

Received: 2014.12.08
Accepted: 2015.07.27
Published: 2015.09.08

Struktura i znaczenie wspólnego enterobakteryjnego antygeny (ECA)

The structure and significance of enterobacterial common antigen (ECA)

Tomasz Kasper Goździewicz^{1,2*}, Jolanta Łukasiewicz^{1**}, Czesław Ługowski^{1,3**}

¹ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

² Wrocławskie Centrum Badań EIT+

³ Uniwersytet Opolski

Streszczenie

Wspólny enterobakteryjny antygen (Enterobacterial Common Antigen, ECA) jest powierzchniowym antygenem cukrowym obecnym u niemal wszystkich Gram-ujemnych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Pochodzenie ECA wydaje się związane z lipopolisacharydem (LPS, endotoksyna), na co wskazują wspólne szlaki biosyntezy obu antygenów. ECA występuje w trzech postaciach: liniowego polimeru związanego kowalencyjnie z fosfatydyloglicerolem (ECA_{PG}), zaktwowanym w błonie zewnętrznej ściany komórkowej, postaci cyklicznej (ECA_{CYC}) zbudowanej z 4-6 podjednostek, umiejscowionej w peryplazmie oraz z liniowego polimeru połączonego kowalencyjnie z oligocukrem rdzenia LPS (ECA_{LPS}). Niezależnie od postaci poli- i oligosacharydy ECA są zbudowane z powtarzających się biologicznych trójczukrowych podjednostek: $\rightarrow 3$ - α -D-Fucp4NAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-ManpNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow), gdzie Fucp4NAc oznacza 4-acetylamido-2,4-dideoksygalaktozę, ManpNAc – kwas N-acetylomannozaminouronowy, GlcpNAc – N-acetyloglukozaminę. W przypadku ECA_{PG} i ECA_{LPS} identyfikowano cząsteczki zawierające jedną podjednostkę, a ich analiza strukturalna wskazała na Fucp4NAc jako cukier terminalny. Szczegółowe badania wykazały jego obecność u niemal wszystkich gatunków enterobakterii, z wyjątkiem pojedynczych przypadków, takich jak *Erwinia chrysantemii*. Obecność antygeny ECA wykazano również u rodzaju *Plesiomonas* należącego wówczas do rodziny *Vibrionaceae* [4] oraz rodzaju *Yersinia* [36] należącego do *Pasteurellae*, co było jednym z powodów zmiany taksonomii i zaliczenia ich do rodziny *Enterobacteriaceae*. Funkcja ECA nie jest dokładnie poznana, jednak dotychczasowe badania wskazują m.in. na jego znaczenie w oporności komórki bakteryjnej na warunki środowiskowe, takie jak sole kwasów żółciowych w przewodzie pokarmowym człowieka. Ważna wydaje się immunogenność tego antygeny, ponieważ zdolność do wytwarzania swoistych przeciwciał dotyczy tylko nielicznych, szorstkich szczepów Gram-ujemnych bakterii, takich jak *Shigella sonnei* fazy II, *Escherichia coli* R1, R2, R4 i K-12, czy *Yersinia enterocolitica* O:3 i jest najprawdopodobniej skutkiem obecności ECA_{LPS} . Dowodu na istnienie tego połączenia dostarczyły analizy strukturalne antygenów powierzchniowych *S. sonnei* fazy II.

Słowa kluczowe: Wspólny enterobakteryjny antygen • ECA • lipopolisacharyd • *Shigella sonnei* • sepsa

* Publikacja współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

** Publikacja współfinansowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu BioMed - „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” (POIG.01.01.02-02-003/08) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

Summary

The enterobacterial common antigen (ECA) is a carbohydrate-derived cell surface antigen present in all Gram-negative bacteria belonging to Enterobacteriaceae family. Biosynthetic pathways shared by ECA and LPS (endotoxin) suggest close connections between these antigens. ECA occurs in three different forms: a phosphatidyl-linked linear polysaccharide anchored on the cell surface (ECA_{PG}), a cyclic form built of 4-6 repeating units localized in the periplasm (ECA_{CYC}) and as a linear polysaccharide covalently linked to LPS core oligosaccharide (ECA_{LPS}). Regardless of ECA form, poly- and oligosaccharides of ECA consist of the biological trisaccharide repeating units: →3)-α-D-Fucp4NAc-(1→4)-β-D-ManpNAC-(1→4)-α-D-GlcpNAC-(1→, where Fucp4NAc refers to 4-acetamido-2,4-dideoxygalactose, ManpNAC to N-acetyl-mannosaminuronic acid and GlcpNAC to N-acetylglucosamine. ECA_{PG} and ECA_{LPS} consisting of one unit with Fucp4NAc as a terminal sugar were also identified. The number of the studies shows its occurrence in all members of enteric bacteria with a few exceptions such as *Erwinia chrysanthemi*. The presence of ECA was also shown for such genera as *Plesiomonas* [4] and *Yersinia* [36], previously belonging to the Vibrionaceae and Pasteurellaceae families, respectively. It was one of the reasons to include these two taxa in the Enterobacteriaceae family. The function of ECA is not fully understood, but it was reported that its occurrence is important in resistance of bacterial cells to environmental conditions, such as bile salts in the human digestive tract. The immunogenicity of ECA seems very interesting in the fact that only sparse rough Gram-negative strains, such as *Shigella sonnei* phase II, *Escherichia coli* R1, R2, R4, K-12, and *Yersinia enterocolitica* O:3 are able to induce the production of specific anti-ECA antibodies. It is the effect of the ECA_{LPS}, and the evidence for the existence of such covalent linkage was provided by structural analysis of *S. sonnei* surface antigens.

Key words: enterobacterial common antigen • ECA • lipopolysaccharide • LPS • *Shigella sonnei* • sepsis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1168374>

