

DOROTA TICHACZEK-GOSKA, AGNIESZKA CISOWSKA

Wybrane właściwości lipopolisacharydów bakterii Gram-ujemnych zawierających mannan w łańcuchu O-swoistym

Selected Properties of Lipopolysaccharides Possessing the Mannan as O-Specific Polysaccharides of Gram-Negative Bacteria

Department of Biology and Medical Parasitology, Silesian Piasts University of Medicine in Wrocław, Poland

Streszczenie

Lipopolisacharydy niektórych gatunków bakterii Gram-ujemnych z rodzajów *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* i *Serratia* mają mannan w O-antygenie. Bogate w mannozę lipopolisacharydy wykazują wiele aktywności immunologicznych. Lipopolisacharydy zawierające homopolimer mannozowy w łańcuchu O-swoistym znacznie silniej aktywują układ dopełniacza, niż te z heteropolimerem. Komplement może być aktywowany na drodze klasycznej, lektynowej lub alternatywnej. Droga lektynowa odgrywa znaczącą rolę jako pierwsza linia obrony organizmu wyższego przed czynnikami zakażenia. Białko wiążące mannozę (MBL), główna składowa drogi lektynowej, rozpoznaje określone cząsteczki cukrów (mannoza, N-acetyloglukozamina) obecne na powierzchni drobnoustrojów, przyczyniając się do zabicia patogenów. Wiele bakterii charakteryzuje się opornością na działanie surowicy, co jest związane ze skomplikowaną budową ich struktur powierzchniowych (Adv Clin Exp Med 2007, 16, 1, 105–112).

Słowa kluczowe: lipopolisacharyd, mannan, dopełniacz.

Abstract

Lipopolysaccharides of some Gram-negative bacteria from genera *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, and *Serratia* have the O-specific polysaccharide moieties consisting of mannan. Mannose-rich lipopolysaccharides exhibit several characteristic immunological activities. Lipopolysaccharides possessing the mannose homopolymer are much more potent in activating the complement system than these with heteropolymer. The complement system can be activated by classical, lectin or alternative pathways. The lectin pathway plays significant role in first-line host defense. Mannose-binding protein (MBL), the main component of the lectin pathway, recognizes specific carbohydrate residues (mannose, N-acetylglucosamine) on the surface of microorganisms and promotes the killing of pathogens. Many bacterial strains are resistant to complement-dependent host defense, which is related with complicated structure of their outer membrane (Adv Clin Exp Med 2007, 16, 1, 105–112).

Key words: lipopolysaccharide, mannan, complement.

Lipopolisacharyd – struktura i znaczenie biologiczne

Lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna), główna komponenta błony zewnętrznej prawie wszystkich bakterii Gram-ujemnych, jest zbudowany z trzech części: hydrofobowego lipidu A, oligosacharydowego rdzenia oraz dystalnie położonego polisacharydowego łańcucha O-swoistego (O-antygen)

[1–4]. Najbardziej strukturalnie konserwatywną częścią LPS jest lipid A, rdzeń jest regionem mniej konserwatywnym, a największą zmiennością w budowie charakteryzuje się łańcuch O-swoisty [4]. Odzwierciedleniem dużego zróżnicowania O-antygenów form gładkich bakterii Gram-ujemnych jest istnienie szerokiej gamy różnorodnych serologicznie szczepów, nawet w obrębie tego samego gatunku [5, 6]. Dzięki charakterystycznej

i unikatowej dla danego szczepu budowie, łańcuch O-swoisty odgrywa niezwykle ważną rolę jako antygen powierzchniowy bakterii Gram-ujemnych [7]. Jako najbardziej wysunięta na zewnątrz komórki składowa LPS, silnie oddziałuje ze środowiskiem i organizmem gospodarza. Nadaje bakteriom Gram-ujemnym zdolność adhezji do nabłonków. Łańcuch O-swoisty aktywuje układ dopełniacza. Sprawność tej aktywacji jest uwarunkowana prawdopodobnie kompozycją powtarzających się podjednostek cukrowych w O-antygenie [1]. Łańcuch O-swoisty jest homo- lub heteropolimerem złożonym z powtarzających się oligosacharydowych podjednostek, z których każda zawiera do ośmiu reszt monocukrowych. Podjednostki te różnