

BIĄŁKA POWIERZCHNIOWE ENTEROKOKÓW ODPOWIEDZIALNE ZA ODDZIAŁYWANIE Z TKANKAMI GOSPODARZA

Janusz Strzelecki^{*1}, Ewa Sadowy², Waleria Hryniewicz¹

¹ Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków

² Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34 00-725 Warszawa

Wpłynęło we wrześniu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Sortazy. 3. Substancja agregująca – AS. 4. Białko powierzchniowe – Esp. 5. Białka rodziny MSCRAMMs. 5.1. Mechanizmy przyłączania ligandu przez MSCRAMMs. 6. Białko SgrA. 7. Fimbrie. 8. Podsumowanie

Enterococcal surface proteins responsible for interactions with host tissues

Abstract: In the last two decades enterococci have become important nosocomial pathogens. Increasing multidrug resistance of these bacteria emphasizes the need of effective therapy and immunoprophylaxis. The bacterial factors that are implicated in colonization of host tissue surfaces and initiating symptomatic infections are considered to be of particular importance in this area. Among these factors, the class of surface proteins with the LPXTG structural motif is the most extensively studied. The recognition of the motif, specific for Gram-positive bacteria, by transpeptidases called sortases and subsequent cleavage leads to covalent attachment of a surface protein to the cell-wall peptidoglycan. This review focuses on recent advances in the characterization of this type of proteins in enterococci, such as aggregation substance (AS), enterococcal surface protein (Esp), microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) and pili.

1. Introduction. 2. Sortases. 3. Aggregation substance – AS. 4. Surface protein – Esp. 5. MSCRAMMs. 5.1. Mechanisms of ligand binding by MSCRAMMs. 6. SgrA. 7. Pili. 8. Summary

Słowa kluczowe: białka powierzchniowe, enterokoki, motyw LPXTG, oddziaływania z tkankami gospodarza

Key words: surface proteins, enterococci, LPXTG motif, interactions with host tissues

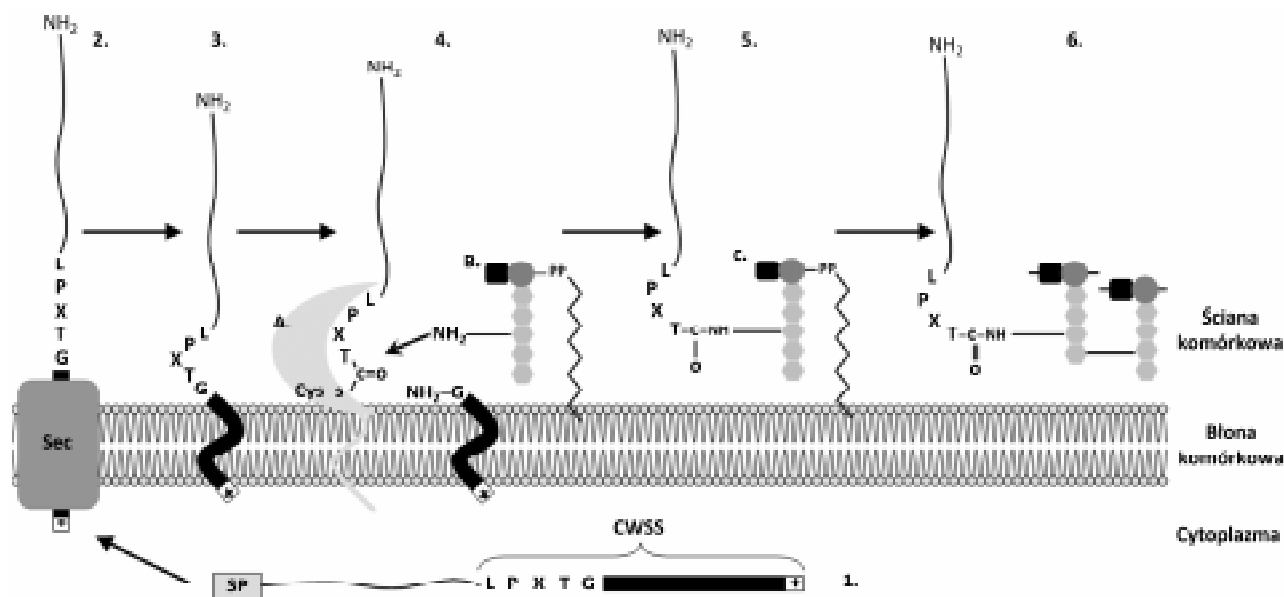
1. Wstęp

Zakażenia powodowane przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* stały się istotnym problemem medycznym na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat. Na całym świecie wielooporne szczepy *Enterococcus faecalis* oraz *Enterococcus faecium* są odpowiedzialne za trudne w leczeniu infekcje dróg moczowych, bakteremie, zakażenia ran pooperacyjnych oraz zapalenia wsierdza. Te dwa gatunki uważane są za trzecią pod względem częstości przyczynę zakażeń szpitalnych na świecie [76]. Enterokoki posiadają zarówno naturalne, jak i nabyte mechanizmy oporności na najczęściej stosowane antybiotyki [33]. Bakterie z tej grupy są także źródłem oporności rozprzestrzenianej na ruchomych elementach genetycznych, czego przykładem jest przekazanie genów oporności na wankomycynę *Staphylococcus aureus* opornemu na metycylinę [9]. Enterokoki zdolne są również do bytowania w środowisku szpitalnym, dzięki dużej tolerancji na wysokie temperatury i stężenia soli czy stosowane środki czystości, a także zdolności do wzrostu w pH > 9 [1]. W obliczu tych faktów, poważnym wyzwaniem stało się opracowanie

skutecznej immunoterapii skierowanej przeciwko czynnikom odpowiedzialnym za procesy patogenyzy wywoływane przez te mikroorganizmy.

Do dobrze poznanych czynników wirulencji bakterii z rodzaju *Enterococcus* należą białka wydzielane na zewnątrz komórki, takie jak: cytolizyna, hialuronidaza i żelatynaza, a także otoczka polisacharydowa oraz składniki ściany komórkowej, takie jak wielocukry, i kwas lipoteichowy [24]. Wiele uwagi poświęca się w ostatnim czasie czynnikom powierzchniowym, odpowiadającym za oddziaływanie komórki bakteryjnej z tkankami gospodarza, które jest pierwszym etapem infekcji. Szczególnie intensywne badania dotyczą szerokiej grupy białek posiadających charakterystyczny, silnie konserwowany motyw LPXTG (w którym X oznacza dowolny aminokwas), zlokalizowany w C-końcowym fragmencie cząsteczki. Ta charakterystyczna sekwencja jest uważana za miejsce rozpoznawania oraz cięcia przez enzymy zwane sortazami, które następnie kowalencyjnie przyłączają białko do peptydoglikanu ściany komórkowej [14]. Dalsze badania dotyczące tej szerokiej rodziny czynników powierzchniowych dostarczają cennych informacji na temat

* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków; ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; tel. 22 851 40 71, wew. 230; e-mail: jstrzelecki@cls.edu.pl



Rys. 1. Schemat przyłączania białek posiadających motyw LPXTG do ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich

1. Prekursor białka zawierający na N-końcu peptyd sygnałowy (SP) oraz na C-końcu sygnał sortowania do ściany komórkowej (CWSS) zostaje skierowany do kanału transportującego. CWSS składa się z motywu LPXTG, domeny hydrofobowej oraz dodatnio naładowanego C-końca.
2. Transport polipeptydu następuje za pomocą systemu sekrecji Sec, peptyd sygnałowy zostaje odcięty (SP).
3. Peptyd zostaje zatrzymany na drodze sekrecji i zakotwiczony w błonie komórkowej za pomocą domeny hydrofobowej i dodatnio naładowanego C-końca.
4. Sortaza A (A), enzym związany z błoną komórkową, rozcina wiązanie peptydowe pomiędzy resztami treoniny i glicyny motywu LPXTG przy pomocy aktywnej reszty cysteiny. Utworzony w ten sposób acylo-enzym zostaje zaatakowany przez końcową grupę aminową bocznego łańcucha lipidu II, który jest prekursorem peptydoglikanu (B). W wyniku rozerwania wiązania tioestrowego pomiędzy resztą treoniny a resztą cysteiny następuje regeneracja centrum aktywnego sortazy A.
5. Produkt reakcji katalizowanej przez sortazę A, czyli białko połączone z lipidem II (C) służy jako substrat dla białek wiążących penicylinę (PBP), budujących dojrzałą cząsteczkę peptydoglikanu.
6. Białko zostaje włączone w strukturę ściany komórkowej i trafia na powierzchnię komórki.

mechanizmów początkowej fazy zakażeń powodowanych przez patogenne enterokoki, mogą także otworzyć nowe możliwości leczenia zakażeń powodowanych przez te drobnoustroje. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat białek z motywem LPXTG.

