

MAGDALENA SZEWCZYK

*Prywatne Salesjańskie Liceum Ogólnokształcące
Młodych Techników 17, 53-647 Wrocław
Zespół Szkół Fundacji Oświatowej EKOLA
Tadeusza Zielińskiego 56, 53-534 Wrocław
E-mail: magdalena.szewczyk@ekola.edu.pl*

MECHANIZMY ADHEZJI I PENETRACJI KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH PRZEZ WYBRANE PATOGENY BAKTERYJNE

WSTĘP

Większość zakażeń wywoływanych przez patogeny bakteryjne ma swój początek w zasiedleniu skóry i błon śluzowych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego lub układu moczopłciowego gospodarza. Upośledzenie mechanizmów obronnych gospodarza prowadzi do rozwoju procesu chorobowego. Proces przedostawania się bakterii do komórek ssaków nazywany jest inwazją. Większość patogenów, poprzez silne związanie z odpowiednimi receptorami, może wykorzystywać działające w komórkach eukariotycznych mechanizmy endocytozy. Inwazji towarzyszy zwykle reorganizacja cytoszkieletu komórki gospodarza, poprzedzona pobudzeniem odpowiednich receptorów. Wniknięcie do komórek eukariotycznych pozwala bakteriom uniknąć mechanizmów obronnych gospodarza. Po przeżyciu we wnętrzu fagocyta i uniknięciu procesów fagolizy, bakterie zakażają sąsiednie enterocyty. Mogą one również dotrzeć do błony podstawnej nabłonka i

przedostać się do układu krążenia. Natomiast dzięki makrofagom mają możliwość bezpiecznej migracji do pozostałych tkanek. Bakterie chorobotwórcze wykształciły nie tylko sposoby przetrwania we wnętrzu fagocyta, lecz także namnażania się i dalszej ekspansji w organizmie gospodarza z wykorzystaniem np. krążących makrofagów jako środka transportu. Do mechanizmów zaburzających procesy fagolizy należą (KOŁODYŃSKI 1998):

- blokowanie fuzji fagosomu z lizosomem (np. *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*),
- oporność na działanie litycznych enzymów fagolizosomu (*Mycobacterium leprae*, *Salmonella Typhimurium*),
- szybka „ucieczka” z fagosomu do cytoplazmy (*Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia*),
- blokada funkcji fagocyta przez cyklazę adenylanową bakterii (*Bordetella pertussis*).

ROLA KOMÓREK M W INWAZJI BAKTERII DO KOMÓREK JELITOWYCH

Nabłonek jelita cienkiego na całej długości ma czterowarstwową budowę ściany, która składa się z błony śluzowej, warstwy podśluzówkowej, mięśniówki i błony surowiczej. W błonie śluzowej jelita licznie występują niskie i wąskie kosmki jelitowe. Nabłonek jelita cienkiego jest heterogenną populacją ko-

mórek. Oprócz najliczniej reprezentowanych komórek o funkcji wchłaniającej – enterocytów, są jeszcze w nabłonku komórki: śluzowe, Panetha, enteroendokrynowe, kępkowe, limfoidalne oraz komórki M.

Komórki M w swojej szczytowej części nie mają mikrorzęsek tylko mikrofałdy (ang.

M-microfolds) ze zredukowaną warstwą śluzu i znacznie cieńszą niż u enterocytów warstwą glikokaliksu, mogą też być zupełnie pozbawione glikokaliksu. Występują w nich liczne mitochondria. Komórka M z sąsiednimi komórkami łączy się zespołem połączeń typu zamykającego i typu przylegania, co zapewnia integralność warstwy nabłonkowej

jelita. Komórkom M przypisuje się udział w transporcie antygenów do położonych niżej limfocytów i makrofagów (HATHAWAY i KRAHENBUHL 2000). Komórki te pochłaniają różne bakterie (*Vibrio cholerae*, *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Sh. flexneri*, *E. coli* O:124), wirusy i toksyny (KATO i OWEN 1999).

ADHEZJA ENTEROPATOGENNYCH *E. COLI* (EPEC)

Bakterie z gatunku *E. coli* są czynnikiem etiologicznym dwóch głównych typów zakażeń: układu moczowego i pokarmowego. Niektóre szczepy *E. coli*, wywołujące biegunki u dzieci, są przykładem bakterii posiadających zdolność adhezji do nabłonka jelita *in vivo* oraz *in vitro*. Wywołują one w komórkach nabłonkowych jelita zmiany określone w języku angielskim terminem „attaching and effacing” (AE), tzn. przyleganie i zacieranie. Zmiana ta cechuje się zatarciem struktury mikrokosmków i utworzeniem struktur podobnych do piedestałów. Szczepy EPEC mogą wywoływać u dzieci do lat dwóch biegunkę bez obecności krwi, a także sporadycznie stany biegunkowe u dorosłych. Za patogenność szczepów EPEC odpowiadają kodowane plazmidowo fimbrie BFP (ang. bundle-forming pili), których ekspresja umożliwia łączenie się bakterii w trójwymiarowe mikrokolonie (BIEBER i współaut. 1998, KNUTTON i współaut. 1999). Enteropatogenne szczepy *E. coli* mają w obrębie swojego genomu zespoły genów wirulencji, zwane wyspami patogenności (ang. locus of enterocyte effacement, LEE). Wyspy patogenności mogą być przekazywane między bakteriami różnych gatunków i rodzajów. Enteropatogenne pałeczki *E. coli* posiadają w obrębie wysp patogenności gen *eae* odpowiedzialny za ekspresję intyminy, gen *tir* warunkujący syntezę receptora Tir dla intyminy, geny *sep* i *esc* kodujące aparat sekrecji typu III oraz geny *espABD* dla białek efektorowych. U tych bakterii działa III system sekrecji, w którym uczestniczy ok. 20 białek, a większość z nich związana jest z błoną wewnętrzną. System sekrecji typu III umożliwia bakteriom translokację białek efektorowych wprost do komórki gospodarza. Białka sekrecyjne EspA, EspB, EspD oraz receptor Tir są przenoszone do komórki gospodarza za pomocą wyżej wspomnianego systemu (HUECK 1998). Białko EspA buduje włókienkowate wypustki, które powstają w wyniku adhezji bakterii EPEC do enterocytu

