Molekularne podstawy i efekty biologiczne oddziaływań endotoksyn z ludzką fikoliną H i lektyną wiążącą mannan

STRESZCZENIE

Układ dopełniacza jest jednym z najważniejszych elementów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i odpowiada za eliminację patogenów z organizmu. Spośród trzech dróg aktywacji dopełniacza, droga lektynowa (LP) odgrywa ważną rolę w oddziaływaniu z polisacharydami bakterii Gram-ujemnych, w tym z lipopolisacharydami (LPS, endotoksyna). Cząsteczkami odpowiedzialnymi za inicjację LP u ludzi są: ludzka lektyna wiążąca mannan (MBL), kolektyna-11 (CL-11), fikolina-1, fikolina-2 oraz fikolina-3. Myszy posiadają odpowiedniki dla części z ww. białek.

MBL i fikolina-3 w kompleksie z proteazami serynowymi MASP, oddziałują z ligandami obecnymi na powierzchni patogenów, co prowadzi do aktywacji LP układu dopełniacza i w konsekwencji inaktywacji mikroorganizmów. Aktywacja LP inicjowana przez oddziaływanie tych kompleksów, w odróżnieniu od innych mechanizmów odpornościowych, charakteryzuje się stosunkowo małą specyficznością względem ligandów (rozpoznawane jest szerokie spektrum struktur patogenów wykazujące pewne charakterystyczne cechy strukturalne) oraz szybkim czasem reakcji. Zarówno fikolina-3, jak i MBL występują w relatywnie wysokim stężeniu, w porównaniu do pozostałych cząsteczek aktywujących LP. Białka te wykazują wiele podobnych cech pod względem ogólnej budowy. Główne różnice dotyczą rodzaju i liczby rozpoznawanych przez nie ligandów oraz wiedzy na temat ich znaczenia dla odporności i patogenezy chorób zakaźnych, w tym uogólnionych zakażeń szpitalnych i sepsy, szczególnie tych wywoływanych przez Gram-ujemne bakterie, gdzie jednym z ważniejszych czynników wirulencji jest LPS.

Cząsteczki, które wybrano do badań objętych niniejszą pracą, MBL i fikolina-3, różnią się diametralnie pod względem liczby zidentyfikowanych dla nich ligandów oraz charakterystyki molekularnych podstaw oddziaływań. MBL reprezentuje grupę, dla której zidentyfikowano dotychczas wiele ligandów, włączając LPS, oraz zaprezentowano model oddziaływania z resztami cukrowymi i jonami Ca^{2+}. Przy czym informacje dotyczące molekularnych podstaw oddziaływania z LPS i ich efektów biologicznych ograniczone były

dotychczas głównie do LPS zawierających polisacharydy O-swoiste (O-PS) w postaci homopolimerów mannozy i ich zdolności do wywoływania wstrząsu endotoksycznego wczesnej fazy (anafilaktoidalnego) u myszy. W odróżnieniu od MBL, zidentyfikowano dotychczas jedynie trzy naturalnie występujące ligandy dla fikoliny-3, z których dwa (O-PS LPS *Hafnia alvei*) zostały opisane przez pracowników Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek. Stanowiło to podstawę do kontynuacji poszukiwań ligandów, rozpoczęcia pionierskich badań nad molekularnymi podstawami oddziaływań fikoliny-3 ze zidentyfikowanymi LPS oraz kontynuacji prac nad biologicznymi skutkami utworzenia takich kompleksów.

LPS jest integralnym składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych i zbudowany jest z zakotwiczonego w błonie lipidu A, oligosacharydu rdzenia (OS rdzenia) oraz najbardziej dystalnej i jednocześnie zmiennej części, którą jest łańcuch O-swoisty (O-PS) zbudowany z powtarzających się oligocukrowych podjednostek (RU). W przebiegu uogólnionych zakażeń szpitalnych i sepsy wywołanej przez bakterie Gram-ujemne może nastąpić rozwój wstrząsu endotoksycznego (wstrząsu późnej fazy), który w efekcie często prowadzi do śmierci. Mechanizm rozwoju tego zjawiska opiera się m. in. na interakcji kompleksu TLR4:MD2:CD14 z częścią lipidu A LPS. Z drugiej strony, w modelu mysim po podaniu LPS o określonej strukturze aktywującej LP w sposób zależny od MBL dochodzi do rozwoju wstrząsu anafilaktoidalnego, a obserwowane aktywności mogą mieć znaczenie dla zrozumienia roli dopełniacza w patogenezie sepsy. W obu przypadkach ogromną rolę odgrywa budowa strukturalna LPS, ponieważ od niej zależy mechanizm oddziaływania z układem immunologicznym gospodarza oraz ryzyko wystąpienia powikłań oraz przebieg infekcji.

