

## ROLA I ZNACZENIE WYBRANYCH CZYNNIKÓW WIRULENCJI DETERMINUJĄCYCH CHOROBTWÓRCZOŚĆ UROPATHOGENNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI*

Sylwia Joanna Chmielewska\*, Katarzyna Leszczyńska

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w lipcu 2019 r.

**Streszczenie:** Najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego (ZUM) są szczepy UPEC (Uropathogenic *Escherichia coli*), będące przyczyną 75–95% przypadków ZUM. W patomechanizmie ZUM ogromną rolę odgrywają czynniki wirulencji bakterii UPEC, jak również zdolność do tworzenia biofilmu. Główną przeszkodą do wzrostu mikroorganizmów jest niedobór żelaza, dlatego też szczepy UPEC wytwarzają siderofory jak również receptory sideroforów, które umożliwiają skuteczny wychwyt i transport żelaza do komórki bakteryjnej. Ponadto, w celu modulacji odpowiedzi immunologicznej i szlaków metabolicznych gospodarza szczepy UPEC produkują następujące toksyny, tj.  $\alpha$ -hemolizynę (HlyA), cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący (CNF-1) i toksynę autotransportującą (VAT, Vat-like/Vat-ExEc). Kolejnym nowo poznany czynnikiem wirulencji jest genotoksyna, tj. białko Usp wywołujące fragmentację DNA i apoptozę komórek. Z kolei, białko Ag43 umożliwia bakteriom UPEC adhezję do komórek układu moczowego czy agregację i formowanie biofilmu. Należy podkreślić, że wszystkie wymienione wyżej czynniki wirulencji jak również zdolność do tworzenia biofilmu, ułatwiają szczepom UPEC kolonizację i rozprzestrzenianie w układzie moczowym. Podsumowując, bakterie UPEC posiadają cały arsenał czynników wirulencji, które umożliwiają przetrwanie nawet w tak niesprzyjającym środowisku, jakim jest układ moczowy, co ostatecznie prowadzi do rozwoju ZUM.

1. Wstęp. 2. System wychwytu żelaza – siderofory, receptory sideroforów. 3. Toksyny. 3.1.  $\alpha$ -hemolizyna HlyA. 3.2. Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1. 3.3. Toksyna VAT. 4. Białko Usp. 5. Białko Ag43. 6. Biofilm bakteryjny. 7. Podsumowanie

### THE ROLE AND IMPORTANCE OF SELECTED VIRULENCE FACTORS DETERMINING THE PATHOGENICITY OF UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

**Abstract:** The most frequent etiologic agents of the urinary tract infections (UTIs) are UPEC strains (Uropathogenic *Escherichia coli*), which are responsible for 75–95% of UTIs. The virulence factors of UPEC bacteria, as well as their ability to form biofilm, play a significant role in the pathogenicity of UTIs. Limiting iron availability is a major host defense against the growth of microorganisms within hosts. That is why UPEC strains produce various types of siderophores as well as siderophore receptors, which facilitate the uptake and transport of iron to the bacterial cell. Moreover, in order to modulate an inflammatory response and host signaling pathways, UPEC strains produce the following toxins:  $\alpha$ -hemolysin (HlyA), cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF-1) and vacuolating autotransporter toxin (VAT, Vat-like/Vat-ExEc). Moreover, Usp is a novel genotoxin of UPEC strains which provokes DNA fragmentation and cell apoptosis. Furthermore, the presence of protein Ag43 enhances adhesion of UPEC within the urinary tract, aggregation and biofilm formation. It is important to underline that all of the virulence factors mentioned above and the ability to form biofilm facilitate and enable UPEC colonization and dissemination in the urinary tract. In conclusion, UPEC harbors an arsenal of virulence factors which promote persistence within the adverse settings of the host urinary tract and finally lead to the development of UTI.

1. Introduction. 2. Iron acquisition system – siderophores, siderophore receptors. 3. Toxins. 3.1.  $\alpha$ -hemolysin HlyA. 3.2. Cytotoxic necrotizing factor 1. 3.3. Toxin Vat. 4. Protein Usp. 5. Protein Ag43. 6. Bacterial biofilm. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** Ag43, biofilm, system pobierania żelaza, toksyny, Usp

**Key words:** Ag43, biofilm, iron acquisition system, toxins, Usp

### 1. Wstęp

Pozajelitowe patogenne szczepy *Escherichia coli* ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) charakteryzują się różnorodnymi genotypami, jak i fenotypami, a w ich obrębie wyróżnia się, m.in. grupę uropatogennych szczepów *Escherichia coli* (uropathogenic *E. coli*, UPEC) odpowiedzialnych za 75–95% przypadków zakażeń układu moczowego (ZUM), zarówno u dzieci,

jak i osób dorosłych [4, 6, 10, 33, 34]. UPEC mogą kolonizować nabłonek układu moczowego człowieka, lecz o ich chorobotwórczości i zdolności do przeżycia w określonym środowisku decydują posiadane czynniki wirulencji i/lub nabyte przez bakterie cechy oporności na antybiotyki [4, 10, 60].

UPEC są niezwykle zróżnicowane pod względem prezentowanych czynników wirulencji. Potencjał inwazyjny tego patotypu związany jest z wytwarzaniem

\* Autor korespondencyjny: dr n. med. Sylwia Joanna Chmielewska, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok; tel. 695 348 868; e-mail: sylwia.chmielewska@umb.edu.pl

różnych typów adhezyn i inwazyj umożliwiających bakteriom przyleganie do komórek gospodarza, toksyn modulujących odpowiedź immunologiczną i szlaki metaboliczne oraz sideroforów niezbędnych do asymilacji żelaza [4, 38]. Ponadto ogromną rolę w patomechanizmie ZUM odgrywa zdolność tworzenia biofilmu przez szczepy UPEC. Biofilm stanowi bowiem skuteczną barierę dla stosowanych antybiotyków, co niejednokrotnie prowadzi do niepowodzeń terapeutycznych oraz przyczynia się do przewlekłych i nawracających stanów zapalnych układu moczowego [41].

Geny kodujące czynniki wirulencji szczepów UPEC umiejscowione są na ruchomych elementach genetycznych przenoszonych drogą horyzontalnego transferu genów (horizontal gene transfer, HGT). Zmieniające się środowisko stymuluje powstawanie nowych kombinacji genów czynników wirulencji powodując rozprzestrzenianie się nieobserwowanych dotąd patogennych klonów *E. coli*, wyróżniających się większą zjadliwością i ekspansywnością [4]. Dlatego też kompleksowa wiedza na temat determinant wirulencji szczepów UPEC, tj. sideroforów, receptorów sideroforów, toksyn, genotoksyn, białek Usp i Ag43, czy też zdolności do tworzenia biofilmu umożliwi lepsze poznanie patomechanizmu ZUM, co w przyszłości może posłużyć do opracowania nowych strategii zapobiegania i leczenia zakażeń wywołanych przez UPEC [55].

## 2. System wychwytu żelaza – siderofory, receptory sideroforów

Żelazo to niezbędny element wielu procesów komórkowych, m.in. zasadniczy kofaktor enzymów zaangażowanych w pierwotny i wtórny metabolizm komórkowy zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych [7, 63].

Pomimo, że w organizmie występuje znaczna ilość żelaza, to przeważająca część jest związana z białkami, takimi jak: hemoglobina, transferyna, laktoferyna lub ferrytyna, co znacznie ogranicza dostępność tego pierwiastka dla drobnoustrojów chorobotwórczych. Skutkuje to zahamowaniem wzrostu bakterii i uniemożliwia dalszy rozwój zakażenia [7, 15, 51, 63]. Szacuje się, iż stężenie wolnego żelaza we krwi wynosi zaledwie  $10^{-24}$ – $10^{-25}$  M, podczas gdy w tkankach wartość ta waha się od  $10^{-7}$  do  $10^{-8}$ . Należy zaznaczyć, iż przytoczone wartości są zdecydowanie niższe od poziomu żelaza wymaganego do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych i podziałów komórkowych bakterii tj.  $10^5$ – $10^6$  M [51, 63]. Niedobór żelaza to główna przeszkoda do wzrostu drobnoustrojów, dlatego też bakterie wykształciły różnorodne mechanizmy umożliwiające pozyskanie tego pierwiastka z organizmu gospodarza. Jednym z nich jest tzw. system wychwytu żelaza wyko-

rzystujący siderofory, takie jak: enterobaktyna (*ent*), salmochelina (*iro*), jersiniabaktyna (*irp*, *ybt*) i aerobaktyna (*iuc*), mające zdolność do chelatowania żelaza organicznego ze środowiska [2, 7, 56, 63]. Siderofory można podzielić na pięć głównych klas, tj. katecholan, fenolany, siderofory typu kwasu hydroksamowego,  $\alpha$ -hydroksykarboksylany oraz siderofory typu mieszanego. Zgodnie z tą klasyfikacją enterobaktyna i salmochelina zaliczane są do katecholanów, z kolei jersiniabaktyna do fenolanów, a aerobaktyna do sideroforów typu mieszanego [51].

Wśród szczepów UPEC mogą występować różne kombinacje wspomnianych sideroforów, z czego niektóre szczepy wytwarzają wszystkie cztery [57]. Komórka bakteryjna za pośrednictwem sideroforów jest w stanie wiązać żelazo i z powodzeniem konkurować z białkami gospodarza o dostęp do tego pierwiastka [7, 63]. Z kolei receptory błony zewnętrznej dla sideroforów ułatwiają transport kompleksu żelazo-siderofor przez błonę zewnętrzną bakterii do cytozolu, w którym to żelazo jest uwalniane. Wśród szczepów UPEC znanych jest wiele receptorów dla sideroforów, m.in. IroN (receptor dla salmocheliny), IutA (receptor dla aerobaktyny), FyuA (receptor dla jersiniabaktyny), Iha (receptor dla enterobaktyny) [3]. Dla przykładu szczep *E. coli* CFT073 koduje aż 14 receptorów błony zewnętrznej dla sideroforów oraz 4 systemy biosyntezy i transportu sideroforów, jak również szereg przepuszczalnych TonB zależnych receptorów zaangażowanych w wychwyty żelaza [20]. Co interesujące, badania doświadczalne wykazały, iż w mysim modelu zakażeń górnych dróg moczowych, delekcja genów dla TonB receptorów w szczepach UPEC skutkowałą osłabieniem kolonizacji przez drobnoustroje w okresie 48 godzin od zakażenia [36].

Powszechnym sideroforem występującym w szczepach UPEC jest enterobaktyna [48, 63]. Niemniej jednak, produkcja enterobaktyny nie jest unikalna dla *E. coli* i została opisana również wśród innych izolatów ZUM, tj. *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. i *Citrobacter* spp. [48]. Enterobaktyna charakteryzuje się powinowactwem do jonów żelaza rzędu  $K_d \sim 10^{-49}$  i konkuruje z transferyną o wiązanie tego pierwiastka w organizmie gospodarza, dlatego też szczepy UPEC syntetyzujące enterobaktynę wykazują zdolność do kolonizacji miejsc ubogich w żelazo, takich jak drogi moczowe [48, 63]. Z kolei w organizmie gospodarza aktywowane neutrofile uwalniają białko lipokalina 2, zwaną również lipokalina neutrofilową, związaną z żelatynazą wykazującą zdolność do wiązania się z enterobaktyną i uniemożliwiającą tym samym jej połączenie z żelazem. Lipokalina 2 wykazuje, więc właściwości bakteriostatyczne, zmniejszając konkurencyjny wychwyty  $Fe^{3+}$  przez szczepy UPEC, co hamuje ich namnażanie [63].

Kolejnym sideroforem jest salmochelina, po raz pierwszy wykryta u szczepu *Salmonella* spp., skąd też

wywodzi się jej nazwa [51]. Salmochelina powstaje w wyniku glikozylacji enterobaktyny przez glikozylotransferazę [48, 63]. Tego typu modyfikacja enterobaktyny zakodowana w klastrze genów *iroBCDEN* zlokalizowanym na plazmidzie ColV1, ColBM lub wyspie patogenności (PAI, pathogenicity island), zapobiega jej rozpoznaniu przez lipokalinę 2 [4, 51, 63]. Ze względu na fakt, iż kompleks żelazo-salmochelina nie jest rozpoznawany przez receptor dla enterobaktyny bakterie wykształciły kolejny receptor, tj. IroN, którego główną rolą jest wiązanie i transport do cytoplazmy ww. kompleksów, co umożliwia efektywne wykorzystywanie żelaza przez szczepy UPEC [4, 63]. Co więcej, białko IroN przypisuje się zasadniczą rolę w inwazji *in vitro* komórek nabłonka dróg moczowych przez szczepy ExPEC [18].

Jersiniabaktyna to kolejny siderofor umożliwiający pozyskiwanie  $Fe^{3+}$  z ustroju gospodarza, kodowany na PAI. Jersiniabaktyna po raz pierwszy została wykryta u bakterii *Yersinia pestis*, zaś w chwili obecnej opisana została jako istotna determinanta wirulencji takich drobnoustrojów jak: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. i kilka patotypów *E. coli* [48, 51, 62]. Jednym z ważniejszych genów obecnych na PAI jest gen *fyuA* kodujący 71 kDa białko błony zewnętrznej pełniące rolę receptora dla kompleksu  $Fe^{3+}$ -jersiniabaktyna. Ponadto wyniki badań przeprowadzonych przez Hancock i wsp. [24] wskazują, że *FyuA* odgrywa istotną rolę w tworzeniu biofilmu przez patogenne szczepy w środowisku ubogim w żelazo, takim jak ludzki mocz. Badania szczepu *E. coli* VR50, mutantu *fyuA*, wykazały bowiem aż 92% redukcję zdolności tworzenia biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego.

Podczas gdy enterobaktyna jest wytwarzana i wykorzystywana niemal przez wszystkie szczepy *E. coli*, to aerobaktyna, salmochelina i jersiniabaktyna oraz receptory dla tych sideroforów występują głównie u szczepów patogennych. Istnieje wiele dowodów potwierdzających istotną rolę systemu wychwytu żelaza u bakterii odpowiedzialnych za zakażenia dróg moczowych. U pacjentów z nawracającym ZUM wśród wyizolowanych szczepów *E. coli* zaobserwowano zwiększoną syntezę salmocheliny i jersiniabaktyny. Podobnie UPEC odpowiedzialne za zapalenie pęcherza moczowego u kobiet kodowały większość z opisanych elementów systemu wychwytu żelaza łącznie z lokus dla biosyntezy i transportu jersiniabaktyny [20, 63].

W badaniach nad szczepionkami zapobiegającymi niepowikłanym ZUM przez szczepy UPEC to właśnie receptory dla sideroforów zlokalizowane na błonie zewnętrznej bakterii są głównym przedmiotem zainteresowań wakcynologów. Okazało się bowiem, że szczepionki zawierające białka będące elementem systemu wychwytu żelaza stanowią skuteczną ochronę

przez zakażeniem szczepami UPEC w modelu eksperymentalnym [3, 7].

Alteri i wsp. [1] przeprowadzili badania z wykorzystaniem bioinformatyki, genomiki, transkryptomiki i proteomiki oceniające przydatność, m.in. Iha, IreA, IutA IroN w szczepionkach. Podczas donosowej immunizacji myszy dwa, z czterech badanych receptorów dla sideroforów, tj. IreA, IutA, indukowały odpowiedź immunologiczną, zarówno układową, jak i miejscową, tj. błony śluzowej obejmującą wytwarzanie przeciwciał klasy IgM, IgG i IgA, co zapobiegało kolonizacji pęcherza moczowego przez szczepy *E. coli*. Spośród 5 379 białek pochodzących ze szczepu *E. coli* CFT073 odpowiedzialnego za odmiedniczkowe zapalenie nerek (OZN), tylko sześć spełniało wszystkie kryteria określono jako PASivE (pathogen-specific, antigenic, surface-exposed, and *in vivo* expressed). Obejmowały one: wysoką specyficzność mającą na celu uniknięcie kierowania odpowiedzi immunologicznej na komensalne szczepy *E. coli*, antygenowość, ekspozycję powierzchniową w celu łatwego rozpoznania przez układ odpornościowy gospodarza oraz ekspresję *in vivo* [3, 7, 8].

Brumbaugh i wsp. [7] zidentyfikowali czwarty antygen możliwy do zastosowania w szczepionkach, m.in. *fyuA*, zapewniający skuteczną i długotrwałą odpowiedź humoralną chroniącą przed zakażeniami UPEC.

Należy również podkreślić ważną rolę receptora błony zewnętrznej dla salmocheliny, tj. IroN w zapobieganiu ZUM. Podskórna immunizacja myszy zdenaturowaną formą IroN skutkowałą znaczącym wzrostem wytwarzania specyficznych przeciwciał w klasie IgG, jednakże nie wywoływała istotnej układowej, jak i śluzówkowej odpowiedzi przeciwciał w klasie IgA. W modelu doświadczalnym immunizacja z wykorzystaniem receptora IroN zapewniała ochronę przed zakażeniem UPEC w nerkach myszy, jakkolwiek nie zaobserwowano skutecznej ochrony przed zakażeniem w pęcherzu moczowym. Nie jest jednak wykluczone, że dalsze badania skupiające się na zastosowaniu, m.in. adjuwantów lub innej alternatywnej drogi podania szczepionki, umożliwią w przyszłości w pełni skuteczne wykorzystanie IroN w zapobieganiu zakażeniom szczepami UPEC [8].

Podsumowując systemy biosyntezy i transportu sideroforów oraz receptory OM dla sideroforów umożliwiają UPEC wychwyty żelaza, co ułatwia kolonizację i utrzymywanie się w drogach moczowych [57].

### 3. Toksyny

#### 3.1. $\alpha$ -hemolizyna HlyA

Okolo 15% komensalnych szczepów *E. coli* koduje  $\alpha$ -hemolizynę HlyA. W przypadku UPEC obecność tej toksyny stwierdza się u 31–48% szczepów

odpowiedzialnych za zapalenie pęcherza moczowego oraz u 78% szczepów związanych z OZN [13]. Należy również podkreślić, że w przypadku produkcji tej toksyny przez UPEC obserwuje się pogorszenie stanu klinicznego pacjentów z ZUM [29, 47, 54, 56].

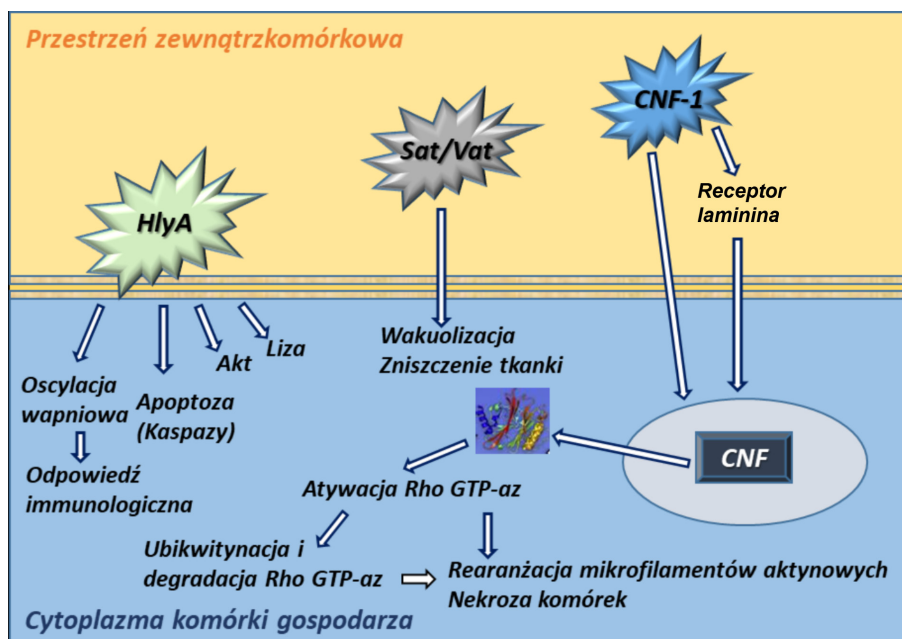
Nazwa tej toksyny wywodzi się od zdolności do przeprowadzania lizy erytrocytów. Należy jednak zaznaczyć, że HlyA wykazuje aktywność cytotoxyczną względem innych komórek, np.: monocytów, granulocytów, komórek śródbłonna oraz komórek nabłonka kanalików nerkowych myszy i naczelników [47, 54]. W temperaturze 37°C, w ciągu zaledwie 12 sekund, toksyna HlyA wiąże się z błoną krwinek czerwonych, co jest procesem nieodwracalnym i nieograniczonym [54]. Przypuszcza się, że wiązanie HlyA do komórek docelowych może być niezależne od receptora, ze względu na zdolność łączenia się tej toksyny ze sztucznymi błonami. Jednak kwestia obecności, czy też braku swoistych receptorów HlyA na powierzchni różnorodnych komórek wciąż pozostaje nierozstrzygnięta [5, 54].

HlyA to zależna od wapnia toksyna (calcium-dependent toxin) o wielkości 110-kDa, należy do tzw. rodziny RTX (repeats-in-toxin family) wykazujących zdolność do tworzenia porów o szerokości 1–3 nm w komórkach gospodarza, co może prowadzić do lizy komórek i ostatecznie niszczenia komórek nabłonkowych dróg moczowych [6, 47]. Główną funkcją tej toksyny jest niszczenie komórek gospodarza, co ułatwia pozyskiwanie składników odżywczych i innych związków, np. żelaza niezbędnego do wzrostu bakterii [63]. Wyniki licznych badań wskazują na swoistą interakcję między hemolizyną, a endotoksyną LPS (lipopolysaccharide). Sugeruje się, że LPS uczestniczy w formowaniu oraz utrzymaniu aktywnej konformacyjnie HlyA, a ponadto chroni ją przed deformacją i/lub agregacją [54]. Z przeprowadzonych badań [47] wynika, że cytotoxyczne właściwości HlyA wobec komórek ludzkich nabłonka pęcherza moczowego zmniejszyły się, gdy białko to zostało oczyszczone i oddzielone od LPS. W przyszłości poznanie dokładnego znaczenia LPS w cytotoxyczności HlyA oraz wyjaśnienie charakterystycznych różnic między oddziaływaniem na komórki oczyszczonej HlyA oraz HlyA-LPS, może zdefiniować nową rolę endotoksyny LPS bakterii Gram-ujemnych.

Gen *hlyA* koduje białko HlyA, będące początkowo nieaktywnym prekursorem tzw. pro-HlyA. Potranslacyjna aktywacja pro-HlyA obejmuje acylację obu reszt lizynowych w pozycji 564 i 690 przez cytoplazmatyczną acylotransferazę HlyC. Białko HlyA składa się z kilku domen. C-końcowy peptyd HlyA rozpoznaje tzw. translokator składający się z HlyB (wiązanie ATP) i HlyD (białko pomocnicze). Translokator wraz z białkiem błony zewnętrznej TolC umożliwia sekrecję HlyA na zewnątrz komórki bakteryjnej. Ponadto u toksyn należących do rodziny RTX tzw. obszar centralny C-ter-

minalnego regionu łańcucha jest szczególnie bogaty w glicynę i składa się z powtarzającej sekwencji dziesięciopeptydowej G-G-X-G-(N/D)-D-X-(L/I/F)-X (X – aminokwas charakterystyczny dla danej toksyny). Powtarzające się domeny wiążą jony  $Ca^{2+}$ , co jest niezbędne do rozpoznania komórek docelowych ssaków oraz przyłączenia HlyA do błony komórek gospodarza, jednakże nie jest konieczne do utworzenia kanałów w dwuwarstwie lipidowej [5, 54]. Związanie jonów  $Ca^{2+}$  (jeden jon wapnia na jedno powtórzenie) skutkuje strukturalnymi, jak i konformacyjnymi zmianami HlyA, tj. utworzeniem przez sekwencje nanopeptydowe  $\beta$ -łańcuchów, które następnie organizują się w tzw.  $\beta$ -helisy. W warunkach *in vitro* toksyna wykazuje maksymalną aktywność cytotoxiczną w momencie, gdy wszystkie jej miejsca wiążące wapń są wypełnione [47, 54]. Z kolei N-terminalny region białka HlyA odgrywa istotną rolę w procesie lizy komórek eukariotycznych. Reszty aminokwasowe (238–410) w tym fragmencie białka odpowiadają za aktywność hemolityczną HlyA tworząc hydrofobowe i/lub amfipatyczne  $\alpha$ -helisy niezbędne do formowania porów, zarówno w błonach biologicznych, jak i sztucznych [5, 47]. Co więcej, N-terminalny region toksyny wbudowuje się w błonę komórek eukariotycznych i przyjmuje rolę integralnego białka błony biologicznej [54]. Sánchez-Magraner i wsp. [50] badając domeny odpowiedzialne za wbudowywanie się w błonę komórek gospodarza wykazali, że brak aminokwasu w pozycji 601 w N-terminalnej części HlyA prowadzi do zaniku tej cechy. Naukowcom jednoznacznie nie udało się wyjaśnić jak duże stężenie  $\alpha$ -hemolizyny konieczne jest do wywołania hemolizy komórek, dlatego też większą wagę przywiązuje się do tzw. sublytycznych stężeń HlyA i ich wpływu na fizjologię komórek. Wg Wiles i wsp. [63] sublytyczne stężenia toksyn tworzących pory w błonie komórek eukariotycznych mogą modulować różnorodne ścieżki sygnalizacyjne, wliczając w to oscylację wapniową, aktywację kinazy MAP (microtubule associated protein), czy inaktywację kinazy serynowo-treoninowej Akt (serine/threonine protein kinase), odgrywającej kluczową rolę w regulacji procesów komórkowych, m.in. związanych z metabolizmem, wzrostem, apoptozą, cyklem komórkowym oraz proliferacją komórek. Ponadto HlyA pośredniczy w hamowaniu chemotaksji i niszczeniu bakterii w procesie fagocytozy oraz stymulacji apoptozy i procesu zapalnego (Ryc. 1).

Wewnątrzkomórkowe wahania jonów wapnia wywołane przez  $\alpha$ -hemolizynę stanowią sygnał do syntezy cytokin prozapalnych, tj. IL-8 i IL-6 [54]. Zdolność HlyA do wywoływania oscylacji wapniowej zależy od kilku czynników, w tym, m.in. od aktywacji GTP-azy RhoA (ras homolog gene family). Ponadto, pro-HlyA może wiązać się z błoną komórek eukariotycznych, lecz nie indukuje oscylacji wapniowej, co wskazuje, że



**Ryc. 1. Mechanizm działania i rola w patogenezie ZUM toksyn, tj. HlyA, Vat i CNF-1 wytwarzanych przez szczepy UPEC**  
 Objasnienia skrótów: HlyA –  $\alpha$ -Hemolysin, hemolizyna  $\alpha$ , Akt – Serine/Threonine Protein Kinase, kinaza serynowo-treoninowa, Sat – Secreted Autotransporter Toxin, autotransportująca toksyna, VAT – Vacuolating Autotransporter Toxin, autotransportująca wakuolizująca toksyna, CNF-1 – Cytotoxic Necrotizing Factor, cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący, Rho – Ras Homologues, białko należące do rodziny małych białek G, GTP-aza – guanosine-5'triphosphatase, guanozino-5'trifosfataza. Na podstawie [63].

proces acylowania jest wymagany do nabycia tej zdolności. Co więcej, oczyszczone HlyA, które jest wolne od endotoksyny LPS, nie może indukować wewnątrzkomórkowych wahań wapnia, lecz nadal wykazuje zdolność do lizy komórek, co podkreśla, że właściwości cytotoksyczne tej toksyny, jak i możliwość wywoływania oscylacji wapniowej są niezależne [47].

Tworzenie porów w błonie komórek eukariotycznych może wywołać chwilową utratę jonów potasowych. Co więcej, napływ jonów  $Ca^{2+}$  aktywuje kanały potasowe K(Ca)3.1 i TMEM16A. Oba te procesy prowadzą do aktywacji drogi p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases), co może skutkować uruchomieniem różnorodnych procesów, wliczając w to apoptozę komórek oraz aktywację pro-zapalnej produkcji cytokin. Wyniki licznych badań wskazują także, że subletalne stężenia HlyA stymulują inaktywację Akt pośrednicząc w jej defosforylacji, poprzez aktywację fosfataz PP1 i PP2A. Skutkuje to zmniejszeniem odpowiedzi zapalnej, co umożliwia bakteriom rozwój zakażenia. Ponadto, zwiększeniu ulega ilość proapoptotycznych czynników, co z kolei przyczynia się do eksfoliacji komórek. Procesy te mogą więc wyjaśnić wpływ ekspresji HlyA u szczepów UPEC na nasilenie objawów zakażenia u pacjentów z ZUM [47].

Należy dodać, iż w ciągu ostatnich lat toksyna HlyA stała się celem badań wakkynologów. Analiza wykonanych badań [66] wykazała, iż immunizacja myszy HlyA przyczyniła się do zmniejszenia bliznowacenia nerek,

lecz nie chroniła przed kolonizacją szczepami UPEC, dlatego też w celu opracowania skutecznych strategii terapeutycznych wymagana jest dalsza kontynuacja badań.