Word count: 4189
Tables: –
Figures: 1
References: 56

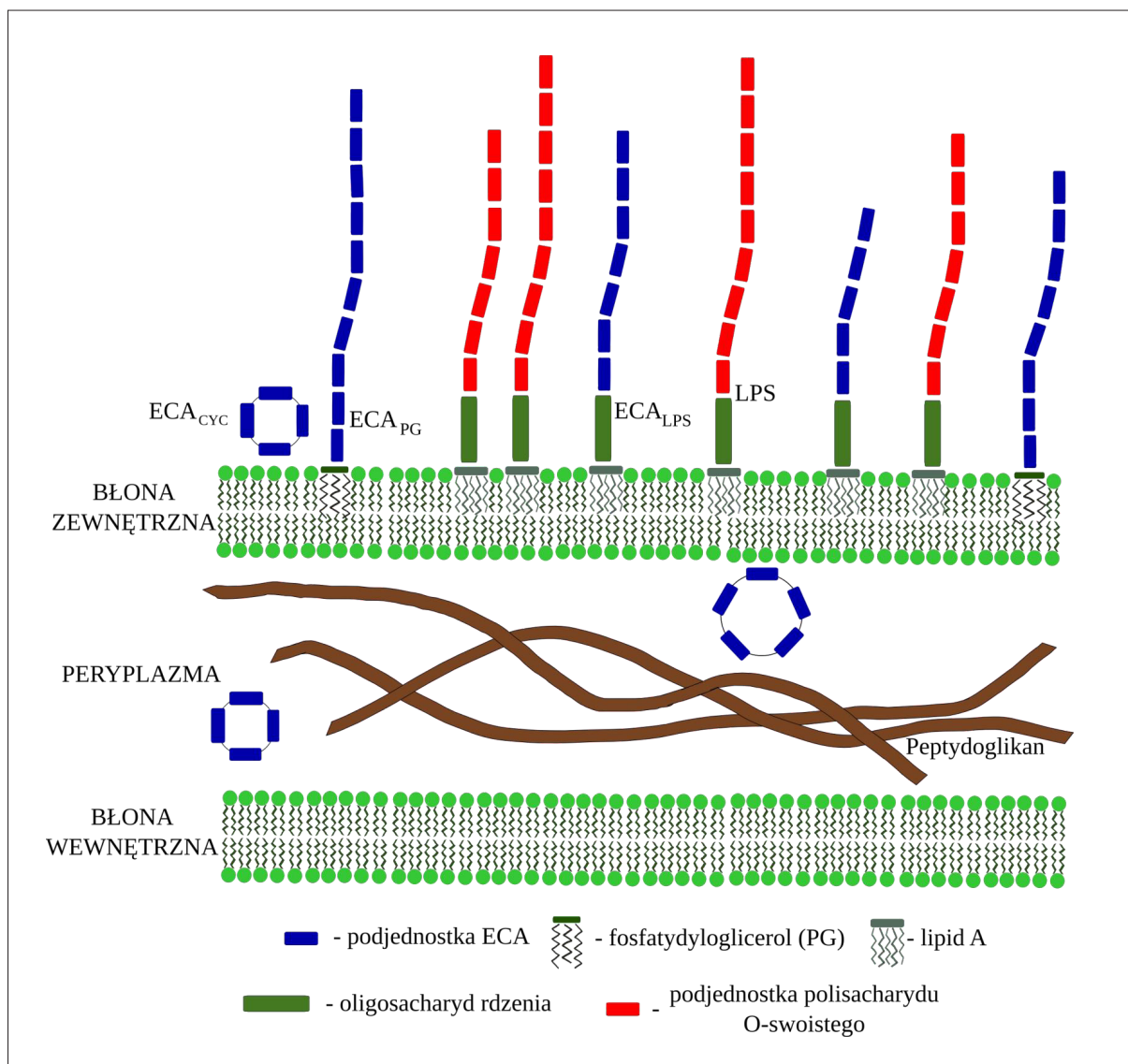
Adres autora: mgr Tomasz Goździewicz, Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: tomasz.gozdziewicz@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **DOC** – deoksycholan; **ECA** – wspólny enterobakteryjny antygen; **ECA_{CYC}** – cykliczna forma ECA; **ECA_{LPS}** – liniowy polimer ECA połączony kowalencyjnie z LPS; **ECA_{PG}** – liniowy polimer ECA połączony kowalencyjnie z fosfatydyloglicerolem; **FAB** – jonizacja szybkimi atomami; **GC-MS** – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas; **IgM** – immunoglobulina M; **Kdo** – kwas 3-deoksy-D-manno-oktulozonowy; **LOS** – lipooligosacharyd, **LPS** – lipopolisacharyd, endotoksyna; **NMR** – magnetyczny rezonans jądrowy; **PCP** – mieszanina fenol/chloroform/eter naftowy; **PG** – fosfatydyloglicerol; **TDP** – difosforan tymidyny; **UDP** – difosforan urydyny

ODKRYCIE ANTYGENU ECA

Wspólny enterobakteryjny antygen (ECA) został odkryty w latach 60 XX w. przez Calvina M. Kunina podczas badań nad zakażeniami układu moczowego wywoływanymi przez pałeczki *Escherichia coli* [28]. Kunin i wsp. opisali wówczas reakcje krzyżowe, obserwowane w teście biernej

hemaglutynacji, między poliklonalną surowicą króliczą skierowaną przeciwko szorstkim bakteriom *E. coli* O14 a ludzkimi erytrocytami opłaszczonymi nieoczyszczonymi preparatami lipopolisacharydów (LPS, endotoksyna) wyizolowanymi od 126 szczepów *E. coli* różniących się serotypem O, czyli strukturą LPS. Preparatami LPS były frakcje PBS znad osadu termicznie inaktywowanych bak-



Ryc. 1. Formy antygeny ECA. Przedstawiono schematyczną budowę ściany komórkowej Gram-ujemnych bakterii oraz zaznaczono formy występowania antygeny ECA: ECA_{CYC} – forma cykliczna zlokalizowana w przestrzeni peryplazmatycznej oraz na powierzchni komórki; ECA_{PG} – forma związana z fosfatydyloglicerolem obecna na powierzchni komórki; ECA_{LPS} – forma immunogenna związana z lipopolisacharydem.

terii. Reakcje te zanikały po inkubacji surowicy anty-*E. coli* O14 z preparatami LPS uzyskanym z dowolnego szczepu *E. coli*. Podobne, choć słabsze reakcje krzyżowe obserwowano także dla surowic anty-*E. coli* O56 i O144. W doświadczeniu Kunin, oprócz wykazania obecności wspólnego antygeny dla *Enterobacteriaceae*, wykazał również, że antygen ten musi występować w dwóch postaciach: immunogennej – stymulującej wytwarzanie swoistych przeciwciał w wyniku immunizacji zabitymi komórkami bakteryjnymi oraz nieimmunogennej – haptenu zdolnego jedynie do adsorpcji przeciwciał z surowic skierowanych przeciw szczepowi ECA-immunogennemu. Przez wiele lat przyjęło się określać nowo odkryty antygen mianem „antygeny Kunina”. Erythrocyty opłaszczone surowymi preparatami LPS reagowały silniej z surowicą przeciwko ECA od opłaszczonych oczyszczonymi preparatami. Su-

gerowało to, że ECA może być raczej zanieczyszczeniem niż integralnym składnikiem LPS, głównego antygeny powierzchniowego i czynnika wirulencji Gram-ujemnych bakterii. LPS jest amfifilową cząsteczką zbudowaną z trzech głównych regionów: polisacharydu O-swoistego składającego się z powtarzających się cukrowych podjednostek, oligosacharydu rdzenia zbudowanego z kilku do kilkunastu reszt cukrowych oraz lipidu A kotwiczącego całą cząsteczkę w błonie zewnętrznej ściany komórkowej (ryc. 1). W odniesieniu do Gram-ujemnych bakterii, gładkie szczepy (smooth, S) syntezują LPS zawierający wszystkie wymienione regiony, natomiast szczepy szorstkie (rough, R) syntezują lipooligosacharydy (LOS) zbudowane jedynie z lipidu A podstawionego kompletnym lub niekompletnym oligocukrem rdzenia [35,49]. Badania nad immunogennością niektórych gatunków bakterii wyka-

zały istnienie szczepów ECA-immunogennych również wśród innych gatunków enterobakterii, m.in. *Shigella sonnei* [53] i *Yersinia enterocolitica*. ECA-immunogenne okazały się jedynie szczepy szorstkie, tzn. pozbawione antygeny O-swoistego i zawierające kompletny oligocukier rdzenia, takie jak *E. coli* R1, R4 i K-12 [26] oraz *E. coli* R2 i R3 [8], szorstkie mutanty *Y. enterocolitica* O:3 (oligocukier rdzenia typu Ra) [48] czy *S. sonnei* fazy II [53], która w odróżnieniu od *S. sonnei* fazy I syntezuje LOS pozbawiony polisacharydu O-swoistego [13]. Obserwacje potwierdziło odkrycie, że z pozoru gładki szczep *E. coli* O14 jest w rzeczywistości szczepem typu szorstkiego syntezującym LOS zawierający oligosacharyd rdzenia typu R4, a właściwość ta jest maskowana przez antygen kapsularny K. Inkubując bakterie z przeciwciałami anti-ECA skoniugowanymi z ferrytyną i stosując mikroskopię elektronową, Rinno i wsp. potwierdzili lokalizację antygeny ECA w błonie zewnętrznej komórki bakteryjnej (ryc. 1), a także wykazali, że obecność innych antygenów powierzchniowych, takich jak polisacharyd O-swoisty czy antygen kapsularny K, ogranicza dostępność przeciwciał skierowanych przeciwko ECA [52].

