

## 6. STRESZCZENIE

Zakażenia powodowane przez szczepy *Salmonella* są jednym z najczęstszych problemów zdrowia publicznego. W Polsce notuje się około 8000 do 10000 przypadków salmonellozy rocznie. Roczna stopa hospitalizacji przekracza 70%. *Salmonella* to Gram-ujemna bakteria należąca do rodziny *Enterobacteriaceae*. Wyróżnia się dwie podstawowe postaci kliniczne: zatrucia pokarmowe, których objawy ograniczają się do przewodu pokarmowego oraz dur brzuszny, gdzie dochodzi do uogólnionej reakcji zapalnej wymagającej systemowej antybiotykoterapii. U części pacjentów dolegliwości mogą mieć charakter przewlekły lub powodować stan nosicielstwa.

W kolonizacji i rozwoju infekcji istotne znaczenie mają białka błony zewnętrznej komórek bakteryjnych ponieważ stanowią ważny czynnik adaptacji do warunków obcego środowiska. Ze względu na swoje usytuowanie i ekspozycję w błonie zewnętrznej bakterii, białka te pełnią także ważną rolę we wzbudzaniu odpowiedzi immunologicznej.

W stanach zapalnych wywołanych w organizmie człowieka przez bakterie zarówno Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne, pojawiają się w układzie krążenia przeciwciała skierowane przeciwko enolazie, która znana jest zasadniczo jako enzym szlaku glikolitycznego występujący w cytoplazmie komórek eukariota i prokariota. Enolaza w organizmie człowieka stanowi również składnik zewnętrznych błon komórkowych monocytów, leukocytów i neutrofilów. Pełni wtedy funkcję receptora dla ludzkiego plazminogenu. Również bakterie eksponują na swej powierzchni białkowe receptory plazminogenu. Takie własności receptorowe wykazuje min. in. białko enolazopodobne na powierzchni wielu bakterii. Pozwala to na proteolityczną degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej, transmigrację komórek bakteryjnych przez bariery tkankowe i kolonizacja infekowanego organizmu przez bakterie.

W procesie ewolucji enolaza zachowała wysoce konserwatywną strukturę. W związku z tym można spodziewać się pewnego podobieństwa strukturalnego enolazy występującej w organizmie człowieka i enolazy eksponowanej na powierzchni błon zewnętrznych komórek bakteryjnych. Istnienie epitopów podobnych strukturalnie do występujących na antygenach gospodarza prowadzi do naruszenia równowagi organizmu człowieka w tolerowaniu własnych struktur białkowych. Przeciwciała wytworzone przeciwko obcym antygenom mogą wykazywać reaktywność krzyżową z epitopami rodzimych cząsteczek białkowych gospodarza. Prowadzi to do rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym.

W niniejszej pracy zbadano właściwości immunologiczne enolaz bakteryjnych. Oczyszczono enolazę cytozolową z pałeczek *Salmonella*. Otrzymano również przeciwciała

anty enolaza cytozolowa, które wykorzystano do zbadania reakcji krzyżowych z izomerami  $\alpha$ - i  $\beta$ -enolazy ludzkiej. Sprawdzone również wiązanie przeciwciał skierowanych przeciwko enolazom ludzkim z białkami błonowymi *Salmonella*. Technika immunoblotingu zbadano rolę receptorową błonowej enolazy *Salmonella* jako receptora plazminogenu. Poprzez testy immunoenzymatyczne wykrywano obecność przeciwciał skierowanych przeciwko enolazie cytozolowej *Salmonella* w surowicy pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.

