujących funkcje GTPazy. Modulowanie cytoszkieletu komórki gospodarza przez EspT jest możliwe dzięki aktywacji białek Rac1, Cdn42 (należących do rodziny białek Rho) oraz Wawe2 (z rodziny WASP). Główną rolą białek Rho jest regulowanie organizacji specyficznych filamentów F-aktyny, a Wawe2 posiada zdolność aktywacji Arp2/3. Szereg reakcji przebiegających na skutek działania EspT prowadzi ostatecznie do powstania w błonie plazmatycznej komórki gospodarza pęcherzyków makropinocytarnych, które umożliwiają patogenom inwazję. Bakterie, które wnikają do wnętrza komórek gospodarza lokalizują się wewnątrz wakuoli ECV (*E. coli* – containing vacuoles). Na tym etapie rola Tir polega na polimeryzacji aktyny i tworzeniu piedestałów dookoła wakuoli, co jest wymagane do wewnątrzkomórkowego przeżycia (uniknięcia fagocytozy) i replikacji bakterii [8]. Zatem, w przypadku szczepów posiadających zdolność inwazji, polimeryzacja aktyny zależna od Tir jest niezbędna do rozwoju zakażenia. Szczepy EPEC, które nie posiadają wyżej wymienionych determinant inwazji pozostają poza komórką gospodarza. Wewnątrzkomórkowa degradacja patogenu jest skuteczną metodą walki z patogenami i służy, jako pierwsza linia obrony organizmu gospodarza. Działanie białka EspH obniża skuteczność fagocytozy przez makrofagi podczas zakażenia EPEC, ponieważ białko to zakłóca działanie białek Rho, hamując ich czynnik regulatorowy GEF (guanine nucleotide exchange factor). Hamowanie GEF zapobiega aktywacji GTPazy oraz istotnej podczas fagocytozy polimeryzacji aktyny. Badania przeprowadzone na linii komórkowej HeLa wykazały, że EspH powoduje zaokrąglenie komórek na skutek znacznych zniszczeń wewnątrz struktury cytoszkieletu aktynowego i prowadzi do ich odrywania od powierzchni naczynia hodowlanego [22]. Inne działanie wykazuje białko przebłonowe wchodzące w skład translokonu (EspB), które zapobiega interakcji miozyny z aktyną. Zaburzenia w budowie aktomiozyny również prowadzą do zahamowania fagocytozy [44]. Dodatkowo, komórki bakteryjne, które nie uległy wcześniejszej opsonizacji mogą przy pomocy EspF bronić się przed makropinocytosą oraz transcytosą przez komórki M w nabłonku jelita. Jest to możliwe, ponieważ EspF hamuje kinazę fosfoinozytydu (PI3K) w komórce gospodarza, co skutkuje defosforylacją wielu białek i reorganizacją F aktyny [12, 56]. W przypadku immunofagocytozy (opsonofagocytozy) w pierwszym etapie dochodzi do opsonizacji bakterii przez IgG lub składnik dopełniacza C3b. Wykorzystanie EspJ umożliwia szczepom EPEC blokowanie receptorów (FcyR i CR3), czyli elementów wiążących opsoniny [55]. Ten szeroki wachlarz

wykorzystywanych strategii umożliwia bakteriom zarówno unikanie pochłaniania przez komórki żerne, jak i skuteczne rozwijanie zakażenia poza lub wewnątrz komórek gospodarza.

#### 4. Wpływ EPEC na apoptozę komórek gospodarza

Zdolność dynamicznego modulowania przeżywania zakażonych enterocytów jest unikalną cechą EPEC. Jest to możliwe dzięki aktywności różnych cząsteczek efektorowych na poszczególnych, postępujących po sobie etapach zakażenia [74]. W początkowej fazie zakażenia EPEC hamują apoptozę komórek nabłonka, zapobiegając w ten sposób złuszczeniu komórek na szczycie kosmków, a tym samym usunięciu przylegających do nich bakterii. [89]. EspZ jest białkiem złożonym z 98–100 aminokwasów, które jest wydzielane przez T3SS we wczesnym etapie zakażenia. Jego działanie polega na hamowaniu wewnętrznej drogi apoptotycznej komórek nabłonka jelita, co umożliwia pałeczkom *E. coli* adhezję do powierzchni komórki gospodarza i wstrzykiwanie cząstek efektorowych [74]. Innym białkiem efektorowym odpowiedzialnym za hamowanie śmierci komórek gospodarza jest NleH, białko należące do grupy efektorów kodowanych poza LEE. Białko NleH jest homologiem OspG *Shigella* spp. i blokuje apoptozę stymulowaną przez staurosporinę, brefeldynę A i tunikamycynę. Śmierć komórek gospodarza jest jednak pożądana w późnym stadium zakażenia EPEC, gdyż prowadzi do zaburzenia funkcji bariery jelita i zwiększenia jej przepuszczalności na skutek uszkodzenia ciasnych połączeń międzykomórkowych. Jednym z czynników indukujących apoptozę jest białko EspF złożone z 206 aminokwasów, które w swoim składzie zawiera trzy, prawie identyczne sekwencje bogate w prolinę. Działanie EspF dotyczy głównie mitochondrialnej drogi apotozy, czyli prowadzi do zmiany kształtu i zaburzenia przepuszczalności błony mitochondrialnej, uruchomienia kaspazy 9 oraz 3, a następnie uwolnienia cytochromu c z mitochondriów [62]. EspF jest typową wielofunkcyjną cząsteczką efektorową aparatu sekrecji typu III, co oznacza, że poza wpływem na mitochondria wykazuje również aktywność wobec innych struktur komórkowych. Interakcje EspF z różnymi białkami gospodarza powodują m.in.: zacieranie mikrokosmków, rozluźnienie ciasnych połączeń międzykomórkowych oraz zahamowanie transportu jonów przez błonę [19, 20, 37]. Poza EspF za indukowanie apoptozy jest odpowiedzialny również czynnik Cif (cycle inhibiting factor), kodowany przez profaga  $\lambda$ , a następnie wbudowywany do DNA bakterii w pobliżu operonu *Bio* i wstrzykiwany do komórki gospodarza za pośrednictwem T3SS. Cif hamuje cykl komórkowy, ponieważ pod wpływem indukcji nieod-

wracalnego efektu cytopatycznego w komórce eukariotycznej gromadzi się nieaktywna forma kinazy zależnej od cykliny 1 (Cyclin-dependent kinase 1, Cdk1), która uniemożliwia postęp cyklu komórkowego [45].

#### 5. Inne systemy sekrecji EPEC

Bakterie Gram-ujemne, w tym *E. coli*, wykorzystują tzw. systemy sekrecji do translokacji różnorodnych białek z cytoplazmy mikroorganizmu do wnętrza komórki gospodarza. Wiedza na temat wykorzystywania systemów sekrecji typu II (T2SS) oraz V (T5SS) przez szczepy EPEC jest jak dotychczas ograniczona w porównaniu do najlepiej poznanego systemu wydzielania T3SS.

T2SS składa się z co najmniej 12 białkowych podjednostek budujących aparat sekrecji, który na powierzchni błony zewnętrznej bakterii tworzy strukturę podobną do pseudofimbrii. Mechanizm działania tego typu sekrecji zależy od białek Sec lub Tat, biorących aktywny udział w transporcie wydzielanego białka efektorowego do przestrzeni periplazmatycznej. W następnym etapie kompleksy białka z cząsteczkami Sec lub Tat rozpadają się i białko efektorowe w formie pofalduwanej transportowane jest przez T2SS do wnętrza komórki gospodarza. Szczepy EPEC wykazują ekspresję T2SS<sub>H10407</sub>, który jest wysoce konserwatywny i występuje również u innych patogrup *E. coli* t.j.: EAEC, ETEC, EIEC oraz EHEC. Badania Baldi i wsp. [6] wykazały, że T2SS jest istotnym czynnikiem wirulencji zaangażowanym w proces dojrzewania biofilmu EPEC, ponieważ mutanty pozbawione T2SS w przeciwieństwie do szczepów dzikich rozwijają biofilm tylko do etapu związanego z powstaniem mikrokolonii. Głównym substratem T2SS jest lipoproteina SslE (secreted and surface-associated lipoprotein from *E. coli*), która w wyniku sekrecji zostaje zakotwiczona w błonie gospodarza. SslE prawdopodobnie wpływa na tworzenie biofilmu, gdyż moduluje interakcje pomiędzy komórkami oraz komórkami a powierzchnią, na której powstaje biofilm. Dodatkowo, Baldi i wsp. [6] udowodnili, że wpływ T2SS oraz SslE na patogenność zakażeń wywoływanych przez szczepy EPEC jest niezależny od obecności LEE.