W niniejszej pracy badano molekularne podstawy i efekty biologiczne oddziaływań endotoksyn z dwoma białkami aktywującymi LP – fikoliną-3 i MBL.

W przypadku MBL wykazano, że ligandy występują powszechnie wśród lipopolisacharydów z bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae.* Zidentyfikowano 113 nowych ligandów spośród 182 przebadanych LPS pochodzących w większości z gładkich bakterii Gram-ujemnych, takich jak *H. alvei, Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae* i *Plesiomonas shigelloides*. Regionem LPS rozpoznawanym przez MBL był w większości przypadków oligosacharyd (OS) rdzenia, który w porównaniu z O-PS stanowi stosunkowo konserwatywny region LPS. Wykorzystując LPS *H. alvei* jako modelowy układ, wykazano, że regionami OS rdzeni LPS *H. alvei* odpowiedzialnymi za oddziaływanie z ludzką

MBL są zarówno OS rdzeni typu Ra oraz OS1 (typowy dla *H. alvei* oligocukier rdzenia w postaci heksasacharydu) (Ryc. 6.33), jak również OS1 podstawiony przez disacharyd L-α-D-Hep*p*3OAc-(1→4)-α-Kdo*p*. Ponadto, oddziaływanie to jest zależne od obecności charakterystycznych cukrów rozpoznawanych przez MBL (GlcNAc, Glc, Hep) w pozycjach terminalnych lub dobrze eksponowanych w strukturze LPS, głównie w regionie rdzenia zewnętrznego. Jednocześnie wykluczono charakterystyczne dla enterobakteryjnych LPS składniki, takie jak Kdo i lipid A, z grona ligandów MBL, które wskazywano wcześniej w literaturze. Ponadto, do oddziaływania regionu O-PS z MBL nie jest niezbędna obecność homopolimeru mannozy, jak ma to miejsce w przypadku znanych ligandów dla MBL, takich jak LPS *K. pneumoniae* O3 oraz *E. coli* O8 i O9, ponieważ u wszystkich zbadanych LPS *H. alvei*, oddziałujących z MBL w tym regionie, O-PS występuje w postaci heteropolisacharydu.

W odniesieniu do aktywności biologicznej, wykazano, że kompleksy MBL i LPS *H. alvei* są zdolne do aktywacji LP poprzez proteazy MASP w testach na odkładanie czynnika C4b i C4c. W przypadku LPS, w których regionem wiązanym przez MBL był O-PS oraz OS rdzenia, aktywność kompleksów była porównywalna do LPS *K. pneumoniae* O3 (O-PS w postaci homopolimeru mannozy) i niewiele niższa dla LPS, w których rozpoznawanym regionem był jedynie OS rdzenia (LPS 1209). Ponadto ludzka MBL zdolna jest do wiązania wskazanych motywów strukturalnych LPS obecnych na powierzchni bakterii, co było zależne od fazy wzrostu hodowli bakteryjnej. Stanowi to ciekawą obserwację z punktu widzenia naturalnego przebiegu zakażeń bakteryjnych i roli dopełniacza w ich zwalczaniu lub patogenezie. Największy odsetek wyznakowanych komórek obserwowano dla komórek bakteryjnych *H. alvei* znajdujących się w spoczynkowej fazie wzrostu, w której dominują formy szorstkie LPS.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyjaśnienie zdolności wybranej grupy LPS *H. alvei* do wywołania *in vivo* u myszy wstrząsu endotoksycznego wczesnej fazy. Swoistość ludzkiej MBL i mysiej MBL-C jest zbliżona i dotyczy głównie regionów OS rdzeni LPS *H. alvei* oraz OS rdzenia i O-PS LPS *K. pneumoniae* O3. Natomiast mysia MBL-A, poza oddziaływaniem z regionem OS rdzenia badanych LPS *H. alvei*, rozpoznawała ponadto region O-PS LPS *H. alvei* PCM 1200, który oddziałuje również z ludzką fikoliną-3. Reaktywność mysich fikolin-A i -B z wybranymi LPS *H. alvei* była bardzo słaba i ograniczała się regionów O-PS dwóch LPS. Wydaje się, że u myszy w celu rozpoznania takiego samego spektrum struktur docelowych, jakie jest rozpoznawane przez ludzką MBL, potrzebne są obie mysie lektyny, natomiast rolę ludzkiej fikoliny-3 częściowo może spełniać mysia MBL-A. Wykazano, że do wywołania wczesnej fazy wstrząsu, który jest konsekwencją