### 3.2. Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1

Szacuje się, że około 40% szczepów UPEC, jak również do 30% szczepów *E. coli* wywołujących biegunkę, koduje cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący (cytotoxic necrotizing factor, CNF-1) [21]. Rola tego czynnika wirulencji polega głównie na aktywacji białek z rodziny Rho (ras homologues) GTP-azy RhoA, Rac (małe białko G z rodziny Rho) i/lub Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) (Ryc. 1) [2, 63]. Toksyna CNF-1 jest białkiem należącym do tzw. dermonekrotycznej rodziny toksyn (dermonecrotic toxin family), w skład której wchodzi: CNF-1 i CNF-2 pochodzące od szczepu *E. coli*, CNFY występująca u *Y. pseudotuberculosis* i DNT u *Bordetella* spp. Toksyna CNF-1 zbudowana jest z domeny N-końcowej zawierającej miejsca wiążące receptor oraz domeny C-końcowej odpowiedzialnej za aktywność katalityczną [17].

Toksyna CNF-1 to 113-kDa białko odgrywające ważną rolę w patomechanizmie ZUM. Podczas zakażenia CNF-1 wytwarzany przez bakterie wiąże się z powierzchnią komórek nabłonkowych poprzez receptor lamininę. Następnie przy udziale receptorów następuje endocytoza toksyny do wnętrza komórek

eukariotycznych. Kwaśne warunki panujące w pęcherzyku endocytarnym stymulują translokację domeny katalitycznej CNF do cytozolu komórek gospodarza, gdzie następuje aktywacja Rho GTP-az (RhoA, Rac i/lub Cdc42). Przedłużająca się aktywacja oraz wysoki poziom Rho GTP-az prowadzi do ich ubikwitynacji, a następnie degradacji w proteasomach, co umożliwia osiągnięcie stężeń bliższych fizjologicznym [63].

Białka Rho są molekularnymi przełącznikami, oscylującymi między postacią nieaktywną – związaną z GDP (guanosine-5'diphosphate), a formą aktywną – związaną z GTP (guanosine-5'triphosphate). Cykl Rho GTP-az przebiega pod ścisłą kontrolą białek regulacyjnych, takich jak: GAP (GTPase-activating protein), GEF (guanine nucleotide exchange factor) i GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). W cytoplazmie Rho GTP-azy występują w postaci nieaktywnej, tworząc kompleks z białkiem GDI, które hamuje wymianę GDP na GTP. Aktywacja Rho GTP-az następuje z udziałem białka GEF, które umożliwia zarówno przyłączenie GTP, jak również dysocjację GDI. W formie związanej z GTP, białko Rho oddziałuje z różnymi cząstkami efektorowymi zapoczątkowując łańcuch kolejnych reakcji. W tym samym czasie białko GAP, czyli białko stymulujące aktywność GTP-azową małych białek G, inicjuje hydrolizę GTP do GDP, wywołując przejście z postaci aktywnej w nieaktywną. Należy podkreślić, że Rho GTP-azy są ważnym ogniwem rozmaitych szlaków sygnalizacyjnych, dzięki czemu regulują wiele istotnych procesów komórkowych [17, 21, 44]. Aktywność enzymatyczna CNF-1 polega na deamidacji określonej glutaminy białek Rho, tj. glutaminy 63 w białku RhoA i glutaminy 61 w Rac1 i Cdc42. Skutkuje to zablokowaniem hydrolizy GTP, co w konsekwencji wywołuje stale utrzymującą się aktywację białek Rho. Białka Rho kontrolują wiele procesów komórkowych, a ich aktywacja prowadzi w szczególności do rearanżacji mikrofilamentów aktynowych, zaburzeń cyklu komórkowego, modyfikacji kluczowych ścieżek sygnałowych i aktywności czynników transkrypcyjnych [17, 21, 44].

Ekspresja CNF-1 przez szczepy UPEC może w istotny sposób wpływać na przebieg ZUM. Należy zaznaczyć, iż CNF-1 przypisuje się zasadniczą rolę w wywoływaniu zmian w cytoszkieletu komórek eukariotycznych, a w szczególności w organizacji cytoszkieletu, tj. mikrofilamentów aktynowych czy mikrotubul. Aktywowane białka – RhoA, Rac, i/lub Cdc42 wpływają, m.in. na wydłużanie lamellipodiów i filopodiów oraz tworzenie włókien naprężeniowych w komórkach eukariotycznych [63]. Zmiany w cytoszkieletu komórek wywołane przez toksynę CNF-1 indukują zdolność do przechwytywania i internalizacji, np. komórek apoptotycznych, czy bakterii przez komórki nabłonkowe. W związku z powyższym, należy podkreślić istotną rolę tej toksyny w indukowaniu inwazji komórek gospodarza

przez szczepy UPEC. Ponadto CNF-1 zmniejsza zdolności fagocytarne leukocytów wielojądrowych (polymorphonuclear leukocytes, PMN) oraz aktywuje NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) w komórkach nabłonkowych, co prowadzi do ekspresji czynników prozapalnych. Znaczący jest również udział toksyny CNF-1 w ochronie komórek nabłonka pęcherza moczowego przed apoptozą [7]. Miraglia i wsp. [39] wykazali, że CNF-1 chroni komórki HEp-2 przed śmiercią na drodze apoptozy. Ponadto CNF-1 aktywuje białka Rac i Rho. Inaktywacja Rho, z udziałem systemu ubikwityna-proteasom, umożliwia dominującemu białku Rac aktywację anty-apoptotycznego szlaku, tj. PI3K/Akt/IKK prowadzącego do uwolnienia czynnika NF- $\kappa$ B. Uwolniony NF- $\kappa$ B ulega następnie translokacji do jądra, gdzie dochodzi do aktywacji transkrypcji genu *bcl-2*. Z kolei nadekspresja *bcl-2* wywołuje zmiany w morfologii mitochondrium, zapobiegając w ten sposób indukowanej przez UVB śmierci komórkowej.

Interesujące wyniki badań udało się uzyskać Guo i wsp. [23], które wykazały, iż CNF-1 wydzielany przez szczepy UPEC umożliwiał migrację i inwazję komórek nowotworu gruczołu krokowego oraz ostatecznie metastazę. W badaniach *in vitro* stwierdzono aktywację Cdc42-PAK1 (cell division control protein 42 homolog – P21-activated kinases 1), co wywoływało fosforylację PAK1 i zwiększenie ekspresji MMP-9 (matrix metalloproteinase 9). Z kolei, inne badania potwierdziły [64], iż fagocytoza szczepów UPEC przez makrofagi pod wpływem CNF-1, ulegała zmniejszeniu. W modelu doświadczalnym OZN nerek u myszy, zaobserwowano, iż toksyna CNF-1 przyczyniała się do zwiększenia liczby neutrofilów, powodujące ostry proces zapalny i uszkodzenie tkanki. Co więcej, ekspresja CD36 w makrofażach ulegała redukcji pod wpływem działania CNF-1 zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*.

Podsumowując efekty wywołane przez CNF-1 mogą ułatwiać rozprzestrzenianie się szczepów UPEC, jak również uniemożliwiać ich szybkie wyeliminowanie z układu moczowego [63].

### 3.3. Toksyna Vat

Proteazy serynowe występujące zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych, stanowią obecnie jedną z najbardziej zróżnicowanych grup, zwłaszcza pod względem spełnianej funkcji [49]. W organizmach prokariotycznych zaangażowane są w liczne procesy biologiczne, związane, m.in. z metabolizmem, rozwojem oraz wirulencją [14, 49].

Wśród proteaz serynowych wyróżnia się, m.in. SPATE (serine protease autotransporters of *Enterobacteriales*), czyli rodzinę zewnątrzkomórkowych proteaz produkowanych przez *Enterobacteriales*. SPATE, jak

sama nazwa wskazuje, to autotransporterzy wydzielane przez tzw. system sekrecji typu Va bakterii Gram-ujemnych [14]. Białka SPATE wytwarzane są przez szczepy należące do rzędu *Enterobacterales*, takie jak: *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Edwardsiella* spp. oraz *Citrobacter* spp. [49]. Autotransporterzy (AT) zbudowane są z trzech domen: peptydu sygnałowego (signal peptide), inicjującego transport białka prekursorowego przez błonę wewnętrzną; kolejno domeny N-terminalnej tzw. 'domeny pasażera' (passenger domain), zwanej również  $\alpha$ -domeną, kodującej biologiczną funkcję cząstek AT i C-terminalnej porotwórczej domeny tzw. 'domain translocator', znanej także, jako  $\beta$ -domena, niezbędnej do translokacji  $\alpha$ -domeny przez błonę zewnętrzną (outer membrane, OM) [14, 42, 49]. Ponadto wspólną cechą zróżnicowanych proteaz serynowych wytwarzanych przez bakterie rzędu *Enterobacterales* jest obecność w  $\alpha$ -domenie charakterystycznego motywu GDSGS zawierającego serynę, a także tzw. triady katalitycznej formowanej przez reszty His (histydyna), Asp (kwas asparaginowy) i Ser (seryna). Dodatkowo niezwykle istotna jest obecność dwóch występujących po sobie aminokwasów, asparaginy (N-N), które łączą  $\alpha$ -domenę z  $\beta$ -domeną oraz konserwatywne motywy składające się z 5–10 reszt aa obecnych w  $\alpha$ - i  $\beta$ -domenach [49]. Z kilkoma wyjątkami, po syntezie białka SPATE zostają przetransportowane za pomocą Sec-zależnej sekrecji, przy czym białko prekursorowe musi posiadać N-terminalną sekwencję sygnałową. Następnie  $\beta$ -domena jest umieszczana w błonie zewnętrznej, gdzie formułuje tzw.  $\beta$ -beczułkę. W kolejnym etapie  $\alpha$ -domena uwalniana jest do środowiska zewnętrznego przez błonę zewnętrzną lub pozostaje związana z powierzchnią komórki bakteryjnej. Brak  $\beta$ -domeny AT uniemożliwia translokację  $\alpha$ -domeny przez OM [14, 49].