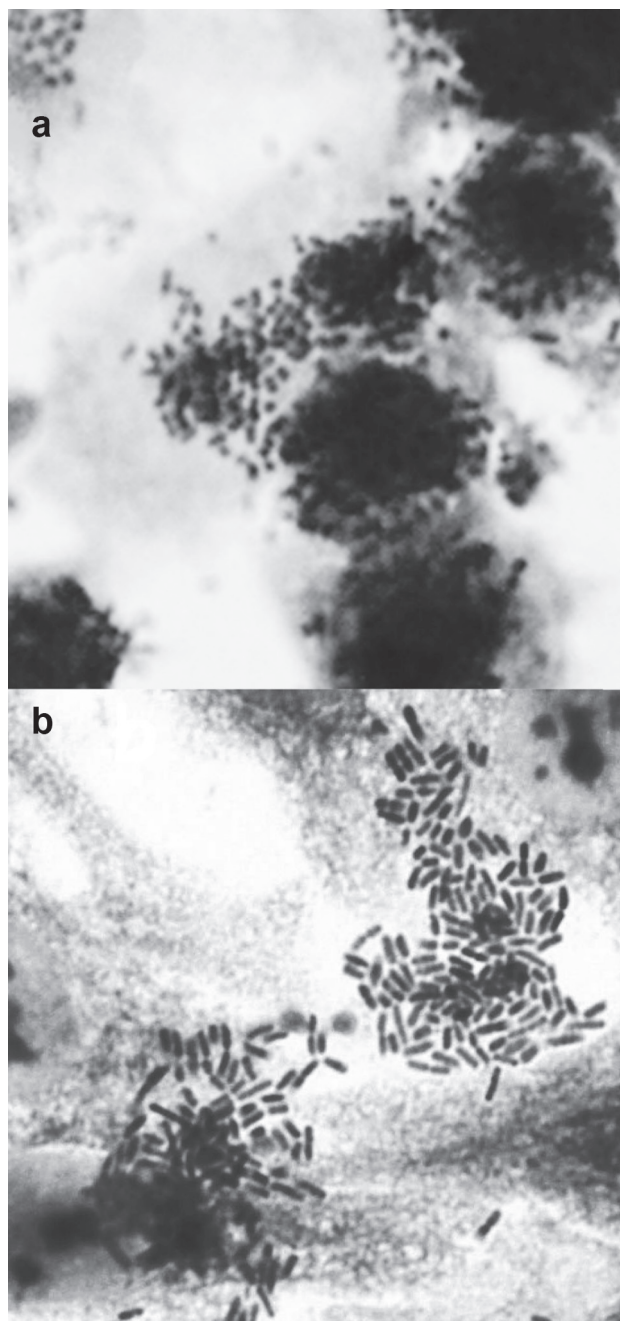
Inny mechanizm działania, w odróżnieniu od T2SS, jest wykorzystywany w przypadku systemu autotransporterowego T5SS. Białka efektorowe T5SS są nazywane autotransporterami, ponieważ wydzielane białka nie wymagają dodatkowego aparatu wspomagającego ich sekrecję do peryplazmy przez błonę zewnętrzną. Cząsteczka będąca autotransporterem jest syntezowana jako białko prekursorowe, w którym domena C-terminalna tworzy w błonie zewnętrznej kanał służący do transportu domeny wewnętrznej, czyli „pasażerskiej”. W kolejnym etapie na powierzchni komórki dochodzi



do uwolnienia przetransportowanej domeny N-końcowej do środowiska zewnątrzkomórkowego na drodze proteolizy [39]. Szczepy EPEC wykorzystują T5SS do translokacji cytotoksyny EspC, która jest białkiem o masie 110 kDa kodowanym przez drugą wyspę patogenności EPEC. Regulacja ekspresji genu *espC* kodującego toksynę EspC zależy od regulatora Ler, który kontroluje ekspresję cząsteczek efektorowych T3SS. Dodatkowo, Vidal i Navarro-Garcia [88] zaobserwowali kooperację systemów wydzielania. T5SS uczestniczy w sekrecji EspC do środowiska zewnątrzkomórkowego, a jej translokacja do wnętrza komórki gospodarza zachodzi przy pomocy T3SS. Reasumując, mechanizmy sekrecji białek odgrywają kluczową rolę w patogeniezie EPEC, gdyż umożliwiają licznym białkom efektorowym częściowe uszkodzenie komórki gospodarza lub prowadzenie do ich apoptozy.