i tworzą pomost łączący komórkę bakteryjną z komórką gospodarza (KNUTTON i współaut. 1998). Kanałem utworzonym przez białko EspA dostarczane są białka EspD i EspB, które przenoszone są do cytozolu wraz z receptorem Tir. Jest on wbudowywany w błonę plazmatyczną komórki eukariotycznej, gdzie zachodzi fosforylacja reszt tyrozynowych (VALLANCE i FINLAY 2000).

W następnym etapie dochodzi do połączenia receptora Tir z intyminą, co prowadzi do aktywacji kinazy tyrozynowej PKC w komórce gospodarza oraz fosforylacji reszt tyrozynowych fosfolipazy C (ROSENSHINE i współaut. 1992). Wykazano ponadto wzrost stężenia wapnia w zainfekowanej komórce. Niekompletny model reakcji zachodzących w komórce eukariotycznej zakłada, że enteropatogeny szczep aktywuje fosfolipazę, która rozszczepia fosfatydyloinozytol w trójfosforan inozytolu i dwuacyloglicerol. Trójfosforan inozytolu powoduje uwolnienie wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów.

W obecności wapnia białko wilina depolimeryzuje aktyne stanowiącą szkielet mikrokosmków. Dwuacyloglicerol aktywuje kinazę C. Pod komórką bakteryjną dochodzi do polimeryzacji aktyny i innych białek cytoszkieletu: wiliny, ezryny, taliny, aktyniny. Spolimeryzowane włókna cytoszkieletu tworzą formy piedestałowe (GOOSNEY i współaut. 1999).

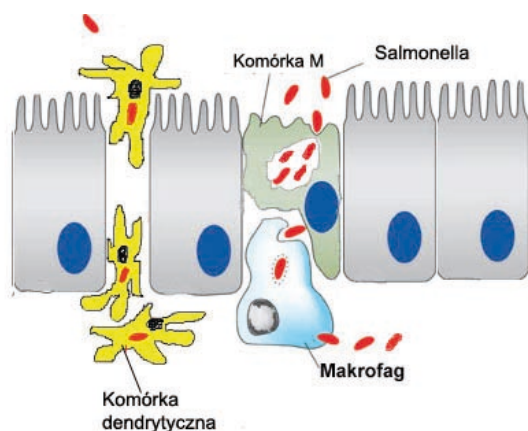
Zmiany w reorganizacji cytoszkieletu komórki gospodarza prowadzą do rozwoju biegunki, jednak bezpośrednia jej przyczyna nie jest znana. Podstawą biegunkotwórczego działania szczepów EPEC może być zniszczenie struktury mikrokosmków oraz zaburzenie transportu elektrolitów. Komórki EPEC prowadząc do depolimeryzacji błony cytoplazmatycznej komórek nabłonkowych jelita, ułatwiają ucieczkę jonów chlorkowych z równoczesnym napływem jonów sodowych i potasowych. Poza tym szczepy EPEC mogą wywoływać efekt obniżenia nabłonkowej

oporności elektrycznej w spolaryzowanych komórkach nabłonka. Zakażeniu enteropatogennymi szczepami *E. coli* towarzyszy też migracja leukocytów wielojądrzastych przez nabłonek, co może prowadzić do zniszczenia bariery ochronnej jaką stanowi nabłonek (NATARO i KAPER 1998).

Stwierdzono, że szczepy EPEC mają też zdolność inwazji (MILIOTIS i współaut. 1989, FRANCIS i współaut. 1991). Wykazano także obecność tych bakterii wewnątrz komórek jelitowych (MOON i współaut. 1983). Jednak nie mogły się one namnażać ani uwolnić się z fagosomu.

WNIKANIE SZCZEPÓW SALMONELLA DO KOMÓREK JELITOWYCH

Szczepy *Salmonella* mają zdolność przenikania do komórek nabłonkowych jelita (Ryc. 1) i komórek M. Ważną rolę w transporcie bakterii tego rodzaju odgrywają komórki dendrytyczne, które nie naruszając bariery nabłonkowej, mogą transportować bakterie przez obwódkę zamykającą. Jednak nie wiadomo, czy pochłaniają one bakterie wprost z nabłonka jelitowego, czy po ich wnikięciu do komórek M. Komórki dendrytyczne wytwarzają białko okludynę, które destabilizuje obwódkę zamykającą. Komórki dendrytyczne mogą też przenosić patogeny do węzłów chłonnych i śledziony (RESCIGNO i współaut. 2001), a także pochłaniać komórki nabłonkowe, które uległy apoptozie (HUANG i współaut. 2000). Bakterie *Salmonella* z krwi mogą przenikać do układu siateczko-wo-śródbłonkowego (RES), gdzie głównie są związane z makrofagami, wielojądrzastymi leukocytami (ang. polymorphonuclear leucocytes-PMNs) i komórkami dendrytycznymi (RICHTER-DAHLFORS i współaut. 1997, NIEDERGANG i współaut. 2000). Bakterie te znajdują się w śledzionie w makrofagach miazgi czerwonej, a w wątrobie w komórkach Kupfera (RICHTER-DAHLFORS i współaut. 1997, YRLID i współaut. 2001).



Ryc. 1. Mechanizmy inwazji szczepów *Salmonella* do komórek jelitowych (Magdalena Szewczyk).

Wnikanie pałeczek *Salmonella* do komórek w warunkach *in vitro* zależy w dużym stopniu od warunków hodowli drobnoustrojów. Silną zdolnością do wnikania charakteryzują się bakterie hodowane przy niskiej zawartości tlenu (LEE i FALKOW 1990). W przypadku bakterii *S. Typhimurium* początkowy etap adhezji do powierzchni komórki nabłonka jest stanem przejściowym, po którym następuje albo oddzielenie bakterii, albo natychmiastowa inwazja. Pałeczki *Salmonella* wykorzystują w różnych stadiach zakażenia dwa systemy sekrecji III typu, kodowane przez geny znajdujące się w obrębie wysp patogenności. Pierwszy system kodowany przez SPI-1 (ang. *Salmonella* Pathogenicity Island) jest odpowiedzialny za początkową penetrację komórek jelitowych, a drugi zwany SPI-2, konieczny jest do kolejnych etapów infekcji. Typ SPI-1 koduje białka, które można podzielić na cztery kategorie: białka budujące aparat sekrecyjny (Inv/Spa), białka związane z regulacją procesu sekrecji np. Siad, białka umożliwiające proces przemieszczenia efektorów do komórki gospodarza (SipB, SipC, SipD) oraz białka efektorowe (SipA, SopB, SptP, SopE,) (DARWIN i MILLER 1999). Białka SopB i SopE biorą udział we wnikaniu pałeczek *Salmonella* do spolaryzowanych i niespolaryzowanych komórek gospodarza. Natomiast białka SopA i SopD przyczyniają się do penetracji rąbka szczoteczkowego (RAFFA-TELLU i współaut. 2005).

Białka efektorowe: SopE, SopB, SipA i SptP, za pomocą systemu sekrecji typu III, są transportowane z komórki bakterii do komórki gospodarza. Następnie białko SipA wiąże się z F-aktyną i wpływa na tworzenie się kompleksu aktyny i T-plastyny, co prowadzi do rearanżacji cytoszkieletu komórki gospodarza. Białko SopE i fosfataza fosfatydylinozytolu SopB aktywują cząsteczki należące do grupy białek G: Cdc42 i Rac1 poprzez zamianę GDP w GTP. Stymulacja GTP prowadzi do rearanżacji cytoszkieletu i aktywacji kinazy p21, fosfolipazy A₂. Białko SptP bierze udział

w inaktywacji białek G (GALAN i ZHOU 2000), natomiast białko SopB jest odpowiedzialne za migrację leukocytów wielojądrzastych do miejsca zakażenia. Pałeczki *Salmonella* mają zdolność wywoływania apoptozy makrofagów, jednak nie poznano białka, które jest wymagane w tym procesie (MONACK i współaut. 1996). Uważa się, że za indukcję apoptozy może być odpowiedzialne białko SipB, które wraz z białkami SipC i SipD konieczne jest do przemieszczenia się innych białek do komórki eukariotycznej. Homologiem białka SipB jest białko IpaB *Shigella*, które powoduje apoptozę makrofagów (DARWIN i MILLER 1999). Agregaty białek znajdują się przejściowo pod przyczepionymi do komórki bakteriami. Po wnikięciu bakterii, białka te otaczają mikroorganizmy, a później ulegają degradacji i powracają do pierwotnego miejsca lokalizacji. Fagosom zawierający bakterie może złączyć się z błoną komórki nabłonkowej w jej części przypodstawnej lub połączyć się z innymi fagosomami. W utworzonych w ten sposób dużych wakuolach, po kilku godzinach od momentu zakażenia, obserwuje się replikację bakterii. Pałeczki *Salmonella* wykształciły mechanizm hamowania fuzji fagosomu z lizosomem. Bakterie te mogą uwalniać się z zakażonych przez siebie makrofagów, dzięki białku SipB, które indukuje apoptozę makrofagów. Bakterie z rodzaju *Salmonella* mogą również zasiedlić potem wielojądrzaste leukocyty (MASTROENI i SHEPPARD 2004).

Szczepy *S. Typhimurium* niszcząc strukturę kosmków jelitowych zaburzają integralność komórkową nabłonka jelita, a także indukują nekrozę komórek eukariotycznych. Budulec rzęsek tych bakterii jakim jest flagellina, może także ulec translokacji do komórki nabłonkowej za pomocą III systemu sekrecji. Receptorem dla flagelliny jest TLR5 (ang. Toll-like receptor 5) umiejscowiony w części

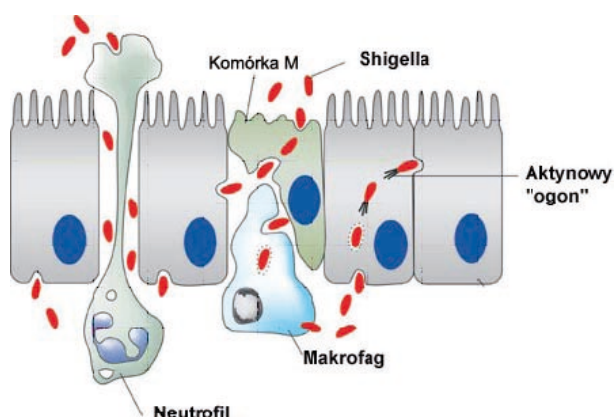
bazalnej błony komórkowej enterocyta (GEWIRTZ i współaut. 2001). Komórki pochodzące ze śródbłónki naczyń jelitowych (HIMEC) także wykazują ekspresję receptora TLR5 (MAASER i współaut. 2004). Flagellina indukuje uwalnianie jonów wapnia w komórkach nabłonkowych jelita, co prowadzi do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Ekspresja NF- κ B wpływa na uwalnianie interleukiny 8 (IL-8) przez komórki nabłonkowe po ich stronie bazalnej. Interleukina 8 uczestniczy w przyciąganiu wielojądrzastych leukocytów (PMNs) (GEWIRTZ i współaut. 2001), które wzmagają proces zapalny.