Rodzina SPATE obejmująca ponad 25 proteaz serynowych została filogenetycznie podzielona na dwie klasy, tj. klasę-1 i klasę-2, na podstawie sekwencji aminokwasowej  $\alpha$ -domeny. Ponadto proteazy serynowe należące do klasy-1 SPATE zostały ogólnie określone jako tzw. cytotoksyczne, zaś przynależne do klasy-2 jako lektynopodobne immunomodulatory. Należy również dodać, że podstawą klasyfikacji proteaz serynowych do klasy-2 jest obecność tzw. domeny 2 w  $\alpha$ -domenie. Przy czym zidentyfikowano wiele allelicznych wariantów SPATE, które nie posiadają tej domeny, lecz mimo to, dzięki dużej homologii z proteazami klasy-2, zostały zaklasyfikowane do tej grupy. U szczepów UPEC zidentyfikowano następujące autotransporterzy SPATE: 1/ Klasa 1 – Sat (secreted autotransporter toxin), EspC (EPEC secreted protein C)-like, tj. EcPCN033-C1sp; 2/ Klasa 2 – Pic (protease involved in intestinal colonization)-like, Vat-like/Vat-ExEc i AdcA (adhesin involved in diffuse citrobacter adhesion)-like, tj. RE22-C2-sp [49].

Toksyna Vat (vacuolating autotransporter toxin) jest 111,8-kDa białkiem, kodowanym na wyspie patogenności VAT-PI szczepu APEC (avian pathogenic *E. coli*) Ec222 [52]. Bakterie APEC odpowiedzialne są, m.in. za zakażenia układu oddechowego, *cellulitis* oraz sepsę u drobiu [14, 49]. Vat podobnie jak Sat i EspC wywołuje wakuolizację komórek eukariotycznych (Ryc. 1). Co interesujące, Tsh (temperature-sensitive hemagglutinin), pomimo 75% homologii z toksyną Vat, nie indukuje powstawania wakuoli [14]. Ponadto Vat jest jedyną proteazą wśród SPATE, w której występują dwa odmienne aminokwasy (ATSGSP) w konserwatywnej sekwencji GDSGSP [14, 49]. Należy również podkreślić, że charakterystyczny motyw proteaz serynowych, tj. GDSGSP, jest ważny dla pełnionych przez nie funkcji, takich jak cytotoksyczność, czy aktywność proteolityczna. Może to tłumaczyć inaktywację aktywności proteolitycznej toksyny Vat wobec kazeiny, będącej uniwersalnym substratem dla wielu proteaz [43, 52]. Co interesujące, do tej pory nie zidentyfikowano substratów dla toksyny Vat [49].

Z kolei w przypadku bakterii ExPEC wyróżnia się tzw. toksynę Vat-like, Vat-ExEc. Toksyna ta wykazuje aż 96,5/97% homologię z toksyną Vat oraz 69,6/79% homologię z Tsh/Hbp (hemoglobin binding protein). Należy również zaznaczyć, że analiza homologów toksyny Vat wśród bakterii ExPEC wykazała niezmienny motyw GDSGSPL [49].

Toksynę VAT-ExEc identyfikuje się u 61% szczepów UPEC wywołujących OZN oraz w 65% przypadków zapalenia pęcherza moczowego [49]. Główną funkcją toksyny Vat jest wakuolizacja komórek eukariotycznych, co prowadzi do niszczenia komórek pęcherza moczowego i nerek [4, 49].

#### 4. Białko Usp

Gen *usp* kodujący białko Usp (uropathogenic specific protein) wykrywa się u 93,4% szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów z OZN i 88% szczepów pochodzących od pacjentów z przerostem gruczołu krokowego. Dla porównania zaledwie 24% szczepów *E. coli* izolowanych od zdrowych osób z próbek kału posiada w swoim genomie *usp*. Wysoką częstość występowania tego genu stwierdzono również w przypadku szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów z bakterie-mią i/lub urosepsą [40, 67].

Po raz pierwszy gen *usp* został wykryty w szczepie UPEC Z42 wyizolowanym od pacjenta z przerostem gruczołu krokowego. Gen *usp* (1,8 kb) kodowany jest na małej wyspie patogenności PAI<sub>usp</sub> wraz z 3 otwartymi ramkami odczytu *imu1-3*, oznaczanymi również, jako *orfU1*, *orfU2* i *orfU3*, kodującymi białka OrfU1, OrfU2 i OrfU3 [40, 68]. Istnieją dwa warianty tego genu – *uspI*

i *uspII* różniące się sekwencją końca 3' oraz strukturą regionu zawierającego *orfUs*. W związku z tym, w zależności od wariantów *usp* i sekwencyjnego układu *orfUs*, PAI*usp* można sklasyfikować do czterech podtypów, tj. Ia, Ib, IIa, IIb. Co interesujące, u szczepów *E. coli* wyizolowanych od pacjentów z ZUM obserwuje się w obrębie PAI*usp* dwa lub trzy *orfUs*, podczas gdy, wśród szczepów tzw. kałowych tylko jeden *orfU* [67]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Kanamaru i wsp. [30] stwierdzono, że 42,4% szczepów UPEC *usp*<sup>+</sup> należało do podtypu IIa, podczas gdy 28,4% szczepów do Ia, 9,8% do Ib i tylko 2,7% do IIb. W 2000 r. ukazała się praca Clermonta i wsp. [11] opisująca technikę typowania filogenetycznego, z wykorzystaniem reakcji PCR. Według autorów na podstawie obecności genów markerowych (*chuA*, *yjaA* oraz fragmentu DNA oznaczonego jako TspE4.C2, pochodzącego z biblioteki naukowców) szczepy *E. coli* można sklasyfikować do następujących grup filogenetycznych, tj. A, B1, B2 i D.

Liczne dane literaturowe wskazują, że wirulentne pozajelitowe szczepy *E. coli* reprezentują głównie grupę B2 i w mniejszym stopniu grupę D, z kolei większość szczepów komensalnych klasyfikuje się do grupy A lub B1 [9]. Wyniki uzyskane przez Kanamaru i wsp. [30] wykazały, iż 94,9% szczepów *E. coli* posiadających gen *usp* sklasyfikowano do grupy filogenetycznej B2, natomiast zaledwie 11,4% do grupy A, 13,8% do B1 i 24,3% do grupy D. Ponadto analiza sekwencji nukleotydowej wykazała około 40–45% identyczność regionu C-terminalnego białka Usp z bakteriocynami typu nukleaz, tj. kolicyną E7 *E. coli* oraz piocyjaniną S *Pseudomonas aeruginosa*, posiadającymi tzw. motyw H-N-H nukleaz. Z kolei w przypadku N-terminalnego regionu Usp wykazano podobieństwo do białka systemu sekrecji typu VI, tj. Hcp-like [12, 40].

Liczne badania eksperymentalne potwierdziły, że Usp *E. coli* wykazuje homologię do bakteriocyn typu nukleaz. Bakteriocyny definiowane są jako bakterio-bójcze białka lub peptydy wytwarzane przez bakterie. Różnią się one od tradycyjnych antybiotyków tym, że wykazują aktywność wobec bakterii ściśle związanych ze szczepem produkującym. Bakteriocyny typu nukleaz niszczą komórki docelowe poprzez degradację ich kwasu nukleinowego [67]. Ponadto, postuluje się, że białka OrfU1-3 zaangażowane są w ochronę komórek wytwarzających Usp przed ich własną aktywnością nukleazową oraz nadają bakteriom oporność wobec innych bakteriocyn [12, 67]. Szczepy kodujące trzy *orfUs* są odporne na większą liczbę bakteriocyn, dlatego też mogą być bardziej rozpowszechnione niż bakterie kodujące jedno lub dwa *orfUs* [67]. C-terminalny region Usp wykazuje homologię z motywem H-N-H. Charakterystyczny motyw H-N-H obserwuje się w obrębie różnego typu nukleaz reprezentowanych przez bakteriocyny typu nukleaz, jak również wśród

endonukleaz typu 'homing'. Co więcej, motyw H-N-H obecny jest również w obrębie nukleaz uczestniczących w różnorodnych procesach biologicznych, takich jak rekombinacja, czy zaprogramowane przegrupowanie DNA podczas różnicowania. H-N-H obserwuje się także w centrum aktywnym niektórych enzymów restrykcyjnych. Należy dodać, że nukleazy te wytwarzane są przez bakterie, wirusy i eukarionty. Już wcześniejsze badania potwierdziły, że Usp wykazuje homologię z bakteriocynami typu nukleaz, np. kolicynami. Większość bakteriocyn typu nukleaz posiada trzy funkcjonalne domeny: domenę nukleazy, domenę translokacji i domenę rozpoznawania receptora. Ich główną rolą jest rozpoznanie specyficznego receptora, translokacja białka do komórki docelowej i ostatecznie degradacja chromosomalnego DNA. W przypadku Usp, oprócz domeny nukleazy stwierdza się również obecność regionu homologicznego do domeny translokacji [68].

Na podstawie badań przeprowadzonych przez Zaw i wsp. [68] stwierdzono, że Usp wykazuje aktywność DNA-zy. Ponadto ukierunkowana mutagenезa potwierdziła, że motyw H-N-H w C-terminalnym regionie Usp jest niezbędny do jej aktywności nukleazowej, co wskazuje, że Usp można sklasyfikować do tzw. H-N-H nadrodziny nukleaz. Nipic i wsp. [40] stwierdzili, że Usp jest nowo poznaną genotoksyną oddziaływującą na komórki eukariotyczne, wywołującą, m.in. fragmentację DNA komórek [32]. Co więcej, genotoksyczna aktywność Usp zwiększa się wówczas, gdy Usp występuje łącznie z białkiem Imu2 [22, 37]. Szczepy *E. coli* posiadające zarówno *usp-imu2*, jak i *usp-imu1-3* mogą wywołać zaokrąglanie komórek, rozpad cytoszkieletu aktywnego i aktywację kaspazy 3 i 7, co w efekcie prowadzi do apoptozy komórek.