oddziaływania MBL ze zidentyfikowanymi LPS *H. alvei*, zdolne były nie tylko LPS zawierające region O-PS w postaci homopolimeru mannozy (LPS *K. pneumoniae* O3), ale również LPS o O-PS w postaci heteropolisacharydu (LPS *H. alvei* 1190), oraz co najważniejsze, szorstka populacja cząsteczek LPS (pozbawionych O-PS) zawierająca regiony OS rdzenia wiązane przez MBL (LPS *H. alvei* 1209). Obserwacja ta może mieć istotne znaczenie, z punktu widzenia wyjaśnienia patogenezy sepsy oraz towarzyszących jej powikłań w odniesieniu do struktury LPS, głównego antygenu powierzchniowego Gram-ujemnych bakterii. Zakładając, że MBL, czy też droga lektynowa układu dopełniacza, może mieć istotne znaczenie w wyjaśnieniu patogenezy sepsy, kluczowym aspektem interpretacji wyników klinicznych powinno być odniesienie do serotypu O patogenu, czego brakuje w większości publikacji dotyczących roli dopełniacza w patogenezie sepsy.

W przypadku fikoliny-3 zidentyfikowanych i znanych ligandów jest bardzo niewiele. Spośród 143 przebadanych LPS pochodzących od gładkich bakterii Gram-ujemnych *Proteus* spp., *K. pneumoniae* i *P. shigelloides* zidentyfikowano jedynie 4 nowe ligandy dla fikoliny-3, którymi są regiony O-PS LPS *P. vulgaris* O4 (szczep 9/57), *P. penneri* O58 (szczep 12), LPS *P. shigelloides* O41 (szczep 48/89) i O50 (szczep 102/89), które dołączyły do grupy LPS obejmującej jedynie LPS *H. alvei* 23, PCM 1200, 1203, 1205.

Etapami wstępnymi dla kluczowych badań nad molekularnymi podstawami i efektami biologicznymi oddziaływania fikoliny-3 z LPS była analiza strukturalna produktów degradacji LPS *H. alvei* 1200 i *Proteus* spp., izolacja czystych oligosacharydów odpowiednich do badań SPR i STD NMR, przy pomocy opracowanej w niniejszej pracy metody chromatografii oddziaływań hydrofilowych na złożu ZIC®-HILIC, oraz izolacja fikoliny-3 z osocza ludzkiego. W ramach prac przygotowawczych opracowano metodę pozwalająca otrzymać ok. 1,3 mg fikoliny-3 z 500 ml osocza. Metoda składała się z następujących etapów: (i) precypitacji białek PEG6000 według metody Zacho i współpracowników [Zacho i in., 2012]; (ii) inkubacji z drożdżami *S. cerevisiae* i L-Fuc w celu usunięcia MBL i fikoliny-2; (iii) chromatografii powinowactwa na złożu O-PS 1200-Sefaroza CL-4B wykorzystującym specyficzne wiązanie fikoliny-3 do O-PS LPS *H. alvei* 1200 [Swierzko i in., 2012]; oraz (iv) wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) opartą na chromatografii wykluczania (SEC).

Analiza strukturalna dwóch nowo odkrytych ligandów dla fikoliny-3, LPS *P. vulgaris* 9/57 i *P. penneri* 12, potwierdziła opublikowane wcześniej struktury O-PS oraz wykazała, że niektóre z zaobserwowanych fragmentów strukturalnych nie odpowiadały danym

literaturowym. Do analiz oddziaływań międzycząsteczkowych techniką SPR wykorzystano frakcje I (O-PS LPS) i II obu bakterii, jak również frakcje O-PS LPS *H. alvei* PCM 1200. W przypadku *P. penneri* 12 we frakcji II znajdowały się m.in. struktury złożone z oligocukru $[RU]_3$ zawierającego jedną grupę O-acetylową. Frakcja II *P. vulgaris* 9/57 zawierała m.in. $[RU]_2$ lub $[RU]_3$ połączone z fragmentami OS rdzenia. Rekombinowana fikolina-3 oddziaływała ze wszystkimi badanymi frakcjami (zależnie od stężenia analitów), wykazując większe powinowactwo do frakcji I (O-PS LPS), charakteryzujących się wyższym stopniem polimeryzacji. Ponadto, siła oddziaływania fikoliny-3 z frakcjami *P. vulgaris* 9/57 była większa niż w przypadku *P. penneri* 12. W obu przypadkach nie wyizolowano frakcji odpowiednich dla badań oddziaływań metodą STD-NMR. Wyniki analiz SPR wskazują na bardzo silne oddziaływania fikoliny-3 z O-PS LPS *H. alvei* 1200. Stała K_D dla oddziaływania z oligocukrem $[RU]_2$-[Hep]-Kdo wynosiła $3{,}2 \cdot 10^{-9}$ M.