BADANIA STRUKTURALNE ECA

Badania strukturalne ECA i próby jego izolacji znacznie utrudniała jego zdolność do niekowalencyjnego wiązania do różnych składników komórkowych i biopolimerów, które trudno było usunąć z preparatu. Dopiero zastosowanie metody ekstrakcji masy bakteryjnej 85% etanolem przez Ługowskiego i wsp. umożliwiło uzyskanie ze szczepów *S. sonnei* fazy I oraz fazy II stosunkowo czyste preparaty ECA, umożliwiające wykonanie jednych z pierwszych analiz składu próbki [32]. Männel i Mayer zastosowali ekstrakcję fenolowo-wodną, w celu otrzymania surowego preparatu LPS *Salmonella enterica* serowar Montevideo, a następnie, w celu izolacji ECA, ekstrakcję z użyciem mieszaniny fenol/chloroform/eter naftowy (ekstrakcja PCP) [37]. Obie metody izolacji pozwoliły na otrzymanie preparatów o podobnym stopniu czystości oraz porównywalnym składzie chemicznym. Männel i Mayer jako pierwsi wykonali analizę metylacyjną (GC-MS) otrzymanego preparatu i przedstawili strukturę antygeny ECA jako liniowego polimeru dwucukrowych podjednostek $\rightarrow 4$ - α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-ManpNAc-1(\rightarrow , zawierających N-acetyloglukozaminę oraz kwas N-acetylo-mannozaminouronowy. Oprócz składników cukrowych w preparacie wykryto również śladowe ilości kwasów tłuszczowych oraz grupy O-acetylowe. Był to niewątpliwie przełom w badaniach nad strukturą ECA i wydawać się mogło, że struktura jest już dokładnie poznana. Jednak zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) przez Ługowskiego i wsp. umożliwiło odkrycie nieznanego dodatkowego składnika cukrowego podjednostki ECA [34]. Widmo ^1H NMR uzyskane dla preparatu ECA otrzymanego z *S. sonnei* fazy I, oprócz sygnałów charakterystycznych dla cukrów opisanych przez Männela i Mayera, zawierało dodatkowy, charakterystyczny sygnał pochodzący od protonów grupy metylowej o intensywności 1:3 w stosunku do sygnałów dla protonów grup N-acetylowych. Zastosowanie przez Ługowskiego

i wsp. zmodyfikowanej metody analizy metylacyjnej potwierdziło obecność dodatkowego składnika cukrowego – 3-podstawionej 4-acetamido-4,6-dideoksygalaktozy, $\rightarrow 3$ -Fucp4NAc. Przyczynami, dla których cukier ten nie został zidentyfikowany przez Männela i Mayera [37], był jego rozpad w czasie zastosowanej przez nich metody analizy metylacyjnej. W wyniku kwaśnej hydrolizy cukier ulega deacetylacji, a następnie degradacji do pochodnych pirolowych. Modyfikacja analizy metylacyjnej zastosowana przez Ługowskiego i wsp. polegała na wykorzystaniu do uwolnienia permetylowanych reszt cukrowych metalizacji lub solwolizy ciełym, bezwodnym fluorowodorem. W takich warunkach labilne cukry nie ulegają degradacji, co umożliwiło ich dalszą analizę. W 1983 r. Ługowski i wsp. zaproponowali prawidłową i obowiązującą obecnie strukturę powtarzającej się podjednostki antygeny ECA: $\rightarrow 4$ - β -D-ManpNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Fucp4NAc-(1 \rightarrow). Wskazali również pozycję C-6 GlcpNAc, jako miejsce niestechiometrycznego podstawienia grupą O-acetylową [34].

Do dalszych badań nad strukturą ECA motywowało to, że niepowodzeniem kończyły się wszelkie próby wskazania biologicznej podjednostki, a więc określenia, który cukier znajduje się na końcu nieredukującym polisacharydu. Wyniki analizy metylacyjnej wskazywały na podstawienie wszystkich reszt cukrowych. Wyjaśnieniem uzyskanych wyników i niejako ukoronowaniem badań strukturalnych ECA, była praca Dell i wsp., w której autorzy opisali cykliczną postać antygeny ECA – ECA_{CYC} [7]. Zastosowali technikę spektrometrii mas z jonizacją szybkimi atomami FAB (fast atom bombardment) do badania preparatu ECA wyizolowanego z *S. sonnei* fazy I. Znając dokładną strukturę antygeny, spodziewali się zaobserwować jony odpowiadające polimerom zbudowanym z trójcukrowych podjednostek podstawionych różną liczbą grup O-acetylowych. Jednak wyniki, jakie otrzymali nie zgadzały się z masą wyliczoną teoretycznie, a różnica wynosiła 18 jednostek masy, co odpowiadało masie cząsteczki wody. Natomiast widmo masowe preparatu ECA poddanego hydrolizie 6 M kwasem solnym zawierało sygnały wskazujące na masę zgodną z masą teoretyczną dla liniowego łańcucha. Powyższe obserwacje nasunęły wniosek, że zaobserwowana różnica w masie cząsteczkowej wynika z cyklizacji łańcucha ECA. Hydroliza kwasem solnym powoduje przerwanie wiązania między resztami cukrowymi i powstanie postaci liniowej. Był to pierwszy udowodniony przypadek istnienia naturalnego cyklicznego heteropolisacharydu. Po latach, Farnback i wsp. uzyskali strukturę krystaliczną dla cyklicznej postaci antygeny ECA otrzymanego z *Proteus penneri*, co było ostatecznym dowodem na istnienie tej nietypowej cząsteczki [11].

Odkrycie postaci cyklicznej nie wykluczało istnienia liniowej postaci ECA. Peters i wsp. otrzymali przeciwciała monoklonalne immunizując myszy zabitymi bakteriami ECA-immunogenego szczepu *E. coli* O14. Uzyskane przeciwciała reagowały w immunoblotingu z oczyszczonym preparatem ECA, jak również z supernatantem zbadanych inaktywowanych bakterii, dając charakterystycz-

ne reakcje o wzorze drabinkowym, podobne do reakcji otrzymywanych dla LPS. Obserwacje te wskazywały na obecność liniowych polimerów ECA o różnej liczbie powtarzających się podjednostek [43]. Wykorzystując to samo przeciwciało, podobne wyniki otrzymali również Kuhn i wsp. [25] oraz Böttger i wsp. [4].

Zawartość kwasów tłuszczowych w otrzymywanych preparatach ECA wskazywała na obecność lipidu kotwiczącego polisacharydowy łańcuch w błonie zewnętrznej ściany komórkowej. Kuhn i wsp. analizowali region lipidowy antygeny ECA podczas badań nad tzw. czynnikiem „Pseudomonas” - enzymem hamującym opłaszczanie erytrocytów przez ECA [27,55], co uniemożliwiało reakcję hemaglutynacji ze swoistą surowicą anty-ECA. Preparat ECA poddawano działaniu fluorowodoru lub czynnika „Pseudomonas”, a następnie uwolnione lipidy badano wykorzystując GC-MS. Uzyskane wyniki wskazywały na różne miejsca hydrolizy ECA przez obydwie czynniki oraz co istotne, wskazywały na połączenie łańcucha ECA z fosfatydyloglicerolem (ECA_{PG}). Ponadto według autorów, pierwszą resztą przyłączoną do PG wiązaniem fosfodiesterowym była $Glc_{PG}NAC$. W oparciu o uzyskane wyniki ustalono strukturę biologicznej podjednostki ECA_{PG} : $\rightarrow 3$ - α -D-Fucp4NAC-(1 \rightarrow 4)- β -D-ManpNACA-1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpNAC-(1 \rightarrow). Obserwacja została potwierdzona w późniejszych badaniach nad produktami pośrednimi biosyntezy ECA, prowadzonymi przez Ricka i wsp. z zastosowaniem spektrometrii mas [51].