Ze względu na fakt, że Usp jest stosunkowo nowo poznany czynnikiem wirulencji szczepów *E. coli* wyjaśnienie zarówno samej właściwości tego białka, jak i jego wpływu na komórki eukariotyczne wymaga dalszych badań. Pomimo przeprowadzonych analiz wskazujących, że Usp wykazuje tzw. niespecyficzną aktywność nukleazową podobną do znanych bakteriocyn typu nukleaz, brak jest danych potwierdzających, iż aktywność czy spektrum niszczonej komórki są takie same. W celu poznania jednoznacznej odpowiedzi niezbędne są dalsze badania [68]. Ponadto niezwykle interesująca byłaby ocena czy krótkoterminowa ekspozycja komórek na oczyszczony Usp-Imu2 lub zakażenie szczepami *E. coli usp-imu1-3* może aktywować klasyczną DDR (DNA damage response) indukowaną przez CDT, toksynę 'typhoid' czy kolibaktynę [22]. Aktywacja DDR następuje w odpowiedzi na uszkodzenia DNA i obejmuje mechanizmy mające na celu aktywację szlaków naprawy DNA. Co więcej, DDR wpływa na punkty kontrolne samego cyklu komórkowego [32].



Należy zaznaczyć, iż w chwili obecnej zidentyfikowano jedynie kilka bakteryjnych genotoksyn. Wśród nich, oprócz Usp wyróżnia się, m.in. toksyny typu AB, tj. rodzinę toksyn CDT (cytolethal distending toxin) oraz toksynę 'typhoid' wydzielaną przez *Salmonella enterica* serovar Typhi. Toksyna CDT zbudowana jest z trzech jednostek, tj. CdtA, CdtB o aktywności DNA-zy i CdtC. Wytwarzana jest przez liczne bakterie Gram-ujemne, m.in. *E. coli* (EcCDT), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AaCDT), *Haemophilus ducreyi* (HdCDT), *Shigella dysenteriae* (SdCDT), *Campylobacter* spp. (CjCDT) oraz *Helicobacter hepaticus* (HhCDT). Toksyna CDT wywołuje uszkodzenia materiału genetycznego, co skutkuje zaburzeniami cyklu komórkowego i apoptozą komórek eukariotycznych [22, 32].

Kolejną genotoksyną jest kolibaktyna zidentyfikowana w 2006 r., wytwarzana przez szczepy *E. coli* należące do grupy filogenetycznej B2. Kolibaktyna należy do tzw. poliketydowych-nieribosomalnych peptydów. W przypadku kolibaktyny zmiany w materiale genetycznym komórek w odróżnieniu od CDT nie są indukowane przez białka efektorowe, lecz wiążą się z obecnością 54 KB genomowej wyspy, znajdującej się w locus *asnW* tRNA [22].

## 5. Białko Ag43

Białka autotransporterowe (autotransporter proteins, AT) reprezentujące ogromną rodzinę białek, odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu chorób, głównie ze względu na pełnione przez nie różnorodne funkcje biologiczne, tj. adhezja, agregacja, czy formowanie biofilmu. Należy dodać, iż AT są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii Gram-ujemnych. Wytwarzają je wszystkie klasy *Proteobacteria*, jak również liczne gatunki należące do *Chlamydiales* i *Fusobacteriales*. Wśród AT wyróżnia się, m.in. AIDA (adhesin involved in diffuse adherence)-I, której reprezentantem jest Ag43 stanowiący białko błony zewnętrznej. Autotransportery AIDA-I zbudowane są z peptydu sygnałowego, 'passenger domain', tj.  $\alpha$ -domeny oraz 'translocation domain', czyli  $\beta$ -domeny [46, 61].

Białko Ag43 (autotransporter protein antigen 43) kodowane jest przez gen *agn43*, pierwotnie określony, jako *flu* locus [61]. Antygen 43 obecny jest u licznych bakterii *E. coli*, zarówno chorobotwórczych, jak i kอมensalnych należących do różnych grup filogenetycznych. Należy również podkreślić, że niektóre szczepy posiadają nawet kilka kopii tego genu. W przypadku kอมensalnych szczepów *E. coli* 56% z nich koduje *agn43*. Dla porównania u ponad 90% szczepów UPEC stwierdzono obecność tego genu. Wyniki te sugerują częstsze występowanie *agn43* u szczepów chorobotwórczych. W chwili obecnej wyróżnia się co najmniej 5 wariantów allelicz-

nych *agn43*, tj. *agn43* K12, *agn43* EDL933, *agn43* RS218, *agn43a* CFT073 i *agn43b* CFT073 [46]. Ag43 zalicza się do AT, które ulegają glikozylacji przez cytozolowe transferazy. Glikozylacja wpływa na utrzymanie konformacji białek, zapewnia oporność na trawienie proteolityczne, ułatwia adhezję komórkową oraz rozpoznanie komórek gospodarza [31]. Reidl i wsp. [45] wykazali, że O-glikozylacja domen Ag43 doprowadzała do zaburzeń agregacji i znaczącego zmniejszenia adhezji do linii komórek eukariotycznych.

Białko Ag43 pełni wiele ważnych funkcji, m.in. pośredniczy w agregacji komórek, co sprzyja tworzeniu biofilmu, a to z kolei może wiązać się z długotrwałą obecnością bakterii w pęcherzu moczowym. Wyniki uzyskane przez Ulett i wsp. [58] wyraźnie wskazują, że Ag43 (z K-12 *E. coli*) powiązane jest z wczesnym stadium tworzenia biofilmu. Ag43 ze względu na pośrednictwo w formowaniu biofilmu promuje długotrwałą kolonizację dróg moczowych. Biofilm bakteryjny odgrywa bowiem ważną rolę w przeciwstawianiu się siłom obronnym gospodarza oraz antybiotykowi, co z kolei utrudnia skuteczne i szybkie wyleczenie pacjentów [55]. Wyniki badań uzyskane przez Heras i wsp. [25] wskazują, że domena  $\alpha$  Ag43 dzięki unikatowej  $\beta$ -helikalnej strukturze w kształcie litery L umożliwia i ułatwia tworzenie agregatów komórkowych poprzez tzw. molekularny mechanizm 'Velcro-like handshake'.

Białko Ag43 jest szeroko rozpowszechnione u szczepów wywołujących bezobjawową bakteriurię, zapalenie pęcherza moczowego oraz OZN [59]. Badania przeprowadzone przez Lüthje i wsp. [35] wykazały występowanie tego genu u 92% szczepów wywołujących nawrotowe ZUM, co może sugerować ważną rolę tego białka w długotrwałym utrzymywaniu się bakterii w drogach moczowych. Wysoką ekspresję Ag43 zaobserwowano u szczepów tworzących tzw. 'młody' biofilm, w przeciwieństwie do szczepów stanowiących biofilm 'dojrzały'. W związku z czym postuluje się, że Ag43 odgrywa ważną rolę we wczesnym etapie tworzenia biofilmu, jednakże nie jest niezbędne do 'dojrzwania' biofilmu. Jest to zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Wallecha i wsp. [61], którzy zaobserwowali najwyższy poziom ekspresji Ag43 u *E. coli* K12 w początkowej fazie wzrostu bakterii.

Szczep UPEC CFT073 koduje przynajmniej 10 białek AT. W przypadku Ag43 obecne są dwa warianty, tj. Ag43a i Ag43b, kodowane na PAI. Białka te wykazują około 90% homologię w sekwencji aminokwasowych, zaś kodujące je geny około 91% identyczność sekwencji nukleotydowych. Ponadto obserwuje się 85% homologię  $\alpha$ -domeny obydwu białek. Pomimo tak dużego stopnia podobieństwa Ag43a i Ag43b różnią się między sobą, np. stopniem agregacji komórek. Podczas gdy Ag43a promuje silną agregację, Ag43b pośredniczy w zdecydowanie słabszej agregacji komórek [25, 58]. Ponadto

wykazano, że równoczesna ekspresja fimbrii typu 1, może blokować bezpośredni kontakt komórka-komórka, co skutkuje zmniejszeniem agregacji komórek [59]. Wyniki uzyskane przez naukowców wyraźnie wskazują, że ekspresja Ag43a przez szczep CFT073 jest konieczna do optymalnej kolonizacji pęcherza moczowego w mysim modelu ZUM. Z kolei Ag43b charakteryzuje się słabszymi właściwościami w promowaniu agregacji i tworzeniu biofilmu, co nie sprzyja kolonizacji dróg moczowych [59]. W oparciu o metodę immunofluorescencji ekspresję Ag43 wykazano również wśród szczepów tworzących IBCs, (intracellular bacterial communities), co może sugerować ważną rolę tego białka w wewnątrzkomórkowej fazie wzrostu szczepów UPEC [55].

## 6. Biofilm bakteryjny

Biofilm bakteryjny określany jest jako złożona, wielokomórkowa, niejednorodna strukturalnie i zróżnicowana genetycznie tzw. 'społeczność bakterii' otoczona warstwą zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS, extracellular polymeric substance) [53, 55]. Wytwarzanie EPS nie jest niezbędne do adhezji bakterii do określonej powierzchni, lecz odgrywa ważną rolę w tworzeniu trójwymiarowej struktury biofilmu [65]. Szacuje się, że komórki bakteryjne stanowią zaledwie 10–25% biofilmu, podczas gdy EPS, aż 75–90% [37]. Biofilm mogą tworzyć bakterie należące do jednego lub kilku gatunków, a także grzyby [55]. Na formowanie biofilmu mają wpływ czynniki środowiskowe, np. obecność substancji odżywczych, czy ciśnienie osmotyczne. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że wzrost osmolarności do 0,3 M NaCl w pożywce hamuje tworzenie biofilmu przez szczepy *E. coli* oraz ogranicza wzrost badanych bakterii [65]. W zależności od miejsca powstawania i składu gatunkowego biofilm może przyczynić się do rozwoju zakażeń wywołujących implikacje zarówno kliniczne, jak i terapeutyczne. W medycynie bakterie tworzące biofilm na sztucznych powierzchniach, czy innego rodzaju ciałach obcych, tj. protezach ortopedycznych, sztucznych zastawkach serca, cewnikach moczowych, odgrywają istotną rolę w patogenezie, m.in. zapalenia wsierdza, zapalenia płuc, jak również zapalenia szpiku kostnego oraz pęcherza moczowego [41].