2. Sortazy

U bakterii Gram-dodatnich, które w odróżnieniu od bakterii Gram-ujemnych nie posiadają zewnętrznej błony komórkowej, miejsce zakotwiczenia cząsteczek powierzchniowych stanowi ściana komórkowa, w wielu przypadkach dzięki wytworzeniu kowalencyjnego wiązania z peptydoglikanem [35]. Proces wiązania białka powierzchniowego ze ścianą komórkową rozpoczyna się od syntezy w cytoplazmie jego prekursora, zawierającego położony na N-końcu peptyd sygnałowy (signal peptide, SP) oraz na C-końcu sygnał sortowania do ściany komórkowej (cell wall sorting signal, CWSS), złożony z motywu LPXTG, domeny hydrofobowej oraz krótkiego odcinka końcowego, posiadającego ładunek dodatni. Sekwencja sygnałowa jest rozpoznawana przez czynniki kierujące białko do

kanału transportowego w błonie komórkowej. Następuje transport polipeptydu przez błonę komórkową za pomocą systemu sekrecji Sec, a sekwencja sygnałowa zostaje odcięta [18]. Peptyd zostaje zatrzymany w błonie komórkowej przez domenę hydrofobową oraz wspomniany fragment C-końcowy. Sortaza klasy A, enzym związany z błoną komórkową, posiadający w swoim centrum aktywnym resztę cysteinową, rozcina wiązanie peptydowe pomiędzy resztami treoniny i glicyny wewnątrz motywu LPXTG. Powstały w ten sposób nietrwały acylo-enzym zostaje zaatakowany przez końcową grupę aminową bocznego łańcucha lipidu II, prekursora peptydoglikanu. W wyniku tej reakcji zostaje uwolniona aktywna sortaza, natomiast położona na C-końcu przeciętego polipeptydu reszta treoniny zostaje połączona z bocznym łańcuchem lipidu II. Prekursor peptydoglikanu z przyłączonym białkiem LPXTG staje się substratem dla białek wiążących penicylinę (penicillin binding proteins, PBP), budujących dojrzałą cząsteczkę peptydoglikanu. W ten sposób produkt reakcji katalizowanej przez sortazę A, tzn. białko powierzchniowe połączone z peptydoglikanem zostaje włączone w strukturę ściany komórkowej i umieszczone na powierzchni komórki [14, 35–37]. Model działania sortazy A obrazuje Rys. 1.

Pierwszym scharakteryzowanym białkiem o opisanej powyżej aktywności była sortaza A (SrtA) *S. aureus*, która stała się swego rodzaju wzorcem używanym do poszukiwań jej homologów *in silico* [49]. Na podstawie szczegółowej analizy sekwencji 61 poznanych sortaz wprowadzono ich podział na cztery klasy: A, B, C i D [15]. U bakterii z rodzaju *Enterococcus* wykryto sortazy należące do klas A i C [15]. Klasa A, do której należy wspomniana SrtA *S. aureus*, charakteryzuje się powszechnością występowania wśród szczepów określonego gatunku i odpowiada za zakotwiczenie w ścianie komórkowej większości białek z motywem LPXTG. Zazwyczaj w genomie obecna jest jedna kopia genu kodującego ten enzym, z wyjątkiem *E. faecalis*, w którego genomie wykryto dwa takie geny, przy czym jeden z nich występował u wszystkich badanych izolatów [26], natomiast drugi, kodowany przez plazmid zintegrowany z chromosomem bakteryjnym, wyłącznie w niektórych szczepach [15, 26, 54]. Sortazy klasy C stanowią najliczniejszą grupę, występują jednak mniej powszechnie. Biorą one udział w składaniu fimbrii, a zatem cechuje je wyższa specyficzność względem rozpoznawanych białek [15, 23].

3. Substancja agregująca – AS

Substancja agregująca (aggregation substance, AS), pierwsze opisanie enterokokowe białko powierzchniowe z motywem LPXTG, ze względu na istotny udział w wirulencji *E. faecalis* oraz przekazywaniu genów oporności na antybiotyki jest w dalszym ciągu przedmiotem intensywnych badań. W istocie ta nazwa obejmuje grupę adhezyn o wysokiej homologii [23], związanych z charakterystyczną dla *Enterococcus* rodziną plazmidów indukowanych przez feromony płciowe [7].

Agregacja, w której bierze udział AS, zapewnia ścisły kontakt pomiędzy komórkami dawcy i biorcy w trakcie koniugacji, umożliwiając tym samym transfer plazmidów z wysoką wydajnością. Charakterystyczny jest udział w tym procesie feromonów płciowych, krótkich, hydrofobowych peptydów, których prekursorzy są kodowane przez geny zlokalizowane w chromosomie, i oddziałujących swoiście wobec określonego plazmidu koniugacyjnego. Synteza i transport AS na powierzchnię komórki dawcy jest rezultatem wnikięcia do niej feromonu. Na powierzchni komórek enterokoków występuje tzw. substancja wiążąca (enterococcal binding substance, EBS), która oddziałuje z AS, tworząc agregaty koniugacyjne [3, 8, 30].

Geny najlepiej poznanych białek AS to *asp1*, *asc10* i *asa1* znajdujące się na plazmidach pPD1, pCF10 i pAD1. Adhezyny AS są dobrze konserwowane i np.

białka Asp1, Asc10 i Asa1 są w ponad 90% homologiczne względem siebie [23]. Jedynym zbadanym wyjątkiem jest Asa373, kodowana przez feromonowy plazmid pAM373, znacznie różniąca się sekwencją od pozostałych AS. Mimo to, poza peptydem sygnałowym oraz uniwersalnym motywem LPXTG w sekwencji aminokwasowej białka występują pewne stosunkowo krótkie odcinki homologiczne np. do białka Asa1, które mogą być uniwersalnymi motywami odpowiedzialnymi za adhezję [41]. Brany jest także pod uwagę odmienny mechanizm adhezji do komórki biorcy z uwagi na to, że Asa373 wiązała się z komórkami szczepu laboratoryjnego, pozbawionego aktywnej EBS, specyficznej dla pozostałych AS [41].

W strukturze białka Asc10 oraz innych homologicznych AS zidentyfikowano kilka domen funkcjonalnych. Na N-końcu znajduje się sekwencja sygnałowa, natomiast w C-końcowej części występuje motyw LPXTG rozpoznawany przez sortazę. W procesie łączenia komórki biorcy i dawcy podczas koniugacji zaangażowane są dwie domeny agregujące, rozdzielone regionem zmiennym (30–40% homologii) [78]. Wykazano, że domena agregująca położona bliżej N-końca wiąże kwas lipoteichowy, składnik EBS [75]. W strukturze AS znajdują się także dwa motywy aminokwasowe RGD, które biorą udział w różnego rodzaju reakcjach adhezji, pełniąc rolę ligandu dla zwierzęcych białek powierzchniowych zwanych integrzynami [31, 73]. Badania dotyczące roli regionu zmiennego oraz C-końcowej części AS dały niejednoznaczne wyniki i wciąż jest ona dyskusyjna [40, 74].