IMMUNOGENOŚĆ ECA I IDENTYFIKACJA ECA_{LPS}

Zdolność komórek bakteryjnych do pobudzenia układu immunologicznego w kierunku wytwarzania poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko ECA jest zależna od poziomu ekspresji zarówno ECA, jak i LPS. Immunogenne okazywały się prawie wyłącznie szczepy szorstkie, takich bakterii jak: *S. sonnei*, *E. coli* i *S. enterica* lub mutanty gładkich szczepów, u których zablokowano biosyntezę polisacharydu O-swoistego. Preparaty LPS izolowane od szczepów ECA-nieimmunogennych pozbawiono zanieczyszczeń w postaci antygeny ECA przez ekstrakcję 85% etanolem [54]. Tak uzyskane preparaty LPS nie reagowały z surowicą anty-ECA. Natomiast u szczepów ECA-immunogennych, nawet wielokrotne próby ekstrakcji preparatów LPS roztworem etanolu nie pozwalały na usunięcie antygeny ECA. W tym wypadku nieskuteczne okazało się również zastosowanie ekstrakcji PCP umożliwiającej oczyszczanie preparatów LPS szczepów nieimmunogennych od antygeny ECA. Obserwacje te wskazywały, że antygen ECA w postaci immunogennej jest związany kowalencyjnie z LPS (ECA_{LPS}), natomiast w dominującej postaci nieimmunogennej występuje jako ECA_{PG} . Od chwili odkrycia ECA przez Kunina wiadomo było, że nie wszystkie szczepy bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* są szczepami ECA-immunogennymi. Kiss i wsp. wyizolowali LOS z ECA-immunogennej, szorstkiej mutanta *E. coli* O8:K27⁻ (F470) pozbawionego antygenów O i K oraz LPS z kontrolnego, gładkiego szczepu *E. coli* O8:K27⁺, syntezującego polisacharyd O-swoisty [23]. Bakterie hodo-

wano w pożywce wzbogaconej w [^{14}C]D-GlcpNAC, w celu wyznaczenia składników podjednostki ECA, takich jak D-GlcpNAC i D-ManpNACA. Następnie otrzymane preparaty oczyszczano od wolnego ECA metodą ekstrakcji PCP. Tak otrzymany LPS poddano łagodnej kwaśnej hydrolizie w celu usunięcia lipidu A, a otrzymaną mieszaninę poli- i oligosacharydów rozdzielano na kolumnie wypełnionej złożem DEAE-celuloza. Obecność znakowanej [^{14}C]D-GlcpNAC w zbieranych frakcjach badano przez pomiar radioaktywności. Obecność [^{14}C]D-GlcpNAC stwierdzono u frakcji oligocukrów rdzeni pochodzących od ECA-immunogennej szczepu F470. Wykazano także, że tylko niewielka część oligocukrów rdzeniowych podstawiona jest znakowaną [^{14}C]D-GlcpNAC i tym samym antygenem ECA. Prawdopodobnie ze względu na niewystarczającą ilość materiału i stosunkowo małą czułość aparatury w tamtych czasach, nie przeprowadzono analizy strukturalnej wyizolowanej frakcji. Sama identyfikacja znakowanego cukru była niewystarczająca, aby potwierdzić jednoznacznie obecność kowalencyjnego wiązania między ECA a oligosacharydem rdzenia LPS, wskazywała jedynie na wspólną elucję tych składników z kolumny. Niemniej jednak było to jedno z pierwszych doniesień o połączeniu antygeny ECA z oligocukrem rdzenia LPS.

Ługowski, pisząc o badaniach nad antygenem ECA [30], opisuje wstępne wyniki analizy strukturalnej frakcji oligosacharydów rdzenia ECA-immunogennej szczepu *S. sonnei* fazy II. Rozdzielając, z użyciem chromatografii żelowej, mieszaninę oligosacharydów otrzymanych po delipidacji LPS, uzyskał wiele frakcji, które następnie badał metodą immunoelektroforezy rakietowej z surowicą anty-ECA. Zaobserwował silne reakcje dla frakcji o masie nieznacznie większej od masy oligosacharydów rdzenia (migrujących szybciej przez kolumnę), świadczące o obecności epitopów ECA. Widmo 1H NMR uzyskane dla tej frakcji, poza charakterystycznymi sygnałami dla atomów wodoru przyłączonych do anomerycznych atomów węgla pochodzących od oligocukru rdzenia, zawierało również sygnały pochodzące od dodatkowych składników. Wyraźnie były widoczne również sygnały protonów grup acetylowych oraz grupy metylowej, które nie mogły pochodzić od oligosacharydu rdzenia. Ograniczenia sprzętowe oraz niewystarczająca ilość materiału uniemożliwiły w tamtych czasach dokładną analizę zidentyfikowanej frakcji.

Badania prowadzone nad obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko ECA w surowicach zwierzęcych po immunizacji komórkami bakteryjnymi, wykazały obecność antygeny ECA_{LPS} w szorstkich szczepach *Proteus mirabilis* oraz *Y. enterocolitica*. W przypadku szczepu *P. mirabilis*, podobnie jak u *E. coli* R1, R4, K-12 [26], R2 i R3 [8], badacze stwierdzili, że do podstawienia cząsteczki LPS antygenem ECA jest wymagana obecność kompletnego oligocukru rdzenia [8]. W przypadku *Y. enterocolitica*, oprócz szczepów szorstkich, mających kompletny oligocukier rdzenia, zawierający region rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego (chemotyp Ra), ECA-immunogenne okazały się również szorstkie mutanty mające tylko region rdzenia wewnętrznego (chemotyp Rc) [46,47,48]. Pośrednie dane wskazu-

ją, że w cząsteczce LPS gładkiego szczepu *Y. enterocolitica* O:3 zarówno polisacharyd O-swoisty, jak i antygen ECA mogą występować jednocześnie [40]. Przytoczone wnioski oparto na wynikach immunoblotingu preparatu LPS pozbawionego zanieczyszczenia postacią ECA_{PG}. Oczyszczony preparat dawał reakcje o charakterystycznym wzorze drabinkowym (seria prążków reprezentujących cząsteczki o różnej liczbie powtarzających się trójcukrowych podjednostek ECA) zarówno z przeciwciałami monoklonalnymi swoistymi dla ECA, jak i dla polisacharydu O-swoistego. Co więcej, reakcje z przeciwciałami anti-ECA były widoczne dla preparatu LPS otrzymanego z bakterii hodowanych w temperaturze 22° C, natomiast nie obserwowano ich dla preparatu LPS otrzymanego z bakterii hodowanych w 37° C. Oznacza to, że synteza antygenu ECA u *Y. enterocolitica* jest zależna od temperatury. W dalszych badaniach Noszczyńska i wsp. zaobserwowali również wytwarzanie przeciwciał anti-ECA przez króliki immunizowane tzw. głęboko szorstkimi mutantami *Y. enterocolitica* O:3 zawierającymi LOS zbudowany z lipidu A podstawionego dwoma resztami kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo) (chemotyp Re) lub dwoma resztami Kdo podstawionymi jedną (chemotyp Rd₂) lub dwoma cząsteczkami heptozy (chemotyp Rd₁) [41]. Wyizolowano preparaty LPS, które poddano ekstrakcji PCP w celu usunięcia ECA_{PG}. Immunobloting rozdzielonych preparatów LPS z poliklonalnymi surowicami skierowanymi przeciwko szorstkim szczepom *Y. enterocolitica* O:3 wykazał obecność antygenu ECA w oczyszczonych preparatach LPS. Wyniki te sugerują, że w przypadku *Y. enterocolitica* O:3 antygen ECA może być przyłączony do regionu Kdo wewnętrznego rdzenia LPS.

Istotne, pod względem bezpośrednich dowodów na kowalencyjne połączenie antygenu ECA z cząsteczką LPS, okazały się niedawne badania Goździewicz i wsp. [15]. Badacze skupili uwagę na ECA-immunogenym, szorstkim szczepie *S. sonnei* fazy II. Stosując standardową procedurę ekstrakcji fenolowo-wodnej, uzyskali preparat lipooligosacharydu (LOS), który poddali łagodnej hydrolizie w celu usunięcia lipidu A. Frakcję uzyskanych w ten sposób oligosacharydów rozdzielali z użyciem chromatografii żelowej. Zebrane frakcje analizowali za pomocą spektrometrii mas oraz spektroskopii NMR. Oprócz dominującej frakcji zawierającej oligosacharydy rdzenia, różniące się stechiometrią podstawień grupami fosforanowymi czy etanolaminą, uzyskali wiele frakcji o wyższych masach cząsteczkowych. Trudność opisywanych analiz polegała na współistnieniu w otrzymanym preparacie fragmentów wszystkich postaci ECA – ECA_{CYC}, ECA_{PG} i ECA_{LPS}. W najszybciej migrujących frakcjach zidentyfikowano liniowe fragmenty polisacharydu ECA, które ich zdaniem mogą pochodzić z ECA_{PG}. Zidentyfikowano również frakcje zawierające ECA w postaci cyklicznej. Najciekawsze, z punktu widzenia dowodów na istnienie ECA_{LPS}, okazały się frakcje migrujące tuż przed frakcją zawierającą niepodstawiony oligosacharyd rdzenia. Bowiern zawarte w tych frakcjach cząsteczki reagują w teście dot-blotingu zarówno z surowicą skierowaną przeciwko koniugatowi antygenu ECA z toksoidem tężcowym, jak i z surowicą

skierowaną przeciwko koniugatowi oligosacharydu rdzenia. Analiza widm masowych wykazała obecność frakcji zawierających oligosacharyd rdzenia *S. sonnei* fazy II połączony kowalencyjnie z jedną, dwoma, trzema oraz czterema podjednostkami antygenu ECA. Ostatecznych dowodów na istnienie kowalencyjnego połączenia między antygenem ECA a oligosacharydem rdzenia dostarczyła analiza serii dwuwymiarowych widm ¹H, ¹³C NMR otrzymanych dla frakcji zawierającej cząsteczkę oligocukru rdzenia podstawioną jedną podjednostką ECA. Dane przedstawione przez Goździewicz i wsp. jednoznacznie wskazują na połączenie antygenu ECA z oligosacharydem rdzenia *S. sonnei* fazy II kowalencyjnym wiązaniem α-(1→3) glikozydowym między α-D-Glc₁NAC antygenu ECA a terminalną (w niepodstawionym oligosacharydzie) β-D-Glc₂ oligosacharydu rdzenia. Wyniki uzyskane przez nich potwierdzają wcześniej uzyskane dane dla ECA_{PG} wskazujące na biologiczną podjednostkę ECA, w której resztą cukrową podstawiającą oligosacharyd rdzenia jest α-D-Glc₁NAC.

Współistnienie ECA_{CYC} i LPS we frakcji wodnej otrzymanej podczas izolacji LPS metodą fenolowo-wodną zauważyli wcześniej Fregolino i wsp., co opisali na przykładzie szczepu *E. coli* O157 [12]. Wyizolowali ECA_{CYC} oczyszczając chromatograficznie supernatant powstały podczas ultrawierzenia surowego preparatu LPS, co jest znaną metodą oczyszczania LPS od pozostałości kwasów nukleinowych i białek. Uzyskali frakcje zawierające cykliczne ECA złożone z 4 i 5 podjednostek. Dane te wskazują na potrzebę uwzględniania tego antygenu w preparatach LPS.

Ważny aspekt występowania antygenu ECA poruszyli Erbel i wsp. [10], którzy zwrócili uwagę na możliwość zanieczyszczenia przez ECA preparatów białek ekspresjonowanych w systemach bakteryjnych wykorzystujących szczepy *E. coli*. Badacze identyfikowali charakterystyczne sygnały grup N-acetylowych pochodzących od składników antygenu ECA w różnych preparatach ekspresjonowanych białek. Stwierdzili, że ECA w postaci cyklicznej stanowi częste zanieczyszczenie preparatów ekspresjonowanych białek, zwłaszcza przy długo prowadzonej ekspresji. Ma to szczególne znaczenie podczas badań immunologicznych, w których pewne aktywności ekspresjonowanego białka (np. immunogenność) mogą być fałszywie oznaczone właśnie przez wpływ zanieczyszczenia antygenem ECA.

BIOSYNTEZA ECA

Biosynteza antygenu ECA jest ściśle powiązana z biosyntezą LPS, a dokładnie z jednym ze szlaków biosyntezy polisacharydów O-swoistych – drogi zależnej od Wzx/Wzy [18,21,22,56]. Podstawowymi substratami biosyntezy antygenu ECA, bez względu na jego postać, są poszczególne reszty cukrowe związane z wysokoenergetycznymi fosforanami nukleozydów: Glc₁NAC oraz Man₁NAC a difosforanem urydyny (UDP), a Fuc₁4NAC z difosforanem tymidyny (TDP). Pochodna kwasu ManNACa powstaje z GlcNAC-UDP z udziałem enzymów kodowanych przez

geny *wecB* (UDP-GlcNAc → UDP-ManNAc) oraz *wecC* (UDP-ManNAc → UDP-ManNAcA). Natomiast pochodna fukozy powstaje z glukozy, gdzie produktami pośrednimi są keto-6-deoksyglukoza oraz 4-aminofukoza, w wyniku działania enzymów kodowanych przez geny *rlmB*, *wecE* oraz *wecD*. Biosynteza ECA rozpoczyna się od przeniesienia GlcNAc z UDP na undekaprenylofosforan (Und-P) – lipidowy nośnik kolejnych substratów szlaku biosyntezy ECA. Powstały Und-PP-GlcNAc to tzw. lipid I [51], a za reakcją tę odpowiada glikozylotransferaza kodowana przez gen *wecA*. Und-P i lipid I to związki powstające podczas biosyntezy zarówno ECA, jak i LPS. Następnym etapem jest przyłączenie kolejnych reszt cukrowych z utworzeniem odpowiednio lipidu II (Und-PP-GlcNAc-ManNAc, transferaza *wecG*) oraz lipidu III (Und-PP-GlcNAc-ManNAc-Fuc4NAc, transferaza *wecF*). Powstały lipid III zawiera kompletną, trójcukrową podjednostkę ECA. Dalszy etap nie został jednoznacznie potwierdzony, jednak badacze sugerują, że zachodzi z udziałem enzymów homologicznych do tych biorących udział w biosyntezie LPS lub wspólnych dla obu szlaków. Tak zwana flipaza (gen *wzxE*) przenosi lipid III na stronę peryplazmatyczną błony, gdzie następnie polimeraza WzyE przyłącza kolejne trójcukrowe podjednostki tworząc polimer ECA. Kolejnym enzymem, kodowanym przez gen *wzzE*, odpowiada za regulację długości łańcucha ECA. Etap przeniesienia powstałego polisacharydu ECA na fostadydyloglicerol (ECA_{PG}) oraz jego transport do błony zewnętrznej pozostaje jak dotąd nieznanymi. Erbel i wsp. opisując szlak biosyntezy ECA_{CYC} u *E. coli* sugerują, że począwszy od lipidu III, dalsza biosynteza każdej z trzech znanych postaci ECA przebiega niezależnie [9]. Według nich cyklizacja łańcucha ECA miałaby być niezależna od polimerazy WzyE i zachodzić po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej, za czym przemawiają doniesienia, jakoby ECA_{CYC} miało być składnikiem cytoplazmy [1].

Podobieństwo biosyntezy ECA oraz LPS wynika z udziału tego samego mechanizmu wydłużania łańcucha polisacharydowego z udziałem polimerazy WzyE (w przypadku mechanizmu zależnego od polimerazy) oraz takich samych nośników intermediatów – Und-PP [49]. Synteza łańcuchów O-swoistych rozpoczyna się od tego samego prekursora, jak w przypadku antygeny ECA, czyli Und-PP-Glc, który może ulec przekształceniu, np. do Und-PP-GlcNAc. Zatem reszty Glc lub GlcNAc są poniekąd inicjatorami biosyntezy polisacharydów O-swoistych, co powoduje, że w większości znanych przypadków znajdują się na ich końcu nieredukującym. W przypadku biosyntezy LPS, gotowy polisacharyd O-swoisty, powstały z udziałem polimerazy WzyE, jest przenoszony na oligosacharyd rdzenia połączony z lipidem A przez ligazę WaaL [16]. Wydaje się zatem prawdopodobne, że w niektórych przypadkach substratem dla ligazy WaaL mógłby być Und-PP-ECA, co spowodowałoby przyłączenie tego antygeny do oligosacharydu rdzenia związanego z lipidem A, czyli utworzeniem ECA_{LPS} . Swoistość substratowa WaaL jest jednak znacznie większa wobec pochodnej polisacharydu O-swoistego, bo jak już wspomniano w przypadku LOS *S. sonnei* fazy II, tylko niewielka część oligosachary-

du rdzenia jest podstawiona przez ECA [15]. W szczepach szorstkich, w których mutacje dotyczą wcześniejszych etapów biosyntezy LPS, brak podstawowego substratu dla enzymu WaaL faworyzuje ligację ECA. Przytoczone rozważania mają charakter teoretyczny, ponieważ jak dotąd, poza wspomnianym przypadkiem *Y. enterocolitica*, nie wykazano obecności ECA_{LPS} u gładkich szczepów bakterii.

Jedną z istotnych modyfikacji ECA jest podstawienie antygeny grupami O-acetylowymi. Kajimura i wsp. badali mechanizm O-acetylowania antygeny ECA u szczepu *E. coli* K12 [19]. Otrzymali mutant ekspresjonujący zarówno ECA_{PG} , jak i ECA_{CYC} pozbawione grup O-acetylowych. Dalsze badania wykazały obecność mutacji w genie *yiaH*, który jak wykazała analiza bioinformatyczna, koduje błonowe białko z rodziny acetylotransferaz. Nawiązując do nomenklatury genów zaangażowanych w biosyntezę ECA, zaproponowano oznaczenie genu dla O-acetylotransferazy ECA jako *wecH*. Jako powód takiej modyfikacji ECA, badacze podają wzrost hydrofobowości łańcucha polisacharydowego, co miałoby umożliwić dostosowywanie się bakterii do warunków środowiskowych oraz wspomagać asocjacje z komórkami gospodarza lub innymi bakteriami. Znany jest również wpływ O-acetylowania powierzchniowych polisacharydów na wirulencję bakterii [3].

ZNACZENIE BIOLOGICZNE ECA

Mimo iż dokładna funkcja antygeny ECA nie została jak dotąd jednoznacznie stwierdzona, dotychczasowe badania wskazują, że obecność tego antygeny wpływa na wirulencję i oporność bakterii na warunki środowiskowe.

Ramos-Morales i wsp. badali wpływ ekspresji antygeny ECA na oporność szczepu *S. enterica* na działanie soli kwasów żółciowych na przykładzie deoksycholanu (DOC) – kwasu żółciowego naturalnie występującego w duonastnicy [50]. Uzyskali mutanty pozbawione genów *wecD* oraz *wecA* zaangażowanych w biosyntezę ECA, co skutkowało brakiem ekspresji antygeny ECA. Następnie uzyskane mutanty oraz szczep dziki jako kontrolny, hodowano na pożywce Luria-Bertani (LB) lub LB z dodatkiem 1% DOC. Okazało się, że mutacje zaburzające biosyntezę ECA spowodowały znaczne zahamowanie wzrostu bakterii na płytkach z dodatkiem DOC i tylko nieznaczny spadek wzrostu na płytkach bez dodatku DOC. Podobne wyniki badań uzyskano dla mutantu *S. enterica* (delecja w obrębie genu *wecB* odpowiedzialnego za biosyntezę ECA) hodowanego na podłożu zawierającym 7,5% żółci wołowej [38]. Otrzymane wyniki wskazują, że antygen ECA wzmacnia oporność bakterii na bakteriobójcze warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Obecność tego antygeny nie jest już tak istotna dla wirulencji bakterii w przypadku zapalenia otrzewnej.

Badania Kajimury i wsp., prowadzone na izolowanych subkomórkowych frakcjach *E. coli* K-12 wykazały, że ECA_{CYC} jest obecne jedynie w przestrzeni peryplazmatycznej. Autorzy wykazali również, że 80% ECA_{CYC} jest uwalniana na zewnątrz komórki pod wpływem wstrząsu osmotycznego

nego. W związku z tym znaczenia tej postaci upatruje się w funkcji osmoregulacji [20]. Mutacje wprowadzone w obrębie genów zaangażowanych w biosyntezę ECA (*wecA*, *wecD*, *wecG*) u *Serratia marcescens* skutkowały fenotypem charakteryzującym się wzmożonym uwalnianiem pęcherzyków zewnątrz błonowych (OMVs, outer membrane vesicles). Obecnie proces uwalniania OMV przez bakterie jest postrzegany m.in. jako reakcja komórki bakteryjnej na stres wywołany przez czynniki środowiskowe, ale także jako nośniki służące do uwalniania poza komórkę antybiotyków lub toksyn [39].

Wykazano, że u *S. enterica* mutacja genu *wecA* prowadząca do zablokowania biosyntezy ECA nie wpływała na morfologię komórki, ilość wytwarzanego LPS i ruchliwość bakterii. Brak ECA obniżał natomiast wirulencję, spowodował utratę zdolności do kolonizacji tkanek wątroby i śledziony oraz wydłużył czas przeżywalności w zakażonym organizmie, co zaobserwowano na mysim modelu zakażenia drogą pokarmową [14]. Klein i wsp. przeprowadzili szeroko zakrojone analizy genetyczne biblioteki mutantów *Yersinia pestis* wykazując negatywny wpływ mutacji w obrębie genów kodujących *wecB* i *wecC* na przeżywalność tej bakterii w makrofagach [24]. Podobne badania wykonane dla uropatogennego szczepu *E. coli* należącego do lekoopornego i charakteryzującego się dużym potencjałem zjadliwości typu sekwencyjnego ST131 doprowadziły do identyfikacji 22 genów odpowiedzialnych za oporność badanego szczepu na bakteriobójcze działanie ludzkiej surowicy, z których 5 związanych było z biosyntezą ECA (*wzzE*, *wecF*, *wecD*, *wecA*, *waal*) [44].

Badania Castelli i wsp. wykazały natomiast wpływ obecności antygeny ECA na syntezę flageliny i w konsekwencji na ruchliwość bakterii *S. marcescens* [5,6]. Mutanty pozbawione jednego z genów *wecD*, *wzxE* lub *wzyE* nie miały wykształconej wici, co uniemożliwiało lub znacznie upośledzało ruchliwość tej bakterii.

Paunova-Krasteva i wsp. badali cykliczną postać ECA z *E. coli* O157 pod kątem jej rozpoznawania przez układ odpornościowy [42]. Stwierdzili, że ECA_{CYC} jest rozpoznawany i wiązany przez ludzką lektynę wiążącą mannan (MBL), składnik układu dopełniacza. Badacze sugerują wręcz, że ECA należy do wzorców molekularnych związanych z patogenami, tzw. PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Są to jedyne jak dotąd doniesienia o rozpoznawaniu antygeny ECA przez lektyny układu dopełniacza oparte jedynie na wynikach testu immunoenzymatycznego ELISA oraz testu na fagocytozę przez neutrofile kulek lateksowych opłaszczonych ECA_{CYC}.

POTENCJALNE ZASTOSOWANIA ANTYGENY ECA

Występowanie wspólnego antygeny na powierzchni wszystkich bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* było przyczynkiem do postrzegania go jako uniwersalnego antygeny szczepionkowego.

Ługowski i wsp. jako pierwsi otrzymali koniugat de-O-acetylowanego antygeny ECA_{CYC} uzyskanego przez ekstrak-

cję etanolem, z toksoidem tężcowym – silnie immunogenym i powszechnie wykorzystywanym w szczepionkach białkiem nośnikowym [31,33]. W wyniku immunizacji królików glikokoniugatem ECA_{CYC}-toksoid tężcowy otrzymali surowicę silnie reagującą z preparatami antygeny ECA. Otrzymana swoista surowica może służyć do identyfikacji samego antygeny, jak i bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Levasseur i wsp. otrzymali zestaw przeciwciał monoklonalnych przeciwko enterobakteriom [29]. Jedno z nich, oznaczone jako CX9/15, wykazało reaktywność przeciwko żywym bakteriom należącym do rodziny *Enterobacteriaceae* oraz kilku szczepom spoza tej rodziny. Badacze stwierdzili, że przeciwciała to skierowane jest przeciwko antygenowi ECA i może być wykorzystane w diagnostyce szybkiego oznaczania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zastanawiający wydaje się jednak to, że przeciwciała to, testowane za pomocą immunoblotingu, reagowało z ekstraktami bakterii, otrzymanymi przez gotowanie masy bakteryjnej w buforze redukującym z SDS, jedynie w regionie odpowiadającym antygenowi o masie cząsteczkowej wynoszącej około 20 kDa, a obraz immunoblotingu nie przedstawiał charakterystycznego wzoru drabinkowego, jakiego należałoby się spodziewać dla ECA.

Inni badacze również otrzymywali monoklonalne przeciwciała reagujące z antygenem ECA. Na przykład Peters i wsp. otrzymali przeciwciała monoklonalne reagujące z ekstraktem bakterii [43], które następnie Hübner i wsp. wykorzystali do opracowania testu immunoenzymatycznego ELISA przeznaczonego do wykrywania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w wodzie pitnej [17]. W opinii autorów zaproponowany test był szybszy, czulszy oraz bardziej swoisty niż stosowane wówczas metody.

Natomiast Plomer i wsp. na bazie przeciwciał anti-ECA stworzyli piezoelektryczny immunosensor, który wykrywał bakterie *E. coli* K12 w zakresie 10⁶-10⁹ komórek/ml [45].

Antygen ECA wydaje się szczególnie przydatnym w leczeniu uogólnionych infekcji bakteryjnych, a zwłaszcza sepsy, spowodowanej w prawie połowie przypadków przez Gram-ujemne bakterie, wśród których dominują gatunki, takie jak: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* czy *P. mirabilis*. Antygen ECA występujący powszechnie na powierzchni komórek bakteryjnych wydaje się idealnym celem dla swoistych przeciwciał. Oponizacja bakterii przez przeciwciała, a następnie uruchomienie kaskady reakcji proteolitycznych z udziałem białek układu dopełniacza skutkujące zabiciem patogenu, jest dobrze znanym procesem humoralnej, wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego. Przeciwciała wiążąc bakterie mogą także aktywować odpowiedź komórkową z udziałem m.in. komórek NK czy makrofagów (ADCC, Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). Zatem przeciwciała rozpoznające dużą grupę potencjalnie patogenych bakterii, przynajmniej teoretycznie, mogłyby mieć zastosowanie terapeutyczne. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi ECA powinny rozpoznawać epi-

topy ECA na powierzchni komórek bakteryjnych oraz wykazywać właściwości ochronne względem szerokiej grupy bakterii, ze względu na obserwowane reakcje krzyżowe. W szerokich, wieloośrodkowych badaniach klinicznych wykonanych przez Albertsona i wsp. badano wpływ podawania monoklonalnych przeciwciał IgM anty-ECA (MAB-T88) na przeżywalność pacjentów ze zdiagnozowaną sepsą wywołaną przez Gram-ujemne bakterie. Pacjenci cierpiący na sepsę z niewydolnością wielonarządową oraz wstrząsem septycznym otrzymywali jednorazowo, dożylnie 300 mg przeciwciał MAB-T88 w roztworze albuminy lub samą albuminę jako placebo. Wyniki wskazywały na brak znaczącej różnicy mię-

dzy grupami otrzymującymi MAB-T88 i placebo. Śmiertelność wynosiła odpowiednio 37 i 34%. Autorzy dość jednoznacznie stwierdzają, że brak jest jakichkolwiek dowodów popierających dalsze uwzględnianie tego przeciwciała w leczeniu sepsy. Należy jednak zwrócić uwagę na rodzaj przeciwciał – IgM, które niekoniecznie mogą wykazywać właściwości bakteriobójcze [2].

Przytoczone przykłady wskazują potrzebę dalszych badań nad antygenem wspólnym dla *Enterobacteriaceae*, które mogą w przyszłości zaowocować nowymi metodami wykrywania i leczenia chorób wywołanych przez tę powszechną rodzinę Gram-ujemnych bakterii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Acker G., Bitter-Suermann D., Meier-Dieter U., Peters H., Mayer H.: Immunocytochemical localization of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* cells. *J. Bacteriol.*, 1986; 168: 348-356
- [2] Albertson T.E., Panacek E.A., MacArthur R.D., Johnson S.B., Benjamin E., Matuschak G.M., Zaloga G., Maki D., Silverstein J., Tobias J.K., Haenftling K., Black G., Cowens J.W.: Multicenter evaluation of a human monoclonal antibody to Enterobacteriaceae common antigen in patients with Gram-negative sepsis. *Crit. Care Med.*, 2003; 31: 419-427
- [3] Allison G.E., Verma N.K.: Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol.*, 2000; 8: 17-23
- [4] Böttger E.C., Jürs M., Barrett T., Wachsmuth K., Metzger S., Bitter-Suermann D.: Qualitative and quantitative determination of enterobacterial common antigen (ECA) with monoclonal antibodies: expression of ECA by two *Actinobacillus species*. *J. Clin. Microbiol.*, 1987; 25: 377-382
- [5] Castelli M.E., Fedrigo G.V., Clementín A.L., Ielmini M.V., Feldman M.F., García Vescovi E.: Enterobacterial common antigen integrity is a checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 2008; 190: 213-220
- [6] Castelli M.E., Vescovi E.G.: The Rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 2011; 193: 63-74
- [7] Dell A., Oates J., Lugowski C., Romanowska E., Kenne L., Lindberg B.: The enterobacterial common-antigen, a cyclic polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 1984; 133: 95-104
- [8] Duda K.A., Duda K.T., Beczala A., Kasperkiewicz K., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M.: ECA-immunogenicity of *Proteus mirabilis* strains. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2009; 57: 147-151
- [9] Erbel P.J., Barr K., Gao N., Gerwig G.J., Rick P.D., Gardner K.H.: Identification and biosynthesis of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 1995-2004
- [10] Erbel P.J., Seidel R., Macintosh S.E., Gentile L.N., Amor J.C., Kahn R., Prestegard J.H., McIntosh L.P., Gardner K.H.: Cyclic enterobacterial common antigen: potential contaminant of bacterially expressed protein preparations. *J. Biomol. NMR*, 2004; 29: 199-204
- [11] Färnäck M., Eriksson L., Senchenkova S., Zych K., Knirel Y.A., Sidorczyk Z., Widmalm G.: Crystal structure of a cyclic enterobacterial common antigen. *Angew. Chem.*, 2003; 42: 2543-2546
- [12] Fregolino E., Ivanova R., Lanzetta R., Molinaro A., Parrilli M., Paunova-Krasteva T., Stoitsova S.R., De Castro C.: Occurrence and structure of cyclic Enterobacterial Common Antigen in *Escherichia coli* O157:H-. *Carbohydr. Res.*, 2012; 363: 29-32
- [13] Gamian A., Romanowska E.: The core structure of *Shigella sonnei* lipopolysaccharide and the linkage between O-specific polysaccharide and the core region. *Eur. J. Biochem.*, 1982; 129: 105-109
- [14] Gilbreath J.J., Colvocoresses Dodds J., Rick P.D., Soloski M.J., Merrell D.S., Metcalf E.S.: Enterobacterial common antigen mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium establish a persistent infection and provide protection against subsequent lethal challenge. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 441-450
- [15] Goździewicz T.K., Lugowski C., Lukaszewicz J.: First evidence for a covalent linkage between enterobacterial common antigen and lipopolysaccharide in *Shigella sonnei* phase II ECA_{LPS}. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 2745-2754
- [16] Greenfield L.K., Whitfield C.: Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr. Res.*, 2012; 356: 12-24
- [17] Hübner I., Steinmetz I., Obst U., Giebel D., Bitter-Suermann D.: Rapid determination of members of the family *Enterobacteriaceae* in drinking water by an immunological assay using a monoclonal antibody against enterobacterial common antigen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992; 58: 3187-3191
- [18] Islam S.T., Lam J.S.: Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can. J. Microbiol.*, 2014; 60: 697-716
- [19] Kajimura J., Rahman A., Hsu J., Evans M.R., Gardner K.H., Rick P.D.: O acetylation of the enterobacterial common antigen polysaccharide is catalyzed by the product of the *yiaH* gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 7542-7550
- [20] Kajimura J., Rahman A., Rick P.D.: Assembly of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 6917-6927
- [21] Kalynych S., Morona R., Cygler M.: Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008; 32: 1048-1065
- [22] Kaszowska M.: Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 333-342
- [23] Kiss P., Rinno J., Schmidt G., Mayer H.: Structural studies on the immunogenic form of the enterobacterial common antigen. *Eur. J. Biochem.*, 1978; 88: 211-218
- [24] Klein K.A., Fukuto H.S., Pelletier M., Romanov G., Grabenstein J.P., Palmer L.E., Ernst R., Bliska J.B.: A transposon site hybridization screen identifies *galU* and *wecBC* as important for survival of *Yersinia pestis* in murine macrophages. *J. Bacteriol.*, 2012; 194: 653-662