## 6. Typowe i atypowe EPEC

W 1995 roku szczepy EPEC zostały podzielone na dwie grupy: typowe (tEPEC) i atypowe (aEPEC). Podział ten opiera się na obecności plazmidu EAF u tEPEC oraz jego braku w przypadku aEPEC [46]. Bardziej szczegółowa definicja aEPEC określa, że szczepy należące do tej grupy nie posiadają fimbrii BFP oraz nie produkują toksyny Shiga, ale powodują charakterystyczne zmiany histopatologiczne A/E i należą do klasycznych lub innych serotypów nietypowych dla EPEC. Ekspresja fimbrii BFP u tEPEC wiąże się ze zlokalizowanym typem adhezji LA (localised adherence), który charakteryzuje się obecnością skupisk mikrokolonii bakterii przy jednym lub obu biegunach komórki. Obecność mannozy nie hamuje autoagregacji oraz fenotypu LA, co jednocześnie wyklucza udział fimbrii typu 1 w procesie adhezji. Fenotyp LA można obserwować zarówno *in vitro* w teście adhezji do komórek linii HEp-2 lub HeLa jak i *in vivo* w biopsjach błony śluzowej jelita osób zakażonych EPEC (Rys. 2). Ze względu na dużą heterogenność aEPEC ich typy adhezji mogą być różne w zależności od szczepu, tj.: zlokalizowany, podobny do zlokalizowanego LAL (localised adherence like), rozsiany DA (diffuse adherence), agregacyjny AA (aggregative adherence) lub szczepy te mogą nie wykazywać mannozo-opornej adhezji do komórek NA (non adherent) [83]. Fenotyp LAL występuje najczęściej wśród aEPEC i jest rozpoznawany na podstawie obecności nielicznych mikrokolonii bakteryjnych o luźnej strukturze, które powstają po wydłużonej inkubacji aEPEC z komórkami nabłonka (Rys. 2). Sugeruje się, że szczepy prezentujące LAL mogą wywoływać biegunkę. Zróżnicowanie szczepów aEPEC dotyczy również profilu genetycznego, obejmującego odmienne kombinacje genów kodujących czynniki chorobotwórczości. Biorąc pod uwagę występowanie



Rys. 2. Typy adhezji enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* do komórek linii HEp-2: a) zlokalizowany (AA), b) podobny do zlokalizowanego (LAL)

wielu genów wirulencji na ruchomych elementach genetycznych, w tym plazmidach, wyspach patogenności i transpozonach, obecność w genomie aEPEC genów pochodzących od innych patogenów jelitowych prawdopodobnie nastąpiła w wyniku horyzontalnego transportu genów. Co więcej, część szczepów aEPEC może powstawać na skutek utraty genów, np. rodzicielski szczep tEPEC po utracie plazmidu EAF lub EHEC, który zgubił geny odpowiedzialne za kodowanie toksyny Shiga staje się szczepem aEPEC [40]. Podsumowanie charakterystycznych cech typowych i atypowych szczepów EPEC przedstawiono w tabeli I.

Tabela I  
Różnicowanie typowych i atypowych szczepów EPEC

Cecha	Typowe EPEC	Atypowe EPEC
Najczęściej izolowane serotypy	O55:H6, O55:NH, O86:H34, O119:H6, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O14:H34	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H25, O119:H2
Zmiany A/E	+	+
Plazmid EAF	+	-
Toksyna Shiga	-	-
Wyspa patogenności LEE	+	+
Typ adhezji (do komórek Hep-2/ HeLa)	LA	LA/LAL/DA/AA/NA
Regulacja ekspresji genów	Per, Ler, <i>Quorum sensing</i>	Ler, <i>Quorum sensing</i>
Rezerwuuar	ludzie	ludzie, zwierzęta

Legenda: A/E – attaching and effacing tj. przyleganie i zacieranie struktury mikroosmków; EAF – EPEC adherence factor tj. plazmid, który niesie geny kodujące fimbrie BFP i regulator Per; LEE – the locus of enterocyte effacement tj. wyspa patogenności kodująca czynniki niezbędne w indukowaniu zmian A/E; LA – zlokalizowany typ adhezji (localized adherence), LAL – adhezja podobna do zlokalizowanej (localised adherence like), DA – rozsiany typ adhezji (diffuse adherence); AA – agregacyjny typ adhezji (aggregative adherence); NA – brak zdolności mannozo-opornej adhezji (non adherent); Per – Plasmid encoded regulator tj. regulator transkrypcyjny kodowany na plazmidzie EAF; Ler – LEE-encoded regulator tj. główny regulator transkrypcyjny LEE

Przez wiele lat, tEPEC uważano za główny patogen niemowląt w krajach rozwijających się, ale badania epidemiologiczne przeprowadzane w ostatnim czasie sugerują wzrost liczby izolowanych szczepów aEPEC zarówno w krajach rozwijających się jak i rozwiniętych [63]. Udział aEPEC w bieguncie jest nierozstrzygnięty, gdyż niektóre badania wykazują jednakową częstość izolacji aEPEC od osób zdrowych jak i chorych [84, 95]. Badania, które ujawniają związek aEPEC z występowaniem biegunki różnią się pod względem sugerowanego przebiegu zakażenia, który określan jest jako ostry lub przewlekły [2, 4, 33, 61]. Rozwój przewlekłej biegunki po zakażeniu aEPEC jest przypuszczalnie spowodowany hamowaniem apoptozy enterocytów i zdolnością tych szczepów do długotrwałej kolonizacji nabłonka jelita. Przewlekła biegunka u dzieci może prowadzić do zaburzeń w prawidłowym rozwoju, co szczególnie dotyczy niemowląt w krajach rozwijających się [61].