Szczepy *Salmonella* wydzielają białko SipA, które wiążąc się do powierzchni komórki jelitowej aktywuje kinazę C (PKC) (LEE i współaut. 2000). Komórki nabłonkowe jelita pod wpływem PKC wydzielają po stronie apikalnej chemoatraktant PEEC (ang. pathogen elicited epithelial chemoattractant), który kieruje migracją komórek PMNs przez szczeliny międzykomórkowe do części apikalnej komórki jelitowej (MCCRMICK i współaut. 1998). Wielojądrzaste leukocyty wydzielają też prostaglandyny odpowiedzialne za zwiększenie aktywności cykazy adenylowej w komórkach jelitowych. Enzym ten hamuje absorpcję jonów sodu, a zwiększa wydzielanie jonów chloru, co wywołuje biegunki (DARWIN i MILLER 1999). Komórki nabłonka jelitowego, po wnikięciu do nich bakterii *Salmonella*, *E. coli*, uruchamiają program apoptozy (KIM i współaut. 1998). Wykazano, że pałeczki *S. Typhimurium* wykształciły skuteczniejsze mechanizmy wnikania do komórek M i ich niszczenia, niż *Sh. flexneri* czy *Listeria monocytogenes*. Mniejsza liczba bakterii *Salmonella* była konieczna do zniszczenia nabłonka towarzyszącego grudkom związanym z jelitem (ang. follicle associated epithelium, FAE) (JANSEN i współaut. 1998).

WNIKANIE SZCZEPÓW SHIGELLA DO KOMÓREK JELITOWYCH

Patogeny z rodzaju *Shigella* podobnie jak szczepy *Salmonella*, po transcytozie przez komórki M, napotykają makrofagi tkanki limfoidalnej, a także mogą przedostać się poprzez szczeliny między komórkami (Ryc. 2) (SAKAGUCHI i współaut. 2002). Charakterystyczne dla szczepów *Shigella* jest to, że nie wykazują zdolności wnikania do komórek przez stronę apikalną, ale bazalną (MOUNIER i współaut. 1992). Inwazja szczepów *Shigella* do komórek nabłonkowych jest zależna od

białek efektorowych: IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpgD, wydzielanych za pomocą III systemu sekrecji. Pierwszym krokiem w penetracji komórek jest połączenie białka IpaB i IpaC z integrynami $\alpha_5\beta_1$ na powierzchni komórek gospodarza (WATARAI i współaut. 1996). Badania SKOUDY i współaut. (2000) wykazały, że receptor CD44, poprzez wiązanie z białkiem IpaB, może mieć istotne znaczenie w procesie inwazji. Połączenie białek Ipa z integrynami może pobudzać szlak sygnałowy



Ryc. 2. Mechanizmy inwazji szczepów *Shigella* do komórek jelitowych (Magdalena Szewczyk).

prowadzący do wniknięcia bakterii do komórki gospodarza.

Również lipopolisacharyd (LPS) może być odpowiedzialny za związanie się bakterii z bazalną powierzchnią nabłonkowej komórki jelitowej. Interakcja LPS z komórką jelitową może spowodować migrację leukocytów wielojądrzastych, z wykorzystaniem szlaku aktywacji kinazy ERK (ang. extracellular regulated kinase) (KÖLER i współaut. 2002). Kompleks IpaB-IpaC jest odpowiedzialny za tworzenie porów w błonie komórkowej gospodarza, przez które dostają się białka efektorowe. Białko Pac, wskutek aktywacji białek Cd42 i Rac, indukuje polimeryzację aktyny. Aktywacja białek Rho jest również niezbędna do efektywnej inwazji, jednak mechanizm jego aktywacji nie jest znany. Białko Rho pobudza kinazę tyrozynową Src, która fosforyluje białko kortaktynę, związaną z polimeryzacją aktyny (DEHIO i współaut. 1995). Mimo że po wniknięciu bakterii *Shigella* do komórek eukariotycznych białka IpaB i IpaC są

pierwszymi efektorami, to także białko Apia, poprzez związanie aktyny z winkuliną, bierze udział w tym procesie. Białko IpaB pełni rolę inwazyjny umożliwiającą ucieczkę bakterii z fagosomu komórki gospodarza, a także indukuje apoptozę makrofagów, poprzez pobudzenie kaspazy 1 (HILBI i współaut. 1998). We wnętrzu komórki gospodarza bakterie zostają otoczone włóknami F-aktyny powiązanej z winkuliną. W tym momencie następuje polaryzacja aktyny, polimeryzacja i jej reorganizacja w tzw. „ogon komety”, pozwalający na aktywny ruch bakterii. Do rozpoczęcia polaryzacji i kondensacji aktyny konieczna jest fosforylacja białek cytoszkieletu z udziałem ATP-azy błonowej, którą jest białko błony zewnętrznej IcsA (VirG), o masie 120–130 kDa. Podczas przegrupowania cytoszkieletu białko to jest włączone w „ogon” aktyny. Ma ono zdolność wiązania się z winkuliną i białkiem N-WASP (ang. neutral-Wiskott-Aldrich Syndrome protein), do którego przyłącza się kompleks białek Arp2/3. Kompleks ten jest odpowiedzialny za polimeryzację aktyny (EGILE i współaut. 1999). Niektóre z komórek bakteryjnych, „popychane” przez włókna aktyny, przemieszczają się horyzontalnie do sąsiadującej komórki, przy której powierzchni tworzą uwypuklenia błony cytoplazmatycznej. W następnej komórce bakterie są otoczone podwójną błoną. Po jej lizie, z udziałem białek IpaB i IpaC, bakterie dostają się do cytoplazmy (PAGE i współaut. 1999). Bakterie *Shigella* pobudzają komórki jelitowe do produkcji interleukiny 8, która przyciąga wielojądrzaste leukocyty do miejsca inwazji bakteryjnej. Leukocyty te przyczyniają się do zaburzenia integralności komórek nabłonkowych jelita, stwarzając możliwości wniknięcia kolejnym bakteriom *Shigella* (SANSONETTI i współaut. 1999).