Proces powstawania biofilmu można podzielić na pięć etapów. W pierwszym z nich dochodzi do adhezji bakteryjnej do różnego rodzaju powierzchni, zarówno biotycznych, jak i abiotycznych. O skuteczności przylegania bakterii do powierzchni docelowej decydują właściwości zarówno samej powierzchni, jak również właściwości hydrofobowe powierzchni komórki bakteryjnej. Ponadto duże znaczenie mają oddziaływania międzycząsteczkowe, np. siły van der Waalsa, wiązania jonowe oraz wodorowe. W drugim etapie komórki

bakteryjne zostają nieodwracalnie związane z kolonizowaną powierzchnią i rozpoczyna się proces wytwarzania EPS. W kolejnych dwóch etapach dochodzi do formowania dojrzałego biofilmu, poprzez tworzenie mikrokolonii, intensywne podziały komórkowe oraz dalszą syntezę macierzy pozakomórkowej. Ważną rolę odgrywa w tych etapach proces wyczuwania liczebności (quorum sensing), w którym to komórki bakteryjne komunikują się ze sobą poprzez uwalnianie, wykrywanie i reagowanie na cząstki sygnałowe stymulujące ich podziały komórkowe oraz regulujące procesy fizjologiczne. W ostatnim etapie pojedyncze komórki bakteryjne lub nawet większe fragmenty biofilmu ulegają dyspersji, a następnie adhezji do nowych powierzchni, nawet odległych anatomicznie [41].

Bakterie tworzące biofilm wykazują wielokrotnie większą oporność (nawet 1000–1500-krotnie) na antybiotyki oraz substancje toksyczne w porównaniu do komórek planktonowych. EPS stanowi bowiem fizyczną barierę utrudniającą opsonizację i fagocytozę przez komórki układu immunologicznego [28, 37, 41]. Co więcej, bakterie w obrębie biofilmu często tworzą różne subpopulacje, cechujące się odrębnymi właściwościami fizjologicznymi, metabolizmem, czy ekspresją genów, dlatego też „wspólnota bakteryjna biofilmu” składająca się z wielu różnych subpopulacji, wykazuje oporność na tak szeroki zakres czynników środowiskowych [28].

W przypadku ZUM niebezpieczne są zwłaszcza implikacje kliniczne związane z tworzeniem biofilmu na cewnikach. Należy podkreślić, że formowanie biofilmu rozpoczyna się natychmiast po umieszczeniu cewnika w pęcherzu moczowym [27]. *E. coli* dzięki zdolności adhezji do wielu polimerów wchodzących w skład cewników, takich jak: polipropylen, polistyren, polichlorek winylu, czy silikon, jest w stanie trwale i skutecznie je skolonizować [40]. Rozwinięcie się ZUM jest ściśle związane z długością okresu pozostawiania cewnika w drogach moczowych, przy czym każdy kolejny dzień zwiększa to ryzyko o 3–8% [26, 27, 41].

Cechą odróżniającą komórki tworzące biofilm od komórek planktonowych jest obecność EPS składającej się, np. z białek, polisacharydów i/lub DNA. Skład macierzy biofilmu różni się także między poszczególnymi gatunkami bakterii [28, 55]. Należy podkreślić, że fimbrie spiralne zostały zidentyfikowane, jako pierwsze tzw. funkcjonalne amyloidy będące zewnątrzkomórkowymi białkami wytwarzanymi przez wiele bakterii jelitowych, w tym *E. coli* i *Salmonella* spp. Amyloidy od dziesięcioleci są intensywnie badane, przy czym należy zaznaczyć, że odgrywają one ważną rolę w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona i Huntingtona. Niedawno odkryto nową klasę amyloidów, określonych, jako tzw. amyloidy funkcjonalne [16].

W przypadku szczepów *E. coli*, fimbrie spiralne są głównym składnikiem białkowym macierzy biofilmu,

przy czym ich produkcja ograniczona jest do wybranych subpopulacji. Ekspresja fimbrii spiralnych jest kontrolowana przez szereg sygnałów środowiskowych i gradientów chemicznych, takich jak temperatura, osmolarność i tlen. Główną podjednostką fimbrii spiralnych jest CsgA, ponadto wyróżnia się, m.in. CsgB i CsgC [16]. Fimbrie spiralne są istotnym czynnikiem wirulencji szczepów UPEC, gdyż ułatwiają kolonizację pęcherza moczowego w mysim modelu doświadczalnym oraz pośredniczą w tworzeniu biofilmu. Należy dodać, że w przypadku nieleczonych zakażeń, może rozwinąć się bakteremia, wówczas, w próbkach surowicy pochodzących od pacjentów z bakteriami stwierdza się obecność przeciwciał przeciwko głównej podjednostce fimbrii spiralnych, tj. CsgA, co podkreśla ich istotną rolę w patomechanizmie niektórych zakażeń. Bakterie wytwarzające fimbrie spiralne stymulują w organizmie gospodarza produkcję cytokin prozapalnych, tj. IL-8. Co więcej, szczepy te charakteryzują się wyższym poziomem oporności na przeciwbakteryjny peptyd katelicydynę (LL-37). LL-37 hamuje polimeryzację genów kodujących główną podjednostkę strukturalną CsgA, co zapobiega adhezji bakteryjnej i tworzeniu biofilmu w warunkach *in vitro*. W chwili obecnej poszukiwane są nowe strategie terapeutyczne zakażeń szczepami UPEC, gdzie istotne zastosowanie mogą mieć chemiczne inhibitory biosyntezy fimbrii spiralnych [28, 55].

Innym ważnym polimerem obecnym w EPS szczepów *E. coli* jest celuloza będąca liniowym łańcuchem  $\beta$ -(1,4)-monomerów glukozy. W 2001 r. po raz pierwszy opisano wytwarzanie celulozy przez bakterie rzędu *Enterobacteriales*. Ekspresja genów syntezy celulozy jest zazwyczaj uzależniona od głównego regulatora tworzenia biofilmu, czyli CsgD [28]. Ważną rolę w promowaniu kolonizacji dróg moczowych oraz tworzeniu biofilmu przez szczepy UPEC odgrywa również antygen 43 i fimbrie typu 1 [28, 55]. Fimbrie typ 1 pełnią ważną funkcję w zakażeniach dróg moczowych, gdyż biorą udział w stymulowaniu bakteryjnej autoagregacji i formowaniu biofilmu [55]. Co więcej, Floyd i wsp. [19] wykazali, że bakterie ekspresujące fimbrie typu 1 tworzą głównie górną warstwę biofilmu, gdzie zapewniony jest dostęp powietrza. Spadek stężenia tlenu prowadzi do znacznej redukcji ekspresji fimbrii typu 1 na powierzchni komórek bakteryjnych. Na podstawie tych badań można wywnioskować, że przepuszczalność tlenu, przynajmniej częściowo, reguluje ekspresję fimbrii typu 1.

## 7. Podsumowanie

Szczepy UPEC, będące czynnikiem etiologicznym 75–95% przypadków ZUM, kodują wiele różnorodnych czynników wirulencji, tj. systemy biosyntezy i transportu sideroforów, receptory OM dla sideroforów, tok-

syny, białka Usp i Ag43 oraz charakteryzują się zdolnością do tworzenia biofilmu [34, 38, 55, 60]. Potencjał wirulentny UPEC umożliwia nie tylko kolonizację układu moczowego, lecz również ułatwia drobnoustrojom utrzymywanie się w obrębie dróg moczowych nawet przy silnej odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. Ponadto wiele determinant wirulencji umożliwia UPEC dostęp do niezbędnych składników odżywczych, kolejno ich wzrost i namnażanie nawet w tak nieprzyjnym środowisku jak drogi moczowe. Co więcej, niektóre czynniki wirulencji przyczyniają się do uszkodzenia komórek, co warunkuje dostęp do głębszych tkanek gospodarza [6, 55].

W Polsce, podobnie, jak i na całym świecie, ZUM wywołane przez szczepy UPEC, stanowią ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W związku z powyższym, tak cenna jest wiedza na temat czynników wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli*, która może przyczynić się do opracowania nowych opcji terapeutycznych w profilaktyce i leczeniu ZUM i/lub zaowocować rozwojem nowych metod diagnostycznych [55].

## Piśmiennictwo

1. Alteri C.J., Hagan E.C., Sivick K.E., Smith S.N., Mobley H.L.: Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000586 (2009)
2. Asadi Karam M.R., Habibi M., Bouzari S.: Urinary tract infection: pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Immunol.* **108**, 56–67 (2019)
3. Awasthi T.R., Pant N.D., Dahal P.R.: Prevalence of multidrug resistant bacteria in causing community acquired urinary tract infection among the patients attending outpatient Department of Seti Zonal Hospital, Dhangadi, Nepal. *Nepal. J. Biotechnol.* **3**, 55–59 (2015)
4. Baldy-Chudzik K., Bok E., Mazurek J.: Znane i nowe warianty patogennych *Escherichia coli* jako konsekwencja plastycznego genomu. *Post. Hig. Med. Dosw.* **69**, 345–361 (2015)
5. Benz R., Maier E., Bauer S., Ludwig A.: The deletion of several amino acid stretches of *Escherichia coli* alpha-Hemolysin (HlyA) suggests that the channel-forming domain contains beta-strands. *PLoS One*, **9**, e112248 (2014)
6. Bien J., Sokolova O., Bozko P.: Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int. J. Nephrol.* **2012**, 681473 (2012)
7. Brumbaugh A.R., Mobley H.L.: Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert. Rev. Vaccines.* **11**, 663–676 (2012)
8. Brumbaugh A.R., Smith S.N., Mobley H.L.: Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection. *Infect. Immun.* **81**, 3309–3316 (2013)
9. Carlos C., Pires M.M., Stoppe N.C., Hachich E.M., Sato M.I., Gomes T.A., Amaral L.A., Ottononi L.M.: *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* **10**, 161 (2010)
10. Chmielewska S.J., Fiedoruk K., Daniluk T., Ściepuk M., Kaczmarzyk D., Leszczyńska K.: Znaczenie uropatogennych