Przezwyciężenie trudności w otrzymaniu stabilnego białka AS umożliwiło zarówno jego analizę biochemiczną, jak i dalszą ocenę aktywności *in vivo* [75]. Białka Asc10 oraz Asa1 przyłączają się do elementów macierzy międzykomórkowej (extracellular matrix, ECM), takich jak fibronektyna, trombospondyna, witronektyna i kolagen typu I [62]. Autorzy sugerują kluczową rolę regionu zmiennego w tym procesie. W modelu króliczym wykazano eksperymentalnie, że białko Asc10 bierze udział w zapaleniu wsierdza. To schorzenie związane jest z powstawaniem na zastawkach serca patologicznych zmian zwanych wegetacjami, stanowiących biofilm, a których rozwój prowadzi do uszkodzenia zastawek. Ponadto zaobserwowano znaczne obniżenie zjadliwości mutantów z substytucją jednego aminokwasu w obu sekwencjach RGD, której miarą była masa i rozmiar wegetacji na zastawce aortalnej zwierząt laboratoryjnych [10]. We wcześniejszym eksperymencie podanie rekombinowanego, oczyszczonego N-końcowego fragmentu Asc10 powodowało wzrost poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko temu antygenowi, nie zapewniało jednak przyspieszonego usuwania komórek *E. faecalis* z krwi oraz zahamowania tworzenia wegetacji na

zastawce aortalnej serca w porównaniu z grupą nieimmunizowaną [38]. Badania *in vitro* wykazały, że Asa1 bierze udział w adhezji bakterii do komórek nabłonkowych różnych odcinków jelita [63]. W modelu *in vivo* to białko brało udział w migracji bakterii przez błonę śluzową jelita oraz w ich dalszym rozprzestrzenianiu w organizmie. Zaobserwowano także adhezję Asa1 do komórek kanalików nerkowych *in vitro* [31], nie stwierdzono natomiast udziału Asc10 w kolonizacji przewodu moczowego w modelu mysim [25]. Szereg badań poświęcono interakcjom AS z komórkami układu immunologicznego. Wykazano zależność od Asa1 przyłączanie *E. faecalis* do ludzkich neutrofilów. Odpowiedzialnymi za ten proces regionami są prawdopodobnie sekwencje RGD, ponieważ preinkubacja neutrofilów z syntetycznym peptydem zawierającym sekwencję RGD znacznie obniżała ten rodzaj adhezji [69]. Za pomocą deaktywacji wybranych części na powierzchni neutrofilów z udziałem przeciwciał monoklonalnych wykazano, że białkami, które mogą być przyłączane przez AS są receptory układu dopełniacza CR3, białko integrynowe CD47 oraz selektyna L [73]. Konsekwencją tej interakcji była fagocytoza komórek bakteryjnych, które mimo wyraźnej aktywacji neutrofilów nie ulegały zabiciu [59]. Motywy RGD są również zaangażowane w oddziaływanie z integrynami na powierzchni makrofagów. Komórki *E. faecalis* wykazujące ekspresję AS ujawniały większą zdolność do przeżywania w makrofagach. Uważa się nawet, że makrofagi mogą stanowić dla bakterii rodzaj przenośnika z jelita do węzłów chłonnych [69]. Kolejne badania dotyczące internalizacji i przeżywania komórek *E. faecalis* w makrofagach nie wykazały istotnej roli AS w tym procesie. Stwierdzono, że zdolność ta była uwarunkowana wytwarzaniem pozakomórkowych polisacharydów [2].

Regulacja syntezy Asc10 przez komórkę dawcy jest procesem złożonym, zależnym od stosunku ilościowego w środowisku dwóch peptydów: kodowanej przez geny znajdujące się zarówno w chromosomie komórki biorcy jak i dawcy cząsteczki feromonu cCF10 oraz kodowanej przez gen zlokalizowany na plazmidzie cząsteczki jego inhibitora iCF10. Gdy w środowisku znajdują się tylko komórki dawcy, równowaga tych dwóch peptydów hamuje produkcję Asc10. Ta równowaga może zostać przesunięta na korzyść feromonu przez pojawienie się w bliskim sąsiedztwie wydzielających go komórek biorcy lub też oddziaływanie iCF10 z elementami osocza, kiedy komórka bakterii znajdzie się w krwioobiegu ssaka. Czynniki produkowane przez gospodarza, prawdopodobnie albumina osocza, w sposób selektywny eliminuje lub degradowe iCF10, tym samym umożliwiając cCF10 indukcję syntezy Asc10 [8, 16].

4. Enterokokowe białko powierzchniowe – Esp

W poszukiwaniu nowych, zwiększających wirulencję enterokokowych białek powierzchniowych przebadano częściową sekwencję genomową szczepu MMH594 *E. faecalis*, czynnika etiologicznego groźnych zakażeń szpitalnych. Odnaleziono sekwencję częściowo homologiczną do genów *rib* i *bca*, kodujących białka Rib i antygen C alfa, ważne czynniki zjadliwości *Streptococcus agalactiae* [65]. Gen kodujący homologiczne białko *E. faecalis* nazwano *esp* (enterococcal surface protein). Stwierdzono, że występuje istotny związek pomiędzy posiadaniem genu *esp* i zdolnością do wywoływania infekcji u człowieka przez bakterie tego gatunku [65].

Białko o sekwencji w 90% homologicznej do Esp *E. faecalis* zidentyfikowano u *E. faecium* [61]. Podobnie jak u *E. faecalis* jest ono zlokalizowane na wyspie patogenności (pathogenicity island, PAI), istotnie różniące się jednak pod względem zawartości innych genów kodujących czynniki wirulencji [32]. Obecność genu *esp* w tym obszarze, zarówno u *E. faecalis*, jaki i *E. faecium* jest prawdopodobnie wynikiem horyzontalnego transferu genów między tymi gatunkami [23, 32]. Stwierdzono, że obecność PAI zawierającej gen *esp* jest powszechna wśród przedstawicieli kompleksu klonalnego 17 (CC17), do którego należy większość szczepów *E. faecium* związanych z zakażeniami szpitalnymi, co sugeruje znaczenie Esp dla wywoływania zakażeń przez enterokoki należące do CC17 [77].

Białka Esp *E. faecalis* i *E. faecium* mają masę cząsteczkową ok. 200 kDa, co stawia je na pierwszym miejscu pod względem wielkości wśród poznanych białek enterokokowych. Posiadają N-kończową sekwencję sygnałową, zmienną domenę N-kończową o wielkości ok. 700 reszt aminokwasowych oraz silnie konserwowane sekwencje powtórzone domen A, B i C, których liczba ulega wahaniom w zależności od konkretnego szczepu. W C-końcowej części Esp występują motywy YPKTG lub FPKTG, homologiczne do sekwencji LPXTG, umożliwiające kowalencyjne wiązanie białka ze ścianą komórkową przez sortazę [32, 65].

Zwrócono uwagę na podobieństwo struktury organizacyjnej Esp do białka Bap *S. aureus*, znanego wcześniej jako ważny czynnik biorący udział w tworzeniu biofilmu [12]. Badania aktywności Esp w dużej mierze dotyczą tego zagadnienia. Określenie „biofilm” odnosi się do skupisk komórek bakteryjnych związanych z powierzchnią biotyczną lub abiotyczną i znajdujących się w wytworzonej przez siebie macierzy, złożonej przede wszystkim z polisacharydów i wolnego DNA. Przestrzenne ukształtowanie biofilmu stwarza optymalne warunki dla wymiany materiału genetycznego między bakteriami, a także zwiększa ich oporność na

antybiotyki oraz ewentualną odpowiedź układu immunologicznego gospodarza [13]. Zarówno w przypadku *E. faecalis*, jaki i *E. faecium* potwierdzona została rola Esp w przyłączaniu do powierzchni abiotycznych oraz tworzeniu na nich biofilmu. Na przykładzie Esp *E. faecalis* udowodniono eksperymentalnie, że częścią cząsteczki tego białka odpowiedzialną za tworzenie biofilmu jest domena N-końcowa. Mutant, pozbawiony fragmentu sekwencji tego obszaru, wykazywał znacznie obniżoną zdolność wytwarzania biofilmu w stosunku do szczepu dzikiego, a szczep produkujący Esp zawierające wyłącznie domenę N tworzył biofilm na poziomie zbliżonym do szczepu dzikiego [71].

Kolejne badania dotyczące wpływu różnych czynników środowiska na ekspresję Esp na powierzchni *E. faecium* wykazały, że jest ona najwyższa w temperaturze 37°C i warunkach beztlenowych. Tego rodzaju mechanizm indukujący ekspresję czynników zjadliwości jest często spotykany u bakteryjnych patogenów ssaków, które podobnie jak enterokoki bytują również w środowisku zewnętrznym. Przypuszcza się, że Esp pełni ważną rolę w początkowych fazach infekcji [22], co nie zostało jednak dotąd potwierdzone eksperymentalnie. Badania z użyciem modelu mysiego zarówno dla *E. faecium* jak i *E. faecalis* wykazały, że Esp nie ułatwia kolonizacji jelita ani też translokacji do kręgowych węzłów limfatycznych. Proces ten przebiegał z podobną skutecznością w przypadku szczepów wytwarzających Esp, jak i mutantów nieposiadających odpowiedniego genu [19, 58].