Człowiek jest jedynym rezerwuarem dla szczepów tEPEC, natomiast aEPEC występują również u zwierząt dzikich oraz domowych. Patogenne szczepy izolowane od zwierząt mogą należeć do serotypów (m.in. O26, O103, O119, O128, O142), które charakteryzują szczepy chorobotwórcze dla ludzi. Dodatkowo, przy pomocy nowoczesnych metod molekularnych (MLST, PFGE) wykazano bliskie pokrewieństwo szczepów aEPEC izolowanych od ludzi i zwierząt, co sugeruje, że zwierzęta mogą stanowić źródło zakażenia dla ludzi [14, 60].

## 7. Podsumowanie

Największą przeszkodą w kompleksowym zrozumieniu patomechanizmów działania szczepów EPEC jest brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Badania przeprowadzone w ostatnich latach znacznie pogłębiły naszą wiedzę na temat interakcji pomiędzy EPEC

a komórkami gospodarza. Niemniej jednak, zakażenia te nie ograniczają się do jednego typu komórek i powinny być rozważane bardziej kompleksowo, tzn. w odniesieniu do całego organizmu gospodarza. Dodatkowym ograniczeniem jest brak zdolności wywoływania biegunki przez szczepy EPEC patogenne dla ludzi u zwierząt laboratoryjnych (z wyjątkiem noworodków makaków) [48]. Stąd, nierzadko w badaniach patogeny zakażeń szczepami EPEC wykorzystywane są inne, chorobotwórcze patogeny indukujące w nabłonku jelita zmiany typu A/E. *Citrobacter rodentium* (patogen myszy) wywołuje zmiany A/E i wykazuje wiele cech wspólnych ze szczepami EPEC, ale istnieje zbyt duża różnica pomiędzy organizmem człowieka oraz myszy, by móc uznać ten model za właściwy. Dodatkowo, *C. rodentium* kolonizuje jelito grube, podczas gdy EPEC jelito cienkie, a skutkiem zakażenia zdecydowanie częściej jest przerost nabłonka jelita niż biegunka [23]. Szczepy REPEC wywołują u królików zakażenie obejmujące jelito cienkie, podczas którego występuje biegunka. W tym przypadku różnica pomiędzy oboma patogenami dotyczy głównie charakterystycznego typu adhezji, gdyż szczepy tEPEC posiadają zlokalizowany, natomiast REPEC rozsiany typ adhezji [58]. Szczepy aEPEC są izolowane od różnych gatunków zwierzęcych, ale w przypadku tEPEC liczba organizmów, która może być potencjalnym źródłem izolatów jest ograniczona. W związku z tym, badania na ochetnikach lub ssakach naczelnych powinny być prowadzone na szerszą skalę w celu dokładnego poznania patogeny zakażeń EPEC. Metodologia badań powinna skupiać się na szczegółowym poznaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu człowieka na antygeny EPEC, co w przyszłości umożliwi stworzenie odpowiedniej szczepionki, która mogłoby zminimalizować wysoką śmiertelność wśród dzieci spowodowaną zakażeniami EPEC [23].