Przeprowadzone badania wykazały, że białka błonowe *Salmonella* są rozpoznawane przez przeciwciała skierowane przeciwko enolazie cytozolowej tej bakterii, co świadczy o podobnej budowie strukturalnej enolazy znajdującej się w cytoplazmie i w błonie zewnętrznej komórek *Salmonella*. Wykazane reakcje krzyżowe białek błonowych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko enolazom ludzkim wskazują na udział enolazy błonowej tej bakterii w generowaniu procesów autoimmunologicznych jako skutek zjawiska mimikry cząsteczkowej. Potwierdzono również konserwatywną strukturę białek enolazowych bakterii w testach z przeciwciałami przeciwko enolazie *Klebsiella pneumoniae*. Wykazano, że bakteryjne białka błonowe reagujące krzyżowo z przeciwciałami anty-enolaza ludzka wiążą plazminogen ludzki, co może świadczyć o udziale enolazy błonowej w inwazyjności pałeczek *Salmonella*. W surowicach pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgG i IgM tworzących kompleksy z enolazą cytozolową bakterii bakterii *Salmonella*, co może sugerować rolę białek enolazowych w etiologii ostrych i przewlekłych procesów reumatoidalnych.

## 7. ABSTRACT

Infections caused by *Salmonella* strains are one of the most common public health problems. In Poland there are about 8000 to 10,000 cases of salmonellosis per year. The annual hospitalization rate is 70%. *Salmonella* is a Gram-negative bacterium belonging to the *Enterobacteriaceae* family. There are two basic clinical forms of *Salmonella* infections: food poisoning, when symptoms are limited to the gastrointestinal tract, and typhoid fever, where there is a generalized inflammatory reaction that requires systemic antibiotic therapy. In some patients, these syndromes may be chronic or can cause a carrier state.

In colonization and development of infection, the outer membrane proteins of bacterial cells are an important factor in adapting to the foreign environment. Due to their location and exposures in the outer membrane of the bacteria, these proteins also play an important role in stimulating the immune response.

In the inflammatory conditions induced both by Gram-positive and Gram-negative bacteria the anti-enolase antibodies appear in the circulatory system of human body. Enolase is generally known as the glycolytic pathway enzyme present in the cytoplasm of eukaryotic and prokaryotic cells. Enolase in the human body is also a component of the outer cell membranes of monocytes, leukocytes and neutrophils, where it functions as a receptor for human plasminogen. The bacteria also exhibit plasminogen receptors on their surface. Such receptor properties for enzyme-like protein on the surface were described for many bacteria. This gives the opportunity to proteolytic degradation of the extracellular matrix components, during infection. It allows to migrate the bacterial cells through the tissue barriers and colonizes the infected organism by bacteria.

In the evolution process the enolase has maintained a highly conservative structure. Hence, some similarities can be expected between the structural enolase of the human and enolase exposed on the outer membrane surface of bacterial cells. The existence of epitopes structurally similar to host antigens leads to a disorder of the human body balance in tolerance of its own protein structures. Antibodies produced against foreign antigens may exhibit cross-reactivity to epitopes of the native host protein molecules. This leads to the development of autoimmune diseases.

We investigated immunological properties of bacterial enolase. The cytosolic enolase was purified from *Salmonella* cells. Antibodies against cytosolic enolase were used to study cross reactions with human  $\alpha$ - and  $\beta$ -enolase isomers. Binding of antibodies directed against human enolases to *Salmonella* membrane proteins was also tested. We studied the role of *Salmonella* membrane enolase as a plasminogen receptor using immunoblotting methods.

The antibodies recognizing *Salmonella* cytosolic enolase were detected with immunoenzymatic assays in patients with rheumatoid arthritis.

Our studies have shown that *Salmonella* membrane proteins react with antibodies directed against the cytosolic enolase of these bacteria, indicating a similar structure of the structural enolase found in the cytoplasm and in the outer membrane of *Salmonella* cells. The cross-reactivity of membrane proteins with anti-human enolase antibodies demonstrates the membrane enolase of this bacterium that plays the role in the generation of autoimmune processes as a consequence of the molecular mimicry. The conservative structure of bacterial enolase proteins was also tested in assays with anti-cytosolic enolase from *Klebsiella pneumoniae* cells. Bacterial proteins, which showed cross-reactivity with human anti-enolase antibodies, have been shown to bind human plasminogen, which may be indicative of the involvement of membrane enolase in invasiveness of *Salmonella*. In sera of patients with rheumatoid arthritis, the presence of IgG and IgM antibodies that bind to the cytosolic enolase of *Salmonella* has been demonstrated, that may suggest the role of enolase proteins in the etiology of acute and chronic rheumatoid processes.