W modelu *in vivo* zbadano również rolę Esp w zakażeniach układu moczowego, powodowanych przez *E. faecalis*. Brak różnic w zmianach histopatologicznych nerek myszy świadczy o tym, że Esp nie jest związane ze zmianami charakterystycznymi dla ostrego zapalenia tych narządów. Tym niemniej, istotnie większa liczba komórek *E. faecalis* została wyizolowana z pęcherza moczowego zwierząt zakażonych szczepem Esp+ w porównaniu z mutantem pozbawionym tego białka, co świadczy o jego ważnej roli w kolonizacji moczowodu [64]. Udowodniona rola Esp w tworzeniu biofilmu może wskazywać na udział tego białka w innych groźnych schorzeniach związanych z występowaniem tej struktury, takich jak zapalenie wsierdza [23].

5. Białka rodziny MSCRAMMs

Przyłączanie komórek bakteryjnych do ECM uważane jest za kluczowy etap w kolonizacji organizmu człowieka. Enterokoki, podobnie jak wiele innych drobnoustrojów, posiadają na swej powierzchni specjalne adhezyny umożliwiające ten proces [79]. Akronim MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) odnosi się do szcze-

gólnej rodziny powierzchniowych białek posiadających motyw LPXTG, odpowiedzialnych za adhezję do ECM. Badacze określili szereg kryteriów, które musi spełnić cząsteczka, aby została zaliczona do MSCRAMMs, obejmujących jej lokalizację na powierzchni komórki bakteryjnej oraz duże powinowactwo i specyficzność wiązania ligandu znajdującego się wśród składników ECM [51]. W wiązaniu tym, opisanym szczegółowo w następnym rozdziale, bierze udział położona w N-końcowej części białka domena A o pofałdowaniu charakterystycznym dla immunoglobulin klasy G.

Pierwszą dobrze scharakteryzowaną adhezyjną enterokoków należącą do MSCRAMMs było białko Ace (adhesin to collagen from *E. faecalis*), odpowiedzialne za przyłączanie *E. faecalis* do kolagenu typu I, kolagenu typu IV, lamininy oraz zębiny, tkanki wchodzącej w skład zęba, zawierającej kolagen typu I [29, 42, 60]. Gen kodujący białko Ace występuje powszechnie wśród izolatów *E. faecalis* różnego pochodzenia [44] oraz wiąże kolagen wydajniej w temperaturze 46°C niż 37°C [42]. Stwierdzono również, że Ace może być rozważane jako składnik szczepionki przeciwko zakażeniom powodowanym przez *E. faecalis*, ponieważ szczury immunizowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko rekombinowanemu białku Ace, wykazywały obniżoną podatność na zapalenie wsierdza powodowane przez *E. faecalis* niż zwierzęta nieimmunizowane [68]. Białko Ace odkryto w wyniku poszukiwań regionów homologicznych do wiążącego kolagen białka Cna *S. aureus* [60], jednego z pierwszych MSCRAMMs odkrytych u bakterii Gram-dodatnich [53]. Ace posiada podobną do Cna strukturę, tzn. następujące po sobie: krótką sekwencję sygnałową, domenę A odpowiedzialną za przyłączanie ligandu w białkach ECM, domenę B składającą się z różnej liczby tandemowych powtórzeń, domenę bogatą w prolinę, zawierającą sekwencję LPXTG, związaną ze ścianą komórkową, hydrofobowy fragment transmembranowy oraz krótki odcinek cytoplazmatyczny [44]. Domena A białek należących do MSCRAMMs jest złożona z dwóch lub większej liczby poddomen, z których każda posiada budowę podobną do przeciwciał IgG.

Ace jest najlepiej scharakteryzowanym, ale nie jedynym białkiem *E. faecalis* posiadającym takie motywy. Wynikiem poszukiwań *in silico* podobnych sekwencji było odkrycie w genomie szczepu V583 szesnastu innych białek posiadających opisaną powyżej strukturę organizacyjną charakterystyczną dla MSCRAMMs [67]. Analiza genomu *E. faecium* w poszukiwaniu potencjalnych MSCRAMMs umożliwiła wytypowanie piętnastu białek tego rodzaju. Jednym z nich było znane już wcześniej białko Acn (adhesin to collagen from *E. faecium*), natomiast dalszym badaniom poddano białko Scm (second collagen adhesin of *E. faecium*) [66].

Acm posiada charakterystyczną dla MSCRAMMs organizację strukturalną oraz szereg cech wskazujących na jego większe pokrewieństwo z białkiem Cna *S. aureus* niż z Ace *E. faecalis*. Po pierwsze, Acm ma wysoką homologię do Cna zarówno w domenie A jak i B, podczas gdy podobieństwo Acm do Ace jest wysokie jedynie dla domeny A. Co więcej, Acm, podobnie jak Cna, przylacza się specyficznie do kolagenu, natomiast Ace także do lamininy. Warty uwagi jest również fakt, że Acm tak samo jak Cna, wykazuje większe powinowactwo do kolagenu typu I niż IV, z kolei dla Ace nie zaobserwowano takiej różnicy [42, 48].

Wykazano zależność pomiędzy miejscem izolacji szczepu *E. faecium* a jego zdolnością do wiązania kolagenu. Większość izolatów pochodzenia klinicznego wiązała kolagen typu I *in vitro*, natomiast żaden z izolatów pozaklinicznych nie wykazywał takiej zdolności. Co ciekawe, we wszystkich 32 badanych szczepach wykryto locus genu *acm*, jednak brak zdolności wiązania kolagenu izolatów pozaklinicznych był ściśle związany z utratą funkcjonalności tego genu na skutek wstawienia sekwencji insercyjnej (IS), delekcji zmieniających fazę odczytu lub też pojawienia się kodonu stop w sekwencji domeny A [48]. Kolejne badania, tym razem na większej i bardziej zróżnicowanej puli szczepów w pełni potwierdziły tę zależność. Większość izolatów wiążących kolagen *in vitro* oraz pochodzących od pacjentów z zapaleniem wsierdza należała do znanego na całym świecie kompleksu klonalnego CC17 *E. faecium*. Co więcej, autorzy zaobserwowali, że możliwe jest spontaniczne, precyzyjne wycięcie IS z pseudogenu *acm* klinicznego szczepu *E. faecium*, co umożliwia ekspresję Acm. W związku z tym Acm uważane jest za jeden z istotnych czynników, które zadecydowały o podniesieniu znaczenia *E. faecium* jako alarmowego patogenu szpitalnego [46].

Scm, trzecia szerzej zbadana adhezyna *E. faecium* należąca do MSCRAMMs, w odróżnieniu od Acm wiąże kolagen typu V oraz fibrynogen. Biorąc pod uwagę zróżnicowanie strukturalne oraz obecność w organizmie różnych typów kolagenu, posiadanie drugiej adhezyny, pozwalającej na przylaczanie tego białka, daje *E. faecium* cenną możliwość dostosowywania się do określonej tkanki [66].

W odróżnieniu od Ace i Scm, których rola w patogenie nie została do tej pory zbadana eksperymentalnie, znaczenie Acm podczas zapalenia wsierdza potwierdzono w modelu *in vivo* z użyciem mutantu z delecją *acm*. W modelu zapalenia wsierdza u szczura stwierdzono, że szczep *E. faecium* pozbawiony genu *acm* w znacznie mniejszym stopniu zasiedlał zastawki serca i powodował ich mniejsze uszkodzenia niż szczep dziki. Dodatkowym potwierdzeniem tego wyniku był podwyższony poziom przeciwciał IgG skierowanych przeciwko domenie A białka Acm u pacjentów ze

zdiagnozowanym zapaleniem wsierdza. Silnie konserwowana struktura Acm oraz fakt produkcji przez organizm człowieka przeciwciał rozpoznających to białko pozwala uważać Acm za interesujący antygen szczepionkowy w leczeniu zapalenia wsierdza [45].

Ostatnio odkrytą adhezyną *E. faecium* zaklasyfikowaną do MSCRAMMs ze względu na posiadaną strukturę jest białko EcbA. Zostało ono wytypowane w trakcie poszukiwań białek zawierających motyw LPXTG, które byłyby charakterystyczne dla związanego z inwazyjnymi zakażeniami szpitalnymi kompleksu klonalnego CC17 [22]. Badaczom nie udało się stworzyć mutantu pozbawionego aktywności genu kodującego to białko z uwagi na występowanie w genomie *E. faecium* drugiego genu homologicznego do *ecbA*, zbadali jednak, że EcbA przylacza się do takich komponentów ECM jak kolagen typu V i fibrynogen. W odróżnieniu od innych znanych, wiążących fibrynogen MSCRAMMs *E. faecium*, EcbA wiąże łańcuchy gamma tej cząsteczki. Stwierdzono również, że jest to jedyna znana adhezyna *E. faecium*, której ekspresja, określona na podstawie poziomu mRNA, zachodzi w wykładniczej fazie wzrostu bakterii, podczas gdy ekspresja pozostałych adhezyn jest stała. Badacze sugerują, że jest to element dostosowujący rodzaj adhezji do określonego typu tkanki [21].