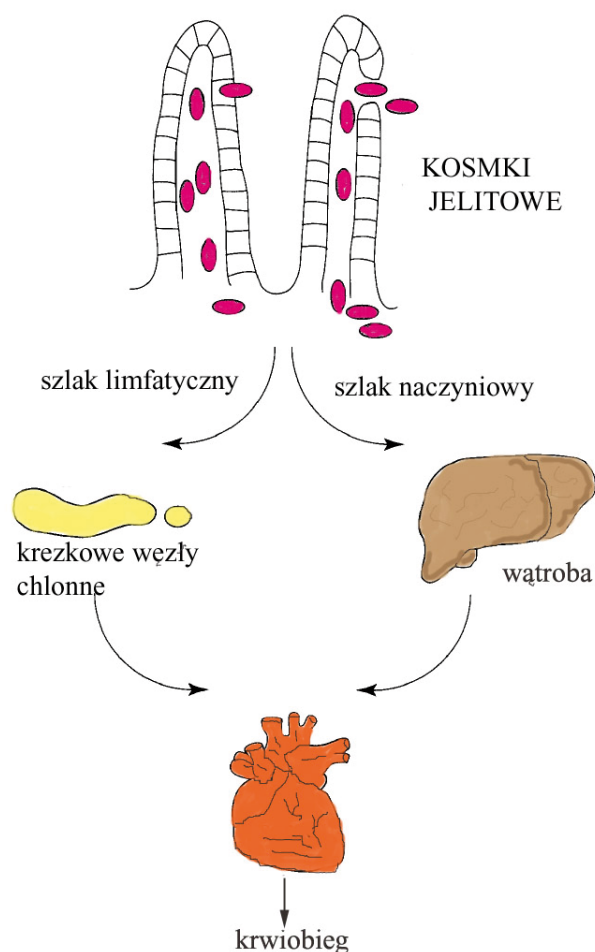
TRANSLOKACJA BAKTERII PRZEZ KOMÓRKI JELITOWE

Termin translokacja została wprowadzony przez BERGA i DARLINGTONA (1979) i oznacza przedostanie się mikroorganizmów, a także ich endotoksyn przez barierę jelitową do krezkowych węzłów chłonnych i następnie do innych organów (Ryc. 3). Poznanie mechanizmów przemieszczania się bakterii w organizmie gospodarza jest kluczem do zrozumienia etiologii niektórych schorzeń. Do głównych czynników wspomagających translokację należą: nadmierne namnożenie się bakterii, fizyczne uszkodzenie barier jeli-

towych i upośledzenie odporności immunologicznej. Procesy te występując pojedynczo czy też w kombinacjach mogą prowadzić do translokacji bakterii.

Mikroorganizmy wnikając do komórek jelitowych mogą przedostać się do narządów układu limfatycznego, a następnie do krwiobiegu, lub też pozakomórkowo dostać się do krwi, a wraz z nią do wątroby i pozostałych tkanek.

Badania prowadzone na zwierzętach wykazały, że szczep *S. Enteritidis* pojawił się



Ryc. 3. Sposoby przenikania bakterii z układu pokarmowego do krwioobiegu. (Magdalena Szewczyk).

w krezkowych węzłach chłonnych drugiego dnia po zakażeniu, a w kolejnych dniach bakterie znaleziono w śledzionie i wątrobie (ISLAM i współaut. 2000).

Do bakterii, które mają dużą zdolność przenikania z jelita do krezkowych węzłów chłonnych należą: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* i *Proteus mirabilis*. Zdolność taką ma również *Candida albicans*, bezotoczkowy grzyb zaliczany do drożdżaków (BERG 1995). Bakterie tlenowe przenikają przez drogi jelitowe łatwiej niż obligatoryjne beztlenowce, które ulegają translokacji w przypadkach naruszenia struktury nabłonka jelitowego. Eliminacja tych bakterii może przyczynić się do nadmiernego namnożenia się fakultatywnych beztlenowców. Fizjologiczna mikroflora, poprzez współzawodnictwo o receptory obecne na komórkach nabłonka, stymulację produkcji naturalnych przeciwciał reagujących krzyżowo z antyge-

nami mikroorganizmów chorobotwórczych, a także poprzez wytwarzanie bakteriocyn zapobiega rozwojowi bakterii potencjalnie chorobotwórczych.