- szczepów *Escherichia coli* (UPEC) w etiopatogenezie zakażeń układu moczowego. *Post. Mikrobiol.* **55**, 45–56 (2016)
11. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E.: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558 (2000)
  12. Crnigoj M., Podlesek Z., Budič M., Zgur-Bertok D.: The *Escherichia coli* uropathogenic-specific-protein associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid-binding activity. *BMC Microbiol.* **14**, 16 (2014)
  13. Croxen M.A., Finlay B.B.: Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010)
  14. Dautin N.: Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins (Basel)*, **2**, 1179–1206 (2010)
  15. Dikshit N., Bist P., Fenlon S.N., Pulloor N.K., Chua C.E., Scidmore M.A., Carlyon J.A., Tang B.L., Chen S.L., Sukumaran B.: Intracellular uropathogenic *E. coli* exploits host Rab35 for iron acquisition and survival within urinary bladder cells. *PLOS Pathog.* **6**, e1005083 (2015)
  16. Evans M.L., Chapman M.R.: Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1551–1558 (2014)
  17. Fabbri A., Travaglione S., Fiorentini C.: *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, *in vivo* applications and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*, **2**, 283–296 (2010)
  18. Feldmann F., Sorsa L.J., Hildinger K., Schubert S.: The salmonelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *in vitro*. *Infect. Immun.* **75**, 3183–3187 (2007)
  19. Floyd K.A., Moore J.L., Eberly A.R., Good J.A., Shaffer C.L., Zaver H., Almqvist F., Skaar E.P., Caprioli R.M., Hadjifrangiskou M.: Adhesive fiber stratification in uropathogenic *Escherichia coli* biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili. *PLOS Pathog.* **11**, e1004697 (2015)
  20. Garcia E.C., Brumbaugh A.R., Mobley H.L.: Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **79**, 1225–1235 (2011)
  21. Garcia T.A., Ventura C.L., Smith M.A., Merrell D.S., O'Brien A.D.: Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infect. Immun.* **81**, 99–109 (2013)
  22. Grasso F., Frisan T.: Bacterial genotoxins: merging the DNA damage response into infection biology. *Biomolecules*, **5**, 1762–1782 (2015)
  23. Guo Y., Zhang Z., Wei H., Wang J., Lv J., Zhang K., Keller E.T., Yao Z., Wang Q.: Cytotoxic necrotizing factor 1 promotes prostate cancer progression through activating the Cdc42-PAK1 axis. *J. Pathol.* **243**, 208–219 (2017)
  24. Hancock V., Ferrières L., Klemm P.: The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, **154**, 167–175 (2008)
  25. Heras B., Totsika M., Peters K.M., Paxman J.J., Gee C.L., Jarrott R.J., Perugini M.A., Whitten A.E., Schembri M.A.: The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 457–462 (2014)
  26. Hooton T.M., Bradley S.F., Cardenas D.D., Colgan R., Geerlings S.E., Rice J.C., Saint S., Schaeffer A.J., Tambayh P.A., Tenke P., Nicolle L.E.: Infectious Diseases Society of America. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 625–663 (2010)
  27. Hryniewicz W., Holecki M.: Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki zakażeń układu moczowego u dorosłych, 2015, <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/uklmoczowyinternet.pdf> (05.07.2019)
  28. Hufnagel D.A., Depas W.H., Chapman M.R.: The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiol. Spectr.* **3**, doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014 (2015)
  29. Jamet A., Nassif X.: New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *MBio.* **6**, e00285-15 (2015)
  30. Kanamaru S., Kurazono H., Nakano M., Terai A., Ogawa O., Yamamoto S.: Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. *Int. J. Urol.* **13**, 754–760 (2006)
  31. Knudsen S.K., Stensballe A., Franzmann M., Westergaard U.B., Otzen D.E.: Effect of glycosylation on the extracellular domain of the Ag43 bacterial autotransporter: enhanced stability and reduced cellular aggregation. *Biochem. J.* **412**, 563–577 (2008)
  32. Kobińska P., Wyszynska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Charakterystyka genotoksyn CDT (cytolethal distending toxin). *Post. Mikrobiol.* **52**, 315–324 (2013)
  33. Lo Y., Zhang L., Foxman B., Zöllner S.: Whole-genome sequencing of uropathogenic *Escherichia coli* reveals long evolutionary history of diversity and virulence. *Infect. Genet. Evol.* **34**, 244–250 (2015)
  34. Luo Y., Ma Y., Zhao Q., Wang L., Guo L., Ye L., Zhang Y., Yang J.: Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 4002–4007 (2012)
  35. Lüthje P., Brauner A.: Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.* **65**, 337–372 (2014)
  36. Mann R., Mediati D.G., Duggin I.G., Harry E.J., Bottomley A.L.: Metabolic adaptations of uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 241 (2017)
  37. Matusiak D.M.: Zakażenia układu moczowego z udziałem *Proteus mirabilis* – rola biofilmu i inkrustacji cewnika urologicznego. *Post. Mikrobiol.* **53**, 173–180 (2014)
  38. McLellan L.K., Hunstad D.A.: Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends. Mol. Med.* **22**, 946–957 (2016)
  39. Miraglia A.G., Travaglione S., Meschini S., Falzano L., Matarrese P., Quaranta M.G., Viora M., Fiorentini C., Fabbri A.: Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 2735–2744 (2007)
  40. Nipic D., Podlesek Z., Budič M., Črnigoj M., Žgur-Bertok D.: *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *J. Infect. Dis.* **208**, 1545–1552 (2013)
  41. Ostrowska K., Strzelczyk A., Różalski A., Stączek P.: Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **67**, 1027–1033 (2013)
  42. Paxman J.J., Heras B.: Unique structural features of a bacterial autotransporter adhesin suggest mechanisms for interaction with host macromolecules. *Nat. Commun.* **10**, 967 (2019)
  43. Pérez-Moreno M.O., Pérez-Moreno M., Carulla M., Rubio C., Jardí A.M., Zaragoza J.: Mechanisms of reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 234–241 (2004)
  44. Piteau M., Papatheodorou P., Schwan C., Schlosser A., Aktories K., Schmidt G.: Lu/BCAM adhesion glycoprotein is a receptor for *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). *PLOS Pathog.* **10**, e1003884 (2014)
  45. Reidl S., Lehmann A., Schiller R., Salam Khan A., Dobrindt U.: Impact of O-glycosylation on the molecular and cellular adhe-

- sion properties of the *Escherichia coli* autotransporter protein Ag43. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 389–401 (2009)
46. Restieri C., Garriss G., Locas M.C., Dozois C.M.: Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1553–1562 (2007)
  47. Ristow L.C., Welch R.A.: Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: a cloak or a dagger. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 538–545 (2016)
  48. Robinson A.E., Heffernan J.R., Henderson J.P.: The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future Microbiol.* **13**, 745–756 (2018)
  49. Ruiz-Perez F., Nataro J.P.: Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life. Sci.* **71**, 745–770 (2014)
  50. Sánchez-Magraner L., Viguera A.R., García-Pacios M., Garcilán M.P., Arrondo J.L., de la Cruz F., Goñi F.M., Ostolaza H.: The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 11827–11835 (2007)
  51. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Książczyk M., Bugła-Ploskonska G., Choroszy-Krol I.: Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut. Pathog.* **11**, 10 (2019)
  52. Schito G.C., Naber K.G., Botto H., Palou J., Mazzei T., Gualco L., Marchese A.: The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 407–413 (2009)
  53. Sharma G., Sharma S., Sharma P., Chandola D., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 309–319 (2016)
  54. Sobieszczkańska M.B.: Hemolizyny *Escherichia coli*. *Post. Mikrobiol.* **46**, 343–353 (2007)
  55. Subashchandrabose S., Mobley H.L.: Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **3**, doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015–2012 (2015)
  56. Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E.: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front. Microbiol.* **8**, 1566 (2017)
  57. Ulett G.C., Totsika M., Schaale K., Carey A.J., Sweet M.J., Schembri M.A.: Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 100–107 (2013)
  58. Ulett G.C., Valle J., Beloin C., Sherlock O., Ghigo J.M., Schembri M.A.: Functional analysis of Antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect. Immun.* **75**, 3233–3244 (2007)
  59. Vollmerhausen T.L., Katouli M.: Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from hospitalized children and adults with urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 975–982 (2014)
  60. Wagenlehner F.M.E., Naber K.G.: Treatment of bacterial urinary tract infections: presence and future. *Eur. Urol.* **49**, 235–244 (2006)
  61. Wallecha A., Oreh H., van der Woude M.W., deHaseth P.L.: Control of gene expression at a bacterial leader RNA, the *agn43* gene encoding outer membrane protein Ag43 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **196**, 2728–2735 (2014)
  62. Watts R.E., Totsika M., Challinor V.L., Mabbett A.N., Ulett G.C., De Voss J.J., Schembri M.A.: Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**, 333–344 (2012)
  63. Wiles T.J., Kulesus R.R., Mulvey M.A.: Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 11–19 (2008)
  64. Yang H., Li Q., Wang C., Wang J., Lv J., Wang L., Zhang Z.S., Yao Z., Wang Q.: Cytotoxic necrotizing nactor 1 downregulates CD36 transcription in macrophages to induce inflammation during acute urinary tract infections. *Front. Immunol.* **9**, 1987 (2018)
  65. Zalewska-Piątek B., Wilkanowicz S., Bruździak P., Piątek R., Kur J.: Biochemical characteristic of biofilm of uropathogenic *Escherichia coli* Dr<sup>+</sup> strains. *Microbiol. Res.* **168**, 367–378 (2013)
  66. Zalewska-Piątek B.M., Piątek R.J.: Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Acta. Biochim. Pol.* **66**, 129–138 (2019)
  67. Zaw M.T., Lai Y.M., Lin Z.: Uropathogenic specific protein: epidemiologic marker of uropathogenic *Escherichia coli* as well as non-specific DNase. *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health*, **5**, 630 (2013)
  68. Zaw M.T., Yamasaki E., Yamamoto S., Nair G.B., Kawamoto K., Kurazono H.: Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. *Gut. Pathog.* **5**, 13 (2013)