5.1. Mechanizm przylaczania ligandu przez MSCRAMMs

Adhezyny należące do MSCRAMMs cechuje podobieństwo, zarówno w organizacji strukturalnej całego białka, jak i domeny A odpowiedzialnej za przylaczanie do cząsteczek tworzących ECM. Stwierdzono, że żadna ze zbadanych MSCRAMMs nie wykazywała homologii do znanych wcześniej, wiążących kolagen integryn, a także w odróżnieniu od nich nie wymagała dla swej aktywności jonów magnezu [80]. Fakt ten skłonił badaczy do poszukiwania całkiem odmiennego modelu wiązania kolagenu. Prekursorskie badania dotyczące sposobu wiązania elementów ECM przez białko rodziny MSCRAMMs prowadzono dla *S. aureus* [80]. Badania krystalograficzne cząsteczki Cna wykazały, że centralny region jego domeny A jest wystarczający do wiązania kolagenu, ale w porównaniu z całą domeną A wykazuje dziesięciokrotnie mniejsze powinowactwo do tego białka, co wyraźnie wskazało na rolę rejonów flankujących w tym procesie [52]. Wykazano, że domena A białka Cna składa się z trzech poddomen: N1, N2 i N3, a każda z nich ma pofałdowaną budowę podobną do przeciwciał IgG. Tego rodzaju struktura składa się z dwóch przeciwnie ułożonych struktur β oraz dwóch krótkich α -helis [80]. Regionem niezbędnym do wiązania kolagenu jest prawdopodobnie poddomena N2, wykazano także, że białko

rekombinowane złożone z poddomeny N1 i N2 wiązało kolagen z większym powinowactwem niż pełna domena A białka Cna [52, 80]. Acm, podobnie jak Cna posiada trzy poddomeny, Ace składa się z dwóch poddomen N1 oraz N2, natomiast Scm posiada najprawdopodobniej tylko jeden tego typu region. Badania krystalograficzne wykazały, że poddomena N2 Cna oraz Ace posiada prawie identyczne połaśdowanie [43, 52, 56, 66]. Porównanie sekwencji aminokwasowych oraz modelowanie strukturalne regionu N1N2, białek Ace, Cna i Acm ujawniły silne podobieństwo tych białek [48, 60]. Przeprowadzone pomiary krystalograficzne dla domeny A cząsteczki Ace potwierdziły te wyniki, w związku z tym autorzy postulują podobny mechanizm wiązania kolagenu do tego, jaki został opisany szczegółowo dla Cna *S. aureus* [34].

Wiązanie kolagenu przez Cna zachodzi zgodnie z modelem nazwanym obrazowo „Collagen Hug”. Schemat ten opracowano w oparciu o analizę struktury wolnego regionu N1N2 oraz jego kompleksu z potrójną helisą kolagenu, otrzymaną syntetycznie. Na powierzchni jednej z beta-kartek domeny N2 znajduje się płytkie wgłębienie, będące miejscem przyłączania ligandu. Struktura N1N2 występuje w równowadze między konformacją otwartą i zamkniętą, z których tylko konformacja otwarta, zawierająca odsłonięte miejsce „dokowania” kolagenu, jest zdolna do jego wiązania [70]. Przyłączanie rozpoczyna się od wytworzenia słabego wiązania pomiędzy helisą kolagenową a komplementarnym do niej zagłębieniem w poddomenie N2, które jest następnie stabilizowane przez interakcje polarne i hydrofobowe. Następnie poddomena N1 przemieszcza się i wraz z poddomeną N2 blokują potrójną helisę kolagenu, tworząc wokół niej strukturę przypominającą tunel. Końcowy etapem procesu jest wsunięcie się konserwowanego, C-końcowego fragmentu poddomeny N2 w rowek domeny N1, która komplementuje w ten sposób jedną z jej struktur β stabilizując cały kompleks [80].

Pytanie o biologiczne znaczenie opisanego modelu wiązania kolagenu przez białka rodziny MSCRAMMs pozostaje otwarte. Liu i wsp. dyskutując wyniki dotyczące modelu przyłączania białka Ace *E. faecalis* do kolagenu sugerują, że mechanizm ten mógłby mieć przykładowo zastosowanie w sytuacji pojawienia się odsłoniętych i uszkodzonych cząsteczek kolagenu w naruszonej tkance, które mogłyby stanowić miejsce przyłączenia patogenów bakteryjnych wywołujących zakażenia ran [34].

Interesujące jest podobieństwo występujące pomiędzy mechanizmem „Collagen Hug” a „Dock, Lock and Latch” zaproponowanym dla wiązania liniowych cząsteczek, takich białek jak fibrynogen [55]. Dwie adhezyny: Cna *S. aureus*, wiążąca kolagen oraz SdrG *Staphylococcus epidermidis*, łącząca się z łańcuchem

beta fibrynogenu, posiadają bardzo zbliżoną strukturę. Sam mechanizm wiązania białka docelowego zachodzi tak samo, z tą różnicą, że rejon wiążący ligand SdrG znajduje się pomiędzy poddomenami N2 i N3 a nie N1 i N2 jak w przypadku Cna, występuje także różnica w długości fragmentu łączącego te kluczowe dla całego mechanizmu poddomeny. Dla takich białek jak Cna czy Ace, ta część jest dłuższa, pozostawiając więcej miejsca dla „masywniejszych” cząsteczek kolagenu [34]. To porównanie pozwala sądzić, że poszczególne MSCRAMMs wykorzystują podobne elementy struktury (rejonu podobne do IgG), aby dostosować się do konkretnego ligandu.

6. Białko SgrA

Trzecią obok Scm i EcbA adhezyną *E. faecium* przyłączającą fibrynogen jest białko SgrA, które odkryto wraz z EcbA, poszukując wśród izolatów reprezentujących kompleks klonalny CC17 *E. faecium* białek z motywem strukturalnym LPXTG. Schemat struktury SgrA jest podobny do innych związanych ze ścianą komórkową białek powierzchniowych, jednak ze względu na brak regionów podobnych do IgG w domenie A SgrA nie zostało zaklasyfikowane do MSCRAMMs [21]. Gen kodujący białko SgrA zidentyfikowano u wszystkich 40 przebadanych izolatów z CC17, ale tylko w około jednej czwartej (24/91) izolatów spoza tego kompleksu [22]. SgrA jest też jedynym znanym białkiem *E. faecium* wiążącym nidogen, składnik wszystkich błon podstawnych [21]. Badania prowadzone na rekombinowanych białkach SgrA oraz EbcA wykazały, że przyłączają one inne fragmenty cząsteczki fibrynogenu. SgrA wiąże łańcuchy alfa oraz beta, natomiast EcbA łańcuchy gamma. Określenie regionu odpowiadającego za ten proces wymaga jednak dalszych prac [21]. Biorąc pod uwagę występowanie trzech adhezyn *E. faecium* wiążących fibrynogen, mamy do czynienia z zestawem białek działających synergistycznie w tym kierunku, co zwiększa możliwości przeżycia w organizmie gospodarza w sytuacji wystąpienia odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko jednej z adhezyn. Stwierdzono również wysoką zdolność wiązania powierzchni abiotycznych przez SgrA oraz znaczny udział tego białka w tworzeniu biofilmu. Mutant pozbawiony aktywności SgrA wytwarzał znacznie mniej biofilmu, jednak jego wytwarzanie nie zostało całkowicie zahamowane, co autorzy tłumaczą aktywnością innych czynników odpowiedzialnych za ten proces [21].

7. Fimbrie

Wiele gatunków bakterii posiada na powierzchni komórki struktury znane jako fimbrie. Różne typy fimbrii bakterii Gram-ujemnych zostały dokładnie zbadane

i opisane, stwierdzono również, że zależnie od rodzaju mogą pełnić rozmaite funkcje od udziału w transferze DNA i transdukcji fagowej, poprzez tworzenie biofilmu i specyficzny rodzaj ruchu, aż po rolę adhezyn do komórek gospodarza. Typ fimbrii bakterii Gram-ujemnych determinuje także mechanizm ich syntezy, jednak w każdym przypadku zachowana zostaje ogólna zasada: są one tworzone na zasadzie niekowalencyjnej homopolimeryzacji białek głównej podjednostki strukturalnej [57].