Nadmierne namnożenie się bakterii jest jedną z przyczyn translokacji. Zachwianie homeostazy prawidłowej mikroflory wskutek stosowania antybiotyków, osłabia odporność na zakażenia w obrębie błon śluzowych. Może wtedy dojść do nadmiernego namnożenia mikroorganizmów komensalnych, np. drożdżaków i bakterii patogennych, opornych na dany antybiotyk. Do innych czynników wspomagających nadmierne namnożenie bakterii należą: obstrukcje jelitowe, podwiązanie dróg żółciowych. Obstrukcje jelitowe jako przyczyna przenikania bakterii przez drogi jelitowe pojawiła się u 41% pacjentów po laparotomii (O'BOYLE i współaut. 1998). Drugim czynnikiem, który może być współodpowiedzialny za bakteryjną translokację, jest zniszczenie struktury jelit poprzez naruszenie integralności połączeń międzykomórkowych. Bariera jelitowa może zostać zaburzona poprzez oparzenia, szok krwotoczny, endotoksemię (BERG 1995) będącą skutkiem niewydolności wątroby. Zaobserwowano także, u szczurów z uszkodzoną wątrobą, migracje bakterii z jelita grubego do żołądka i jelita cienkiego, gdzie bakterie namnażały się niszcząc ochronny śluz pokrywający te narządy (YI i współaut. 1999). Komórki wątroby są odpowiedzialne za detoksykację organizmu z bakterii i toksyn pochodzących z jelit i układu krwionośnego.

Bakterie, poprzez wytwarzane toksyny, mogą również niszczyć błonę śluzową jelit. Zniszczenie struktury mikrokosmków prowadzi do zaburzenia transportu elektrolitów i biegunek. Osłabienie mechanizmów obrony immunologicznej jest kolejnym ważnym czynnikiem wspomagającym translokację bakterii jelitowych. Z jelitami jest związana tkanka limfatyczna GALT (ang. gut-associated lymphoid tissue). W błaszcze właściwej błony śluzowej jelit i śródnabłonkowo występują limfocyty i grudki limfatyczne. Limfocyty układu pokarmowego produkują przeciwciała IgA oraz regulują odpowiedź immunologiczną na antygeny dostające się do przewodu pokarmowego tak, aby nie dochodziło do nadmiernej indukcji odpowiedzi immunologicznej. Drobnoustroje, którym uda się przełamać tę pierwszą barierę ochronną, napotykać w błaszcze właściwej błony śluzowej dalsze przeszkody. Występują komórki żerne (makrofagi, granulocyty

obojętnochłonne), a także przeciwciała klasy IgG i IgM, zdolne do aktywacji dopełniacza (JAKÓBISIAK 1996). Makrofagi i wielojądrzaste leukocyty mogą pochłaniać bakterie i transportować je do węzłów chłonnych, gdzie dochodzi do odpowiedzi immunologicznej na dany antygen. Wykazano, że różne regiony kompleksu krezkowych węzłów chłonnych odsączają limfę z różnych regionów jelit. Wskutek tego liczba bakterii, które uległy translokacji z jelita czczego, krętego czy ślepego była proporcjonalna do liczby bakterii, które pojawiły się w regionach krezkowych węzłów chłonnych odpowiadających tym częściom jelita. Najwięcej bakterii przedostawało się do węzłów chłonnych z jelita ślepego, a najmniej z czczego (GAUTREAUX i współaut. 1994). U myszy pozbawionych grasicy zauważono spontaniczną translokację rodzimych bakterii, takich jak: *E. coli*, do krezkowych węzłów chłonnych, śledziony, wątroby i nerek, natomiast nie zauważono translokacji bakterii u myszy z grasicą (OWENS i BERG 1980). Przyczyną obniżenia odporności w organizmie zwierzęcym mogą być: chłoniak, białaczka, endotoksemia, opa-

żenia, szok krwotoczny, tymektomia (BERG 1995).

Translokacja bakterii jest procesem, który zachodzi także u zdrowych organizmów. Jednak w takim wypadku bakterie są zabijane przez mechanizmy obronne gospodarza.

Translokacja pojawiała się z większą częstością u pacjentów po 70 roku życia. Stwierdzono, że u 45% pacjentów bakteryjna translokacja rozwinęła się w sepsę (O'BOYLE i współaut. 1998). Bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* były odpowiedzialne w 67% za pooperacyjne powikłania w postaci posocznicy (O'BOYLE i współaut. 1998). Sepsa, inaczej posocznica, jest ogólnoustrojową reakcją zapalną organizmu wywołaną zakażeniem bakteryjnym, grzybiczym lub wirusowym. Czynnikiem ryzyka są wcześniejsze zabiegi operacyjne, wiek, wstrząs, oparzenie, uraz, wcześniejsze leczenie sterydami, lekami immunosupresyjnymi, współistniejące choroby przewlekłe. Wiele osób, których śmierć przypisuje się komplikacjom związanym z zabiegiem operacyjnym, urazem, chorobami nowotworowymi bądź innymi chorobami przewlekłymi faktycznie umiera wskutek sepsy.

PODSUMOWANIE

Wiele chorób bakteryjnych rozpoczyna się od bezpośredniego kontaktu między patogenem a nabłonkiem wyściełającym drogi oddechowe, przewód pokarmowy czy układ moczowy gospodarza. Mimo obmywania powierzchni błon śluzowych gospodarza przez wydzieliny, bakterie poprzez przyleganie do powierzchni komórek nabłonka i śródbłonka, unikają eliminacji z organizmu gospodarza. Dzięki różnym strukturom powierzchniowym bakterie mogą przywierać do komórek eukariotycznych. Patogeny bakteryjne wykształciły złożone mechanizmy, które pozwalają im uniknąć reakcji obronnych gospodarza poprzez silne związanie z jego komórkami, проникnięcie do tkanek oraz namnożenie się i zasiedlenie innych organów. Adherencja bakterii do komórek eukariotycznych może

indukować kaskadę reakcji prowadzących do inwazji do komórek nefagocytujących. Kluczową rolę pełnią kinazy fosforylujące, które zmieniają cytoszkielet aktynowy, co prowadzi do pochłaniania bakterii przez komórki gospodarza. W procesie penetracji komórek gospodarza mogą również brać udział struktury powierzchniowe takie jak: fimbrie, białka błony zewnętrznej i lipopolisacharyd. Kolejnym etapem może być translokacja bakterii do krwi, co pociąga za sobą patologiczne konsekwencje: posocznice, zespół dysfunkcji wielonarządowej, czy wstrząs septyczny. Poznanie procesów interakcji bakterii z komórkami gospodarza, może przyczynić się w przyszłości do opracowania nowych biopreparatów i szczepionek chroniących przed adhezją i inwazją bakterii.