## Piśmiennictwo

- Abrusci P, Lea S.M. i wsp.: Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 99–104 (2013)
- Afset J.E., Bevanger L., Romundstad P., Bergh K.: Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1137–1144 (2004)
- Andrade A., Pardo J.P., Espinosa N., Pérez-Hernández G., González-Pedrajo B.: Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 121–127 (2007)
- Araujo J.M., Tabarelli G.F., Aranda K.R., Fabbriotti S.H., Fagundes-Neto U., Mendes C.M., Scaletsky I.C.: Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3396–3399 (2007)
- Badea L., Doughty S., Nicholls L., Sloan J., Robins-Browne R.M., Hartland E.L.: Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb. Pathog.* **34**, 205–215 (2003)
- Baldi D.L., Tauschek M. i wsp. The type II secretion system and its ubiquitous lipoprotein substrate, SslE, are required for biofilm formation and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**, 2042–2052 (2012)
- Bieber D., Ramer S. W., Wu Ch.-Y., Murray W.J., Tobe T., Fernandez R., Gary K. Schoolnik G.K.: Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, **280**, 2114–2118 (1998)
- Bulgin R., Arbeloa A., Chung J.C., Frankel G.: EspT triggers formation of lamellipodia and membrane ruffles through activation of Rac-1 and Cdc42. *Cell Microbiol.* **11**, 217–229 (2009)
- Bulgin R., Arbeloa A., Goulding D., Dougan G., Crepin V.F., Raymond B., Frankel G.: The T3SS effector EspT defines a new category of invasive enteropathogenic *E. coli* (EPEC) which form intracellular actin pedestals. *PLOS Pathog.* **5**, e1000683 (2009)
- Campellone K.G., Giese A., Tipper D.J., Leong J.M.: A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* **43**, 1227–1241 (2002)
- Campellone K.G., Welch M.D.: A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 237–251 (2010)
- Celli J., Olivier M., Finlay B.B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J.* **20**: 1245–1258 (2001)
- Cleary J., Lai L.C., Shaw R.K., Stratman-Iwanowska A., Donnenberg M.S., Frankel G., Knutton S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*, **150**, 527–538 (2004)
- Clermont O., Olier M., Hoede C., Diancourt L., Brisse S., Keroudean M., Glodt J., Picard B., Oswald E., Denamur E.: Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 654–662 (2011)
- Creasey E.A., Friedberg D., Shaw R.K., Umanski T., Knutton S., Rosenshine I., Frankel G.: CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiology*, **149**, 3639–3647 (2003)
- de Grado M., Abe A., Gauthier A., Steele-Mortimer O., DeVinney R., Finlay B.B.: Identification of the intimin binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **1**, 7–18 (1999)
- Dean F.: Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 1100–1125 (2011)
- Dean F., Kenny B.: The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 101–109 (2009)
- Dean P., Kenny B.: Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol.* **54**, 665–675 (2004)
- Dean P., Maresca M., Schüller S., Phillips A. D., Kenny B.: Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1876–1881 (2006)
- Dong N., Liu L., Shao F.: A bacterial effector targets host DH-PH domain RhoGEFs and antagonizes macrophage phagocytosis. *EMBO J.* **29**, 1363–1376 (2010)
- Donnenberg M.S.: Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 451–455 (1999)
- Donnenberg M.S., Finlay B.B.: Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. *Trends Microbiol.* **21**, 317–319 (2013)
- Elliott S.J., Kaper J.B.: Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. *Microb. Pathog.* **23**, 113–118 (1997)
- Elliott S.J., O'Connell C.B., Koutsouris A., Brinkley C., Donnenberg M.S., Hecht G., Kaper J.B.: A Gene from the Locus of Enterocyte Effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect. Immun.* **70**, 2271–2277 (2002)
- Elliott S.J., Sperandio V., Girón J.A., Shin S., Mellies J.L., Wainwright L., Hutcheson S.W., McDaniel T.K., Kaper J.B.: The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **68**, 6115–6126 (2000)
- Elliott S.J., Wainwright L.A., McDaniel T.K., Jarvis K.G., Deng Y.K., Lai L.C., McNamara B.P., Donnenberg M.S., Kaper J.B.: The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* **28**, 1–4 (1998)
- Erdem A.L., Avelino F., Xicohtencatl-Cortes J., Girón J.A.: Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 7426–7435 (2007)
- Fitzhenry R.J., Stevens M.P., Jenkins C., Wallis T.S., Heuschkel R., Murch S., Thomson M., Frankel G., Phillips A.D.: Human intestinal tissue tropism of intimin epsilon O103 *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 311–316 (2003)
- Frankel G., Candy D.C., Everst P., Dougan G.: Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* **62**, 1835–1842 (1994)
- Frankel G., Phillips A.D., Novakova M., Batchelor M., Hicks S., Dougan G.: Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol. Microbiol.* **29**, 559–570 (1998)
- Frankel G., Phillips A.D., Trabulsi L.R., Knutton S., Dougan G., Matthews S.: Intimin and the host cell – is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol.* **9**, 214–218 (2001)
- Franzolin M.R., Alves R.C., Keller R., Gomes T.A. T., Beutin L., Barreto M.L., Milroy C., Strina A., Ribeiro H., Trabulsi L.R.:



- Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem. I. Oswaldo. Cruz.* **100**, 359–363 (2005)
34. Giron J.A., Ho A.S., Schoolnik G.K.: An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, **254**, 710–713 (1991)
  35. Girón J.A., Torres A.G., Freer E., Kaper J.B.: The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **44**, 361–379 (2002)
  36. Gonçalves N.S., Hale C., Dougan G., Frankel G., MacDonald T.T.: Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to lymphocytes and its functional consequences. *Infect. Immun.* **71**, 2960–2965 (2003)
  37. Guttman J.A., Li Y., Wickham M.E., Deng W., Vogl A.W., Finlay B.B. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo*. *Cell. Microbiol.* **8**, 634–645 (2006)
  38. Hartland E. L., Batchelor M., Delahay R.M., Hale C., Matthews S., Dougan G., Knutton S., Connerton I., Frankel G.: Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol. Microbiol.* **32**, 151–158 (1999)
  39. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., AlaAldeen D.: Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692–744 (2004)
  40. Hernandez R.T., Elias W.P., Vieira M.A., Gomes T.A.: An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **297**, 137–149 (2009)
  41. Huys G., Cnockaert M., Janda J.M., Swings J.: *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 807–810 (2003)
  42. Hyland R.M., Sun J., Griener T.P., Mulvey G.L., Klassen J.S., Donnenberg M.S., Armstrong G.D.: The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol.* **10**, 177–187 (2008)
  43. Iguchi A., Thomson N.R., Ogura Y., Saunders D., Ooka T., Henderson I.R., Harris D., Asadulghani M., Kurokawa K., Dean P.: The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* **191**, 347–354 (2009)
  44. Iizumi Y., Sagara H., Kabe Y., Azuma M., Kume K., Ogawa M., Nagai T., Gillespie P. G., Sasakawa C., Handa H.: The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe*. **2**, 383–392 (2007)
  45. Jubelin G., Oswald E. i wsp.: Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens *PLOS ONE*, **4**, 1–13 (2009)
  46. Kaper J.B.: Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* **27**, 130–133 (1996)
  47. Karch H., Heesemann J., Laufs R., Kroll H.P., Kaper J.B., Levine M.M.: Serological response to type 1-like somatic fimbriae in diarrheal infection due to classical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **2**, 425–434 (1987)
  48. Kelleher S.L., Casas I., Carbajal N., Lönnerdal B.: Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **35**, 162–168 (2002)
  49. Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D.J., Frey E.A., Finlay B.B.: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, **91**, 511–520 (1997)
  50. Khan M.A., Bouzari S., Ma C., Rosenberger C.M., Bergstrom K.S.B., Gibson D., Steiner T.S., Vallance B.A.: Flagellin-dependent and -independent inflammatory responses following infection by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* **76**, 1410–1422 (2008)
  51. Lacher D.W., Steinsland H., Blank T.E., Donnenberg M.S., Whittam T.S.: Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J. Bacteriol.* **189**, 342–350 (2007)
  52. Lai Y., Rosenshine I., Leong J.M., Frankel G.: Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **15** 1796–1808 (2013)
  53. Luo W., Donnenberg M.S.: Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. *J. Bacteriol.* **193**, 2972–2980 (2011)
  54. Macnab R.M.: How bacteria assemble flagella. *Annu Rev. Microbiol.* **57**, 77–100 (2003)
  55. Marchès O., Covarelli V., Dahan S., Cougoule C., Bhatta P., Frankel G., Caron E.: EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol.* **10**, 1104–1115 (2008)
  56. Martinez-Argudo I., Sands C., Jepson M.A.: Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an *in vitro* M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol.* **9**, 1538–1546 (2007)
  57. Mills E., Baruch K., Charpentier X., Kobi S., Rosenshine I.: Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Host Microbe*. **143**, 104–113 (2008)
  58. Milon A., Oswald E., De Rycke J.: Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res.* **30**, 203–219 (1999)
  59. Moreira C. G., Palmer K., Whiteley M., Sircili M P., Trabulsi L.R., Castro A.F., Sperandio V.: Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 3952–3961 (2006)
  60. Moura R.A., Sircili M.P., Leomil L., Matté M.H., Trabulsi L.R., Elias W.P., Irino K., Pestana de Castro A.F.: Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7399–7408 (2009)
  61. Nguyen R.N., Taylor L.S., Tauschek M., Robins-Browne R.M.: A typical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 597–603 (2006)
  62. Nougayrède J.P., Donnenberg M.S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* **6**, 1097–1111 (2004)
  63. Ochoa T.J., Barletta F., Contreras C., Mercado E.: New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**, 852–856 (2008)
  64. Ochoa T.J., Contreras C.A.: Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 478–483 (2011)
  65. Ogino T., Ohno R., Sekiya K., Kuwae A., Matsuzawa T., Nonaka T., Fukuda H., Imajoh-Ohmi S., Abe A. Assembly of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 2801–2811 (2006)
  66. Ohya K., Handa Y., Ogawa M., Suzuki M., Sasakawa C.: IpgB1 is a novel Shigella effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 24022–24034 (2005)
  67. Parsot C., Hamiaux C., Page A.L.: The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7–14 (2003)
  68. Patel J.C., Galan J.E.: Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J. Cell. Biol.* **175**, 453–463 (2006)