Ostatnio fimbrie bakterii Gram-dodatnich są przedmiotem intensywnych badań. Co prawda już w 1968 r. przy użyciu mikroskopu elektronowego zaobserwowano je u bakterii z rodzaju *Corynebacterium* [57], to jednak szczegółowy opis mechanizmu syntezy tych struktur powstał w ostatnim dziesięcioleciu. Organizmem modelowym jest tu *Corynebacterium diphtheriae* [35]. Od tego czasu liczba gatunków bakterii Gram-dodatnich, u których znaleziono geny kodujące fimbrie wzrasta w szybkim tempie, co ma związek z nadzieją na ich wykorzystanie w roli skutecznych antygenów szczepionkowych [57].

Ogromne zainteresowanie fimbriami dotyczy także bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Zgodnie ze wspólnym dla bakterii Gram-dodatnich modelem, geny kodujące elementy strukturalne fimbrii występują w formie operonu. Metodami *in silico* u *E. faecium* odnaleziono cztery tego rodzaju zespoły genów PGC-1, PGC-2, PGC-3 oraz PGC-4, występujące przede wszystkim wśród izolatów wywołujących zakażenia szpitalne [20]. *E. faecalis* posiada natomiast dwa zespoły genów fimbrii: zlokalizowany w chromosomie bakteryjnym operon Ebp (endocarditis- and biofilm-associated pili) oraz znajdujący się na dużym plazmidzie koniugacyjnym operon Bee (biofilm enhancer in enterococcus). Podczas gdy Ebp jest znajdowany powszechnie wśród szczepów *E. faecalis*, obecność Bee stwierdzono u zaledwie 5% zbadanych izolatów. Ostatni z wymienionych loci odkryto w trakcie poszukiwań genów istotnych dla tworzenia biofilmu. W tym celu stworzono bank mutantów insercyjnych szczepu E99, znanego z wysokiego poziomu produkcji biofilmu. Mutant PD101D12, u którego ta zdolność została w 70% zahamowana, posiadał insercję właśnie w Bee [11, 47, 72].

Fimbrie stanowią polimery białek zwanych pilinami. Głównymi pilinami w przypadku *E. faecalis* są EbpC oraz Bee-3 [47, 72], natomiast u *E. faecium* eksperymentalnie zbadano PilA kodowane w PGC-1 oraz PilB kodowane w PGC-3 [20]. W tym samym loci kodowane są także sortazy klasy C, odpowiedzialne za polimeryzację głównej piliny stanowiącej trzon całego włókna i łączenie tej struktury z dwiema podjednostkami dodatkowymi, znajdującymi się podstawy włókna oraz rozmieszczonymi na całej jego długości, takimi jak np. EbpA oraz EbpB u *E. faecalis* [47].

Sortaza klasy C, biorąca udział w składaniu fimbrii ma aktywność transpeptydazy, a więc zasada jej działania jest podobna do wcześniej omówionego ogólnego mechanizmu zakotwiczania białek posiadających motyw LPXTG w peptydoglikanie ściany komórkowej przez sortazę klasy A. Zgodnie z modelem składania fimbrii, potwierdzonym dla wielu bakterii Gram-dodatnich i najprawdopodobniej obejmującym też enterokoki, główna podjednostka strukturalna zawiera wszystkie niezbędne do utworzenia fimbrii elementy: znajdującą się na N-końcu sekwencję sygnałową umożliwiającą transport białka przez błonę komórkową przez system Sec, charakterystyczny dla fimbrii motyw zawierający konserwowaną resztę lizyny, konieczną do polimeryzacji, tzw. sekwencję E-box z silnie konserwowaną resztą kwasu glutaminianowego, prawdopodobnie wymaganym do wbudowywania dodatkowych pilin w strukturę włókna oraz sygnał sortujący do ściany komórkowej, zawierający motyw LPXTG rozpoznawany przez sortazy [23, 27, 35].

Uważa się, że przestrzeń pomiędzy błoną a ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich zapewnia środowisko ochronne dla obróbki potranslacyjnej wydzielanych tam białek. Efektywne składanie i włączanie przetransportowanych podjednostek fimbrii w strukturę ściany komórkowej sugeruje synchronizację zachodzących się w tej przestrzeni procesów transportu białek przez błonę komórkową przez system Sec i aktywności dwóch rodzajów sortaz C i A, a także wytwarzania peptydoglikanu ściany komórkowej z jego prekursora, lipidu II [27].

Sortaza klasy C po rozpoznaniu sygnału sortującego LPXTG głównego monomerycznego białka fimbrii, wydzielonego do przestrzeni peryplazmatycznej, rozcina go pomiędzy resztami treoniny i glicyny, a następnie katalizuje powstawanie wiązania amidowego pomiędzy resztą treoniny motywu LPXTG a resztą konserwowanej lizyny, znajdującą się w charakterystycznym dla pilin motywie sąsiedniej podjednostki fimbrii. Dzięki kolejnym reakcjom transpeptydacji następuje wydłużanie polimeru stanowiącego zasadniczą część fimbrii. Zaobserwowano, że we wbudowywaniu dodatkowych podjednostek bierze udział zarówno obszar zawierający wspomnianą konserwowaną resztę lizyny jak i tzw. E-box z konserwowaną resztą kwasu glutaminianowego. Proces polimeryzacji fimbrii jest ograniczony przez dostępność głównej podjednostki, a jej nadekspresja skutkuje znacznym wydłużeniem całej struktury. Ostatni etap syntezy stanowi połączenie gotowej fimbrii z bocznym łańcuchem prekursora peptydoglikanu przy pomocy sortazy klasy A. Ten klasyczny model uzyskany przede wszystkim na podstawie badań przeprowadzonych dla *C. diphtheriae* i wzbogacony o wyniki uzyskane dla innych bakterii Gram-dodatnich jest wciąż udoskonalany. Ostatnie badania wykazały, że

sygnałem do zakończenia polimeryzacji zasadniczej części fimbrii jest włączenie w jej strukturę określonej podjednostki dodatkowej za pomocą sortazy klasy A [23, 27, 35].

Najnowsze badania przeprowadzone dla *E. faecalis* potwierdzają tezę o przestrzennym skojarzeniu transportu pilin i ich dalszej obróbki przez sortazy. Udowodniono, że dodatnio naładowany, C-końcowy fragment białka sortazy klasy C, otaczający obszar transmembranowy, jest odpowiedzialny za właściwą lokalizację tego enzymu. Mutacje wprowadzone w tym motywie powodowały brak prawidłowego zatrzymywania sortazy C w błonie komórkowej, zaburzenie przestrzennej synchronizacji transportu pilin oraz ich obróbki przez enzym sortujący, a tym samym upośledzenie produkcji fimbrii [28].

Biosynteza trzech pilin EbpA, EbpB oraz EbpC, kodowanych w operonie *E. faecalis* jest uzależniona od produktu genu regulatorowego *ebpR*, znajdującego się w tym samym locus. Delecja w tym rejonie powodowała upośledzenie ekspresji pilin, zmniejszoną syntezę fimbrii, a w konsekwencji znaczne zmniejszenie wytwarzania biofilmu [4]. Fimbrie *E. faecalis* i *E. faecium* mają istotny udział w tworzeniu tej struktury, co wykazano eksperymentalnie przy użyciu mutantów delecyjnych oraz transpozonowych genów *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* oraz *srtC* [47].

Badania przy użyciu szczurzego modelu infekcji wewnątrznaczyniowej oraz mysiego modelu infekcji przewodu moczowego wykazały, że fimbrie dają dzielnemu szczepowi *E. faecalis* OG1RF znaczną przewagę nad pozbawionymi ich mutantami [6, 26]. Duże zainteresowanie budzi także stwierdzenie podwyższonego miana przeciwciał skierowanych przeciwko fimbriom w surowicach pobranych od pacjentów z zapaleniem wsierdza [67].