THE MECHANISMS OF ADHERENCE AND PENETRATION OF EUKARYOTIC CELLS BY BACTERIAL PATHOGENS

Summary

Pathogenic bacteria have developed different mechanisms to cause disease in human hosts. Bacterial pathogens express a wide range of molecules

that bind host cell targets to facilitate a variety of different host responses. Many bacterial pathogens are able to invade and survive within cells at mucos-

al membranes. Remarkably, the bacteria themselves orchestrate this process through the exploitation of host cellular signal transduction pathways. Many pathogenic bacteria have evolved strategies to evade the host immune response by subverting the cytoskeleton through various toxins to persuade host cells to take the bacteria into the cell, or in the case mainly of "professional phagocytes" to prevent their uptake into the phagolysosome. They use receptor-mediated endocytosis in invasion. Like other bacteria, *Salmonella* has evolved the habit of invading host cells in order to hide from the immune system and to gain nutrients. However, *Salmonella* also invades the epithelial cells in order to escape the gut into the surrounding tissues. Whereas *E. coli* binds

to the gut epithelial cells, *Salmonella* binds to M cells, present in the Peyer's patches (Lymph nodes) in the gut wall. Interaction of *Sh. flexneri* with individual epithelial cells shows a series of events in which the bacterium, upon contact with the cell surface, releases a set of Ipa proteins through a specialized activable, type-III secretory apparatus. Intracellular invasion can lead to disruption of host tissue integrity and perturbation of the immune system. An understanding of the molecular basis of bacterial invasion and of host cell adaptation to intracellular bacteria will provide fundamental insights into the pathophysiology of bacteria and the cell biology of the host.

LITERATURA

- BERG R. D., 1995. *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract*. Trends Microbiol. 3, 149-154.
- BERG R. D., GARLINGTON A. W., 1979. *Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model*. Infect. Immun. 23, 403-411.
- BIEBER D., RAMER S. W., WU C. Y., MURRAY W. J., TOBE T., FERNANDEZ R., SCHOOLNIK G. K., 1998. *Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli*. Science 280, 2114-2118.
- DARWIN K. H., MILLER V. L., 1999. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev. 12, 405-428.
- DEHIO C., PREVOST M. C., SANSONETTI P. J., 1995. *Invasion of epithelial cells by Shigella flexneri induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway*. EMBO J. 14, 2471-2482.
- EGILE C., LOISEL T. P., LAURENT V., LI R., PANTALONI D., SANSONETTI P. J., CARLIER M. F., 1999. *Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility*. J. Cell Biol. 146, 1319-1332.
- FRANCIS C. L., JERSE A. E., KAPER J. B., FALKOW S., 1991. *Characterization of interactions of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 with mammalian cells in vitro*. J. Infect. Dis. 164, 693-703.
- GALAN J. E., ZHOU D., 2000. *Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8754-8761.
- GAUTREAUX M. D., DEITCH E. A., BERG R. D., 1994. *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex*. Infect. Immun. 62, 2132-2134.
- GEWIRTZ A. T., NAVAS T. A., LYONS S., GODOWSKI P. J., MADARA J. L., 2001. *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression*. J. Immunol. 167, 1882-1885.
- GEWIRTZ A. T., SIMON P. O. JR., SCHMITT C. K., TAYLOR L. J., HAGEDORN C. H., O'BRIEN A. D., NEISH A. S., MADARA J. L., 2001. *Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response*. J. Clin. Invest. 107, 99-109.
- GOOSNEY D. L., KNOECHEL D. G., FINLAY B. B., 1999. *Enteropathogenic E. coli, Salmonella, and Shigella: masters of host cell cytoskeletal exploitation*. Emerg. Infect. Dis. 5, 216-223.
- HATHAWAY L. J., KRAEHNBUHL J. P., 2000. *The role of M cells in mucosal immunity*. Cell. Mol. Life Sci. 57, 323-332.
- HILBI H., MOSS J. E., HERSH D., CHEN Y., ARONDEL J., BANERJEE S., FLAVELL R. A., YUAN J., SANSONETTI P. J., ZYCHLINSKY A., 1998. *Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB*. J. Biol. Chem. 273, 32895-32900.
- HUANG F. P., PLATT N., WYKES M., MAJOR J. R., POWELL T. J., JENKINS C. D., MACPHERSON G. G., 2000. *A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes*. J. Exp. Med. 191, 435-444.
- HUECK C. J., 1998. *Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 379-433.
- ISLAM A. F., MOSS N. D., DAI Y., SMITH M. S., COLLINS A. M., JACKSON G. D., 2000. *Lipopolysaccharide-induced biliary factors enhance invasion of Salmonella enteritidis in a rat model*. Infect. Immun. 68, 1-5.
- JAKÓBISIAK M., 1996. *Immunologia*. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- JENSEN V. B., HARTY J. T., JONES B. D., 1998. *Interactions of the invasive pathogens Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes, and Shigella flexneri with M cells and murine Peyer's patches*. Infect. Immun. 66, 3758-3766.
- KATO T., OWEN R. L., 1999. *Structure and function of intestinal mucosal epithelium*. Mucosal Immunology. Academic Press, 115-128.
- KIM J. M., ECKMANN L., SAVIDGE T. C., LOWE D. C., WITTHOFT T., KAGNOFF M. F., 1998. *Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion*. J. Clin. Invest. 102, 1815-1823.
- KNUSTON S., SHAW R. K., ANANTHA R. P., DONNENBERG M. S., ZORGANI A. A., 1999. *The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal*. Mol. Microbiol. 33, 499-509.
- KOŁODYŃSKI J., 1998. *Podstawy bakteriologii*. Wrocław. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego.
- KÖHLER H., RODRIGUES S. P., MCCRMICK B. A., 2002. *Shigella flexneri Interactions with the basolateral membrane domain of polarized model intestinal epithelium: role of lipopolysaccharide in cell invasion and in activation of the mitogen-activated protein kinase ERK*. Infect. Immun. 70, 1150-1158.