- [25] Kuhn H.M., Basu S., Mayer H.: Comparison of enterobacterial common antigen from different species by serological techniques. *Eur. J. Biochem.*, 1987; 162: 69-74
- [26] Kuhn H.M., Meier-Dieter U., Mayer H.: ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1988; 4: 195-222
- [27] Kuhn H.M., Neter E., Mayer H.: Modification of the lipid moiety of the enterobacterial common antigen by the "Pseudomonas factor". *Infect. Immun.*, 1983; 40: 696-700
- [28] Kunin C.M., Beard M.V., Halmagyi N.E.: Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of *E. coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Exp. Biol. Med.*, 1962; 111: 160-166
- [29] Levasseur S., Husson M.O., Leitz R., Merlin F., Laurent F., Peladan F., Drocourt J.L., Leclerc H., Van Hoegaerden M.: Rapid detection of members of the family *Enterobacteriaceae* by a monoclonal antibody. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992; 58: 1524-1529
- [30] Lugowski C.: Structure and immunological properties of enterobacterial common antigen (ECA). *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1987; 41: 384-432
- [31] Lugowski C., Kulakowska M., Romanowska E.: Enterobacterial common antigen-tetanus toxoid conjugate as immunogen. *Infect. Immun.*, 1983; 42: 1086-1091
- [32] Lugowski C., Romanowska E.: Enterobacterial common antigen: isolation from *Shigella sonnei*, purification and immunochemical characterization. *Eur. J. Biochem.*, 1978; 91: 89-97
- [33] Lugowski C., Romanowska E.: Characterization of an enterobacterial common antigen (ECA) epitope recognized by anti-ECA-tetanus toxoid conjugate serum. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991; 61: 315-318
- [34] Lugowski C., Romanowska E., Kenne L., Lindberg B.: Identification of a trisaccharide repeating-unit in the enterobacterial common-antigen. *Carbohydr. Res.*, 1983; 118: 173-181
- [35] Lukaszewicz J., Lugoński C.: Biologiczna aktywność lipopolisacharydu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 33-53
- [36] Maeland J.A., Digranes A.: Common enterobacterial antigen in *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B*, 1975; 83: 382-386
- [37] Männel D., Mayer H.: Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen. *Eur. J. Biochem.*, 1978; 86: 361-370
- [38] May J.F., Groisman E.A.: Conflicting roles for a cell surface modification in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.*, 2013; 88: 970-983
- [39] McMahon K.J., Castelli M.E., Garcia Vescovi E., Feldman M.F.: Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *J. Bacteriol.*, 2012; 194: 3241-3249
- [40] Muszyński A., Rabsztyń K., Knapska K., Duda K.A., Duda-Grychtoł K., Kasperkiewicz K., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M.: Enterobacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Microbiology*, 2013; 159: 1782-1793
- [41] Noszczyńska M., Kasperkiewicz K., Duda K.A., Podhorodecka J., Rabsztyń K., Gwizdała K., Swierzko A.S., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M.: Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Microbiology*, 2015; 161: 219-227
- [42] Paunova-Krasteva T.S., Pavlova V.A., De Castro C., Ivanova R.M., Molinaro A., Nikolova E.B., Stoitsova S.R.: Cyclic enterobacterial common antigens from *Escherichia coli* O157 as microbe-associated molecular patterns. *Canad. J. Microbiol.*, 2014; 60: 173-176
- [43] Peters H., Jürs M., Jann B., Jann K., Timmis K.N., Bitter-Suermann D.: Monoclonal antibodies to enterobacterial common antigen and to *Escherichia coli* lipopolysaccharide outer core: demonstration of an antigenic determinant shared by enterobacterial common antigen and *E. coli* K5 capsular polysaccharide. *Infect. Immun.*, 1985; 50: 459-466
- [44] Phan M.D., Peters K.M., Sarkar S., Lukowski S.W., Allsopp L.P., Gomes Moriel D., Achard M.E., Totsika M., Marshall V.M., Upton M., Beatson S.A., Schembri M.A.: The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. *PLoS Genet.*, 2013; 9: e1003834
- [45] Plomer M., Guibault G.G., Hock B.: Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992; 14: 230-235
- [46] Rabsztyń K., Kasperkiewicz K., Duda K.A., Li C.M., Lukasiak M., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M.: Characterization of anti-ECA antibodies in rabbit antiserum against rough *Yersinia enterocolitica* O:3. *Biochemistry*, 2011; 76: 832-839
- [47] Radziejewska-Lebrecht J., Kasperkiewicz K., Skurnik M., Brade L., Steinmetz I., Swierzko A.S., Muszynski A.: ECA-antibodies in antisera against R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003; 529: 215-218
- [48] Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M., Shashkov A.S., Brade L., Rozalski A., Bartodziejska B., Mayer H.: Immunochemical studies on R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Acta Biochim. Pol.*, 1998; 45: 1011-1019
- [49] Raetz C.R., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002; 71: 635-700
- [50] Ramos-Morales F., Prieto A.I., Beuzon C.R., Holden D.W., Casadeu J.: Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 5328-5332
- [51] Rick P.D., Hubbard G.L., Kitaoka M., Nagaki H., Kinoshita T., Dowd S., Simplaceanu V., Ho C.: Characterization of the lipid-carrier involved in the synthesis of enterobacterial common antigen (ECA) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in ECA synthesis. *Glycobiology*, 1998; 8: 557-567
- [52] Rinno J., Golecki J.R., Mayer H.: Localization of enterobacterial common antigen: immunogenic and nonimmunogenic enterobacterial common antigen-containing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1980; 141: 814-821
- [53] Romanowska E., Katzenellenbogen E., Lugoński C., Gamian A., Bogulska M.: Immunochemical characteristics of *Shigella sonnei* and serotype 6 *Shigella flexneri* lipopolysaccharides and enterobacterial common antigen. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1978; 26: 249-254
- [54] Suzuki T., Gorzynski E.A., Neter E.: Separation by ethanol of common and somatic antigens of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 1964; 88: 1240-1243
- [55] Whang H.Y., Neter E.: Destruction of common antigen of *Enterobacteriaceae* by psychrophilic *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 1965; 89: 1436-1437
- [56] Whitfield C.: Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.*, 1995; 3: 178-185

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.