Prowadzono także eksperymenty w celu określenia czynników fizycznych wpływających na ekspresję enterokokowych fimbrii. Dwa odrębne typy fimbrii: PilA oraz PilB, wytwarzane jednocześnie przez *E. faecium*, wykazały wysoki poziom ekspresji u bakterii rosnących w temperaturze 37°C w odróżnieniu od hodowanych w temperaturze 21°C, u których w ogóle nie zaobserwowano tych struktur, a jedynie związane ze ścianą komórkową białka głównej podjednostki. Autorzy wnioskuje, że czynnikiem regulującym składanie fimbrii jest temperatura, a jej wzrost do ok. 37°C związany np. z przeniesieniem *E. faecium* na powierzchnię skóry pacjenta jest sygnałem do rozpoczęcia wytwarzania tych struktur, co umożliwia ścisły kontakt z tkankami gospodarza, kolonizację a następnie zakażenie [20].

Badano również wpływ obecności dwutlenku węgla oraz anionów wodorowęglanowych na regulację ekspresji operonu *ebp* *E. faecalis*. Czynnikiem regulatorowy

EbpR wykazuje homologię do szerszej rodziny regulatorów aktywowanych przez obecność $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Anion wodorowęglanowy jest znany jako czynnik wydzielany przez organizm człowieka do światła dwunastnicy w celach ochronnych, co może być sygnałem dla *E. faecalis* do produkcji adhezyn, koniecznych do kolonizacji nowego środowiska [5].

8. Podsumowanie

Wzrastający poziom oporności na antybiotyki wśród bakterii rodzaju *Enterococcus* zmusza do poszukiwania nowych metod leczenia powodowanych przez nie schorzeń. Enterokoki wytwarzają szeroką gamę czynników odpowiadających za oddziaływanie z gospodarzem, wśród których białka powierzchniowe z charakterystycznym motywem LPXTG są szczególnie istotne ze względu na liczną funkcję, jakie pełnią w trakcie zakażenia. Biorą także udział w skutecznym przyłączaniu do powierzchni abiotycznych oraz tworzeniu na nich biofilmu, pozwalając na zasiedlanie powierzchni abiotycznych. Ekspresja wielu białek z tej grupy jest cechą odróżniającą enterokoki będące groźnymi patogenami szpitalnymi od tych stanowiących naturalną mikroflorę jelita. Z tego względu są to niezwykle interesujące potencjalne antygeny szczepionkowe. Badania dotyczące odpowiedzi immunologicznej na białka enterokokowe są jednak mniej zaawansowane w porównaniu z badaniami dotyczącymi innych patogenów z grupy bakterii Gram-dodatnich, takimi jak *Streptococcus pneumoniae* czy *Streptococcus pyogenes* [17, 39]. Wzrastające zainteresowanie czynnikami zjadliwości enterokoków, przejawiające się m.in. wciąż powiększającą się liczbą zsekwencjonowanych genomów *E. faecium* oraz *E. faecalis* [23, 50] pozwala sądzić, że na wiele pozostających w tej dziedzinie pytań uzyskamy odpowiedź w niedalekiej przyszłości.

Piśmiennictwo

1. Arias C.A., Murray B.E.: Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**, 637–655 (2008)
2. Baldassarri L., Bertuccini L., Ammendolia M.G., Cocconcelli P., Arciola C.R., Montanaro L., Creti R., Orefici G.: Receptor-mediated endocytosis of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* by rat peritoneal macrophages. *Indian J. Med. Res.* **119** Suppl., 131–135 (2004)
3. Bensing B.A., Dunny G.M.: Cloning and molecular analysis of genes affecting expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregate formation in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **175**, 7421–7429 (1993)
4. Bourgonne A., Singh K.V., Fox K.A., Pflughoeft K.J., Murray B.E., Garsin D.A.: EbpR is important for biofilm

- formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (*ebpABC*) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.* **189**, 6490–6493 (2007)
5. Bourgogne A., Thomson L.C., Murray B.E.: Bicarbonate enhances expression of the endocarditis and biofilm associated pilus locus, *ebpR-ebpABC*, in *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol.* **10**, 1–13 (2010)
 6. Budzik J.M., Schneewind O.: Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. *J. Clin. Invest.* **116**, 2582–2584 (2006)
 7. Chandler J.R., Dunny G.M.: Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. *Peptides*, **25**, 1377–1388 (2004)
 8. Chandler J.R., Hirt H., Dunny G.M.: A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15617–15622 (2005)
 9. Chang S., Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1342–1347 (2003)
 10. Chuang O.N., Schlievert P.M., Wells C.L., Manias D.A., Tripp T.J., Dunny G.M.: Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infect. Immun.* **77**, 539–548 (2009)
 11. Cobo Molinos A., Abriouel H., Omar N.B., Lopez R.L., Galvez A.: Detection of *ebp* (endocarditis-and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 123–126 (2008)
 12. Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penades J.R.: Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**, 2888–2896 (2001)
 13. Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167–193 (2002)
 14. Dramsi S., Magnet S., Davison S., Arthur M.: Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 307–320 (2008)
 15. Dramsi S., Trieu-Cuot P., Bierre H.: Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res. Microbiol.* **156**, 289–297 (2005)
 16. Dunny G.M.: The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1185–1193 (2007)
 17. Gianfaldoni C., Censini S., Hilleringmann M., Moschioni M., Facciotti C., Pansegrau W., Masignani V., Covacci A., Rappuoli R., Barocchi M.A., Ruggiero P.: *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* **75**, 1059–1062 (2007)
 18. Golec K., Stachowiak R., Jopek K., Bielecki J.: Systemy sekrecyjne *Bacillus subtilis*. *Post. Mikrobiol.* **40**, 3–13 (2010)
 19. Heikens E., Leendertse M., Wijnands L.M., van Luit-Asbroek M., Bonten M.J., van der Poll T., Willems R.J.: Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiol.* **9**, 1–7 (2009)
 20. Hendrickx A.P., Bonten M.J., van Luit-Asbroek M., Schapendonk C.M., Kragten A.H., Willems R.J.: Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology*, **154**, 3212–3223 (2008)
 21. Hendrickx A.P., van Luit-Asbroek M., Schapendonk C.M., van Wamel W.J., Braat J.C., Wijnands L.M., Bonten M.J., Willems R.J.: SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* **77**, 5097–5106 (2009)
 22. Hendrickx A.P., van Wamel W.J., Posthuma G., Bonten M.J., Willems R.J.: Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates. *J. Bacteriol.* **189**, 8321–8332 (2007)
 23. Hendrickx A.P., Willems R.J., Bonten M.J., van Schaik W.: LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* **17**, 423–430 (2009)
 24. Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S.: Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 462–478 (1994)
 25. Johnson J.R., Clabots C., Hirt H., Waters C., Dunny G.: Enterococcal aggregation substance and binding substance are not major contributors to urinary tract colonization by *Enterococcus faecalis* in a mouse model of ascending unobstructed urinary tract infection. *Infect. Immun.* **72**, 2445–2448 (2004)
 26. Kemp K.D., Singh K.V., Nallapareddy S.R., Murray B.E.: Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *bps* (*srtC*), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infect. Immun.* **75**, 5399–5404 (2007)
 27. Kline K.A., Dodson K.W., Caparon M.G., Hultgren S.J.: A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol.* **18**, 224–232
 28. Kline K.A., Kau A.L., Chen S.L., Lim A., Pinkner J.S., Rosch J., Nallapareddy S.R., Murray B.E., Henriques-Normark B., Beatty W., Caparon M.G., Hultgren S.J.: Mechanism for sortase localization and the role of sortase localization in efficient pilus assembly in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **191**, 3237–3247 (2009)
 29. Kowalski W.J., Kasper E.L., Hatton J.F., Murray B.E., Nallapareddy S.R., Gillespie M.J.: *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J. Endod.* **32**, 634–637 (2006)
 30. Kozłowicz B.K., Dworkin M., Dunny G.M.: Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 141–147 (2006)
 31. Kreft B., Marre R., Schramm U., Wirth R.: Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* **60**, 25–30 (1992)
 32. Leavis H., Top J., Shankar N., Borgen K., Bonten M., van Embden J., Willems R.J.: A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* **186**, 672–682 (2004)
 33. Lentino J.R., Narita M., Yu V.L.: New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 3–15 (2008)
 34. Liu Q., Ponnuraj K., Xu Y., Ganesh V.K., Sillanpaa J., Murray B.E., Narayana S.V., Hook M.: The *Enterococcus faecalis* MSCRAMM ACE binds its ligand by the Collagen Hug model. *J. Biol. Chem.* **282**, 19629–19637 (2007)
 35. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H.: Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* **16**, 33–40 (2008)