- LEE C. A., FALKOW S., 1990. *The ability of Salmonella to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4304–4308.
- LEE C. A., SILVA M., SIBER A. M., KELLY A. J., GALYOV E., MCCRMICK B. A., 2000. *A secreted Salmonella protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12283–12288.
- MAASER C., HEIDEMANN J., VON EIFF C., LUGERING A., SPAHN T. W., BINION D. G., DOMSCHKE W., LUGERING N., KUCHARZIK T., 2004. *Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin*. J. Immunol. 172, 5056–5062.
- MASTROENI P., SHEPPARD M., 2004. *Salmonella infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues*. Microbes Infect. 6, 398–405.
- MCCRMICK B. A., PARKOS C. A., COLGAN S. P., CARNES D. K., MADARA J. L., 1998. *Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by Salmonella typhimurium*. J. Immunol. 160, 455–466.
- MILIOTIS M. D., KOORNHOF H. J., PHILLIPS J. I., 1989. *Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic Escherichia coli in an in vitro Henle 407 cell model*. Infect. Immun. 57, 1928–1935.
- MONACK D. M., RAUPACH B., HROMOCKYJ A. E., FALKOW S., 1996. *Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93, 9833–9838.
- MOON H. W., WHIPP S. C., ARGENZIO R. A., LEVINE M. M., GIANNELLA R. A., 1983. *Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines*. Infect. Immun. 41, 1340–1351.
- MOUNIER J., VASSELON T., HELLIO R., LESOURD M., SANSONETTI P. J., 1992. *Shigella flexneri enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole*. Infect. Immun. 60, 237–248.
- NATARO J. P., KAPER J. B., 1998. *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142–201.
- NIEDERGANG F., SIRARD J. C., BLANC C. T., KRAEHNBUHL J. P., 2000. *Entry and survival of Salmonella typhimurium in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14650–14655.
- O'BOYLE C. J., MACFIE J., MITCHELL C. J., JOHNSTONE D., SAGAR P. M., SEDMAN P. C., 1998. *Microbiology of bacterial translocation in humans*. Gut 42, 29–35.
- OWENS W. E., BERG R. D., 1980. *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice*. Infect. Immun. 27, 461–467.
- PAGE A. L., OHAYON H., SANSONETTI P. J., PARSOT C., 1999. *The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of Shigella flexneri*. Cell. Microbiol. 1, 183–193.
- RAFFATELLU M., WILSON, R. P., CHESSE, D., ANDREWS-POLYMERIS, H., TRAN, Q. T., LAWSON, S., KHARE, S., ADAMS, L. G., BAÜMLER, A. J., 2005. *SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype typhimurium invasion of epithelial cells*. Infect. Immun. 73, 146–154.
- RESCIGNO M., URBANO M., VALZASINA B., FRANCOLINI M., ROTTA G., BONASIO R., GRANUCCI F., KRAEHNBUHL J. P., RICCIARDI-CASTAGNOLI P., 2001. *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat. Immunol. 2, 361–367.
- RICHTER-DAHLFORS A., BUCHAN A. M., FINLAY B. B., 1997. *Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo*. J. Exp. Med. 186, 569–580.
- ROSENSHINE I., DONNENBERG M. S., KAPER J. B., FINLAY B. B., 1992. *Signal transduction between enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake*. EMBO J. 11, 3551–3560.
- SAKAGUCHI T., KOHLER H., GU X., MCCRMICK B. A., REINECKER H. C., 2002. *Shigella flexneri regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells*. Cell. Microbiol. 4, 367–381.
- SANSONETTI P. J., ARONDEL J., HUERRE M., HARADA A., MATSUSHIMA K., 1999. *Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis*. Infect. Immun. 67, 1471–1480.
- SKOUDY A., MOUNIER J., ARUFFO A., OHAYON H., GOUNON P., SANSONETTI P., TRAN VAN NHIEU G., 2000. *CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells*. Cell. Microbiol. 2, 19–33.
- VALLANCE B. A., FINLAY B. B., 2000. *Exploitation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 8799–8806.
- WATARAI M., FUNATO S., SASAKAWA C., 1996. *Interaction of Ipa proteins of Shigella flexneri with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells*. J. Exp. Med. 183, 991–999.
- YI J. H., NI R. Y., LUO D. D., LI S. L., 1999. *Intestinal flora translocation and overgrowth in upper gastrointestinal tract induced by hepatic failure*. World J. Gastroenterol. 5, 327–329.
- YRLID U., SVENSSON M., HAKANSSON A., CHAMBERS B. J., LJUNGGREN H. G., WICK M. J., 2001. *In vivo activation of dendritic cells and T cells during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection*. Infect. Immun. 69, 5726–5735.