69. Phillips A.D., Frankel G.: Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J. Infect. Dis.* **181**, 1496–1500 (2000)
70. Phillips N., Hayward R.D., Koronakis V.: Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 618–625 (2004)
71. Pouttu R., Westerlund-Wikstrom B., Lang H., Alsti K., Virkola R., Saarela U., Siitonen A., Kalkkinen N., Korhonen T.K.: *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J. Bacteriol.* **183**, 4727–4736 (2001)
72. Ramboarina S., Fernandes P.J., Daniell S., Islam S., Simpson P., Frankel G., Booy F., Donnenberg M.S., Matthews S.: Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 40252–40260 (2005)
73. Rendon M.A., Saldana Z., Erdem A.L., Monteiro-Neto V., Vazquez A., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10637–10642 (2007)
74. Roxas J.L., Wilbur J.S., Zhang X., Martinez G., Vedantam G., Viswanathan V.K.: The Enteropathogenic *Escherichia coli*-secreted protein EspZ inhibits host cell apoptosis. *Infect Immun.* **80**, 3850–3857 (2012)
75. Ruchaud-Sparagano M.H., Maresca M., Kenny B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cell. Microbiol.* **9**, 1909–1921 (2007)
76. Saldana Z., Erdem A.L., Schüller S., Okeke I.N., Lucas M., Sivananthan A., Phillips A.D., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A.: The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 3451–3461 (2009)
77. Sanger J.M., Chang R., Ashton F., Kaper J.B., Sanger J.W.: Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **34**, 279–287 (1996)
78. Schmidt M.A.: LEE ways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell. Microbiol.* **12**, 1544–1552 (2010)
79. Schoenhals G., Whitfield C.: Comparative analysis of flagellin sequences from *Escherichia coli* strains possessing serologically distinct flagellar filaments with shared complex surface pattern. *Journal of Bacteriology*, **175**, 5395–5402 (1993)
80. Schuller S., Chong Y., Lewin J., Kenny B., Frankel G., Phillips A.D.: Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during *ex vivo* colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models. *Cell. Microbiol.* **9**, 1352–1364 (2007)
81. Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C., Abe A.: Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11638–11643 (2001)
82. 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.* **277**, 2876–2885 (2002)
83. Sobieszcańska B.M.: Wpływ adhezji enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* na organizację cytoszkieletu enterocytów. *Post. Mikrobiol.* **41**, 111–131 (2002)
84. Spano L.C., Sadovsky A.D., Segui P.N., Saick K.W., Kitagawa S.M., Pereira F.E., Fagundes-Neto U., Scaletsky I.C.: Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **57**, 359–363 (2008)
85. Stone K.D., Zhang H.-Z., Carlson L.K., Donnenberg M.S.: A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* **20**, 325–337 (1996)
86. Tobe T., Hayashi T., Han C.G., Schoolnik G.K., Ohtsubo E., Sasakawa C.: Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect. Immun.* **67**, 5455–5462 (1999)
87. Touze T., Hayward R.D., Eswaran J., Leong J.M., Koronakis V.: Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol. Microbiol.* **51**, 73–87 (2004)
88. Vidal J.E., Navarro-García F.: EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell. Microbiol.* **10**, 1975–1986 (2008)
89. Vossenkämper A., Macdonald T.T., Marchès O.: Always one step ahead: How pathogenic bacteria use the type III secretion system to manipulate the intestinal mucosal immune system. *J. Inflamm.* **8**, 11 (2011)
90. Wilharm G., Dittmann S., Schmid A., Heesemann J.: On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 27–36 (2007)
91. Wilson R.K., Shaw R.K., Daniell S., Knutton S., Frankel G.: Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **3**, 753–762 (2001)
92. Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. *Postepy Hig. Med. Dośw.* **63**, 176–199 (2009)
93. Wong A.R., Pearson J.S., Bright M.D., Munera D., Robinson K.S., Lee S.F., Frankel G., Hartland E.L.: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol. Mikrobiol.* **80**, 1420–1438 (2011)
94. Xue-Han Z., Qing Y., Ya-Dong L., Bin L., Renata I., Kong-Wang H.: Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing microbial pathogens. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1665–1672 (2013)
95. Yatsuyanagi, J., Saito S., Sato H., Miyajima Y., Amano K., Enomoto K.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 294–297 (2002)
96. Zahavi E.E., Aroeti B. i wsp. Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 2436–2447 (2011)
97. Zhang W.L., Köhler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H.: Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4486–4492 (2002)
98. Zhou X., Giron J.A., Torres A.G., Crawford J.A., Negrete E., Vogel S.N., Kaper J.B.: Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect. Immun.* **71**, 2120–2129 (2003)