Swoistość oddziaływania rekombinowanej i izolowanej z osocza fikoliny-3 względem monocukrów i O-PS jest podobna. W analizach SPR wykorzystano monocukry oraz O-PS LPS *H. alvei* 1200, *P. vulgaris* 9/57 i *P. penneri* 12. Monocukrami rozpoznawanymi przez rekombinowaną fikolinę-3 są: D-Glc*p*A, D-Gal*p*A, D-Qui*p*NAc, D-Man*p*NAc, L-Ara*p*, D-Fuc*p*. Obie formy białka wykazywały wyższe powinowactwo do O-PS *P. vulgaris* 9/57.

Badania dotyczące mapowania motywu strukturalnego w O-PS LPS *H. alvei* 1200 (fragment RU-[Hep]-Kdo) przy pomocy metody STD-NMR umożliwiły wytypowanie protonów H2-H6 i grupy N-acetamidowej reszty →3)-β-D-Qui*p*4NAc-(1→ oraz H1 i H2 →1)-Gro-(3-P→ jako biorących udział w oddziaływaniu zarówno z rekombinowaną, jak i izolowaną z osocza fikoliną-3.

Kompleksy fikoliny-3/MBL:MASP oddziałujące z O-PS LPS *H. alvei* 1200, *P. vulgaris* 9/57 (O4), *P. penneri* 12 (O58), *P. shigelloides* 48/89 i *P. shigelloides* 102/89 mają znaczenie biologiczne, tj. obserwowano ich zdolność do aktywacji LP dopełniacza (aktywacja składnika C4) w warunkach *in vitro*. Najsilniejsze wiązanie surowiczej fikoliny-3 stwierdzono w przypadku LPS *P. vulgaris* 9/57, *P. shigelloides* 48/89 oraz *H. alvei* 1200. Otrzymane wyniki dla LPS *P. vulgaris* 9/57 i *P. penneri* 12 korespondują z wynikami uzyskanymi w analizach SPR, w których obie formy fikoliny-3 wykazywały większe powinowactwo do O-PS LPS *P. vulgaris* 9/57. Podobny wzór reaktywności obserwowano badając zdolność badanych LPS do aktywacji C4 na drodze lektynowej (zależnej przede wszystkim od aktywności proteazy MASP-2) – najsilniejszą depozycję składnika C4c obserwowano dla LPS *P. vulgaris* 9/57, *P. shigelloides* 48/89 oraz *H. alvei* 1200. Zaskakujące

wyniki otrzymano badając aktywność proteazy MASP-1. Podczas gdy prawie wszystkie badane LPS aktywowały MASP-1 w podobnym, bardzo niskim stopniu, to zdolność ta dla LPS *P. vulgaris* 9/57 była wielokrotnie wyższa. Oznacza to, że region O-PS LPS *P. vulgaris* 9/57 jest rozpoznawany nie tylko przez surowiczą fikolinę-3 i MASP-2 (jak ma to miejsce w większości badanych LPS), ale również przez MASP-1, co wyróżnia go na tle pozostałych badanych LPS.

Ciekawych wyników, w odniesieniu do aktywności biologicznych, dostarczyły doświadczenia zdobyte podczas opracowywania i optymalizacji metody izolacji fikoliny-3 z osocza ludzkiego. Optymalizacja opracowanej metody – w przeciwieństwie do innych opisanych w literaturze – pokazała, jak dużym wyzwaniem jest oczyszczanie tego typu białek. Wykazano, że w ocenie jakości i czystości tego typu preparatów należy brać pod uwagę zanieczyszczenia w postaci MBL i fikolin-1 i -2 oraz oddziaływania fikoliny-3 z immunoglobulinami (Ig) A, M i G. Opublikowane dotychczas metody nie uwzględniały monitorowania zawartości MBL i immunoglobulin, jak również poziomu białka całkowitego. Otrzymany preparat fikoliny-3 występuje w kompleksie z MASP i immunoglobulinami oraz wykazuje pełną aktywność biologiczną. Preparat jest zdolny do rozszczepiania czynników układu komplementu C3 i C4 oraz do aktywacji LP. Otrzymanie preparatu fikolina-3:MASP:Ig zamiast fikolina-3:MASP stanowi kolejny dowód na istnienie interakcji pomiędzy cząsteczkami zaangażowanymi w mechanizmy wrodzonej i nabytej odpowiedzi układu odpornościowego. Ponadto, fikolina-3 oddziaływała specyficznie i jednocześnie z ludzkimi przeciwciałami IgG i O-PS LPS *H. alvei* 1200, co wskazuje na istnienie co najmniej dwóch miejsc wiązania, specyficznych dla różnych ligandów. Wniosek koresponduje z najnowszymi odkryciami Pandy i współpracowników [2013, 2014], którzy wykazali, że dodatkowe miejsce wiązania w fikolinie3 może być aktywowane w warunkach zapalenia (zmiana stężenia jonów Ca^{2+} i pH). Opisane wyniki stanowią, obok dwóch ww. prac, trzecie doniesienie na ten temat i nowy, ciekawy kierunek dla dalszych badań.