36. Marraffini L.A., Dedent A.C., Schneewind O.: Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 192–221 (2006)
37. Mazmanian S.K., Ton-That H., Schneewind O.: Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **40**, 1049–1057 (2001)
38. McCormick J.K., Hirt H., Waters C.M., Tripp T.J., Dunny G.M., Schlievert P.M.: Antibodies to a surface-exposed, N-terminal domain of aggregation substance are not protective in the rabbit model of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Infect. Immun.* **69**, 3305–3314 (2001)
39. Mora M., Bensi G., Capo S., Falugi F., Zingaretti C., Manetti A.G., Maggi T., Taddei A.R., Grandi G., Telford J.L.: Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15641–15646 (2005)
40. Muscholl-Silberhorn A.: Analysis of the clumping-mediating domain(s) of sex pheromone plasmid pAD1-encoded aggregation substance. *Eur. J. Biochem.* **258**, 515–520 (1998)
41. Muscholl-Silberhorn A.: Cloning and functional analysis of Asa373, a novel adhesin unrelated to the other sex pheromone plasmid-encoded aggregation substances of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **34**, 620–630 (1999)
42. Nallapareddy S.R., Qin X., Weinstock G.M., Hook M., Murray B.E.: *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* **68**, 5218–5224 (2000)
43. Nallapareddy S.R., Sillanpaa J., Ganesh V.K., Hook M., Murray B.E.: Inhibition of *Enterococcus faecium* adherence to collagen by antibodies against high-affinity binding subdomains of Acm. *Infect. Immun.* **75**, 3192–3196 (2007)
44. Nallapareddy S.R., Singh K.V., Duh R.W., Weinstock G.M., Murray B.E.: Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. *Infect. Immun.* **68**, 5210–5217 (2000)
45. Nallapareddy S.R., Singh K.V., Murray B.E.: Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **76**, 4120–4128 (2008)
46. Nallapareddy S.R., Singh K.V., Okhuysen P.C., Murray B.E.: A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect. Immun.* **76**, 4110–4119 (2008)
47. Nallapareddy S.R., Singh K.V., Sillanpaa J., Garsin D.A., Hook M., Erlandsen S.L., Murray B.E.: Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* **116**, 2799–2807 (2006)
48. Nallapareddy S.R., Weinstock G.M., Murray B.E.: Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol. Microbiol.* **47**, 1733–1747 (2003)
49. Pallen M.J., Lam A.C., Antonio M., Dunbar K.: An embarrassment of sortases – a richness of substrates? *Trends Microbiol.* **9**, 97–102 (2001)
50. Palmer K.L., Carniol K., Manson J.M., Heiman D., Shea T., Young S., Zeng Q., Gevers D., Feldgarden M., Birren B., Gilmore M.S.: High-quality draft genome sequences of 28 *Enterococcus* sp. isolates. *J. Bacteriol.* **192**, 2469–2470 (2010)
51. Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Hook M.: MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 585–617 (1994)
52. Patti J.M., Boles J.O., Hook M.: Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from *Staphylococcus aureus* *Biochemistry*, **32**, 11428–11435 (1993)
53. Patti J.M., Jonsson H., Guss B., Switalski L.M., Wiberg K., Lindberg M., Hook M.: Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J. Biol. Chem.* **267**, 4766–4772 (1992)
54. Paulsen I.T., Banerjee L., Myers G.S., Nelson K.E., Seshadri R., Read T.D., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Heidelberg J.F., Tettelin H., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L., Beanan M., Daugherty S., DeBoy R.T., Durkin S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., Vamathevan J., Tran B., Upton J., Hansen T., Shetty J., Khouri H., Utterback T., Radune D., Ketchum K.A., Dougherty B.A., Fraser C.M.: Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, **299**, 2071–2074 (2003)
55. Ponnuraj K., Bowden M.G., Davis S., Gurusiddappa S., Moore D., Choe D., Xu Y., Hook M., Narayana S.V.: A „dock, lock, and latch” structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell*, **115**, 217–228 (2003)
56. Ponnuraj K., Narayana S.V.: Crystal structure of ACE19, the collagen binding subdomain of *Enterococcus faecalis* surface protein ACE. *Proteins*, **69**, 199–203 (2007)
57. Proft T., Baker E.N.: Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 613–635 (2009)
58. Pultz N.J., Shankar N., Baghdayan A.S., Donskey C.J.: Enterococcal surface protein Esp does not facilitate intestinal colonization or translocation of *Enterococcus faecalis* in clindamycin-treated mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 217–219 (2005)
59. Rakita R.M., Vanek N.N., Jacques-Palaz K., Mee M., Mariscalco M.M., Dunny G.M., Snuggs M., Van Winkle W.B., Simon S.I.: *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect. Immun.* **67**, 6067–6075 (1999)
60. Rich R.L., Kreikemeyer B., Owens R.T., LaBrenz S., Narayana S.V., Weinstock G.M., Murray B.E., Hook M.: Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26939–26945 (1999)
61. Routsis C., Platsouka E., Willems R.J., Bonten M.J., Paniara O., Saroglou G., Roussos C.: Detection of enterococcal surface protein gene (esp) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5742–5746 (2003)
62. Rozdzinski E., Marre R., Susa M., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A.: Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb. Pathog.* **30**, 211–220 (2001)
63. Sartingen S., Rozdzinski E., Muscholl-Silberhorn A., Marre R.: Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* **68**, 6044–6047 (2000)
64. Shankar N., Lockett C.V., Baghdayan A.S., Drachenberg C., Gilmore M.S., Johnson D.E.: Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **69**, 4366–4372 (2001)

65. Shankar V., Baghdayan A.S., Huycke M.M., Lindahl G., Gilmore M.S.: Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* **67**, 193–200 (1999)
66. Sillanpaa J., Nallapareddy S.R., Prakash V.P., Qin X., Hook M., Weinstock G.M., Murray B.E.: Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology*, **154**, 3199–3211 (2008)
67. Sillanpaa J., Xu Y., Nallapareddy S.R., Murray B.E., Hook M.: A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, **150**, 2069–2078 (2004)
68. Singh K.V., Nallapareddy S.R., Sillanpaa J., Murray B.E.: Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathog.* **6**, 1–13 (2010)
69. Sussmuth S.D., Muscholl-Silberhorn A., Wirth R., Susa M., Marre R., Rozdzinski E.: Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect. Immun.* **68**, 4900–4906 (2000)
70. Symersky J., Patti J.M., Carson M., House-Pompeo K., Teale M., Moore D., Jin L., Schneider A., DeLucas L.J., Hook M., Narayana S.V.: Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 833–838 (1997)
71. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N.: The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **187**, 6213–6222 (2005)
72. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N.: Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **188**, 2063–2072 (2006)
73. Vanek N.N., Simon S.I., Jacques-Palaz K., Mariscalco M.M., Dunny G.M., Rakita R.M.: *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**, 49–60 (1999)
74. Waters C.M., Dunny G.M.: Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *J. Bacteriol.* **183**, 5659–5667 (2001)
75. Waters C.M., Hirt H., McCormick J.K., Schlievert P.M., Wells C.L., Dunny G.M.: An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Mol. Microbiol.* **52**, 1159–1171 (2004)
76. Werner G., Coque T.M., Hammerum A.M., Hope R., Hryniewicz W., Johnson A., Klare I., Kristinsson K.G., Leclercq R., Lester C.H., Lillie M., Novais C., Olsson-Liljequist B., Peixe L.V., Sadowy E., Simonsen G.S., Top J., Vuopio-Varkila J., Willems R.J., Witte W., Woodford N.: Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro. Surveill.* **13**, 1–11 (2008)
77. Willems R.J., Top J., van Santen M., Robinson D.A., Coque T.M., Baquero F., Grundmann H., Bonten M.J.: Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 821–828 (2005)
78. Wirth R.: The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism? *Eur. J. Biochem.* **222**, 235–246 (1994)
79. Zareba T.W., Pascu C., Hryniewicz W., Wadstrom T.: Binding of enterococci to extracellular matrix proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**, 721–723 (1997)
80. Zong Y., Xu Y., Liang X., Keene D.R., Hook A., Gurusiddappa S., Hook M., Narayana S.V.: A «Collagen Hug» model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J.* **24**, 4224–4236 (2005)

Podziękowania

Niniejsza publikacja została przygotowana w ramach projektu „Approaches to Control Multiresistant Enterococci (ACE): studies on molecular ecology, horizontal gene transfer, fitness and prevention” Szóstego Programu Ramowego Unii Europejskiej, nr kontraktu LSHE-CT-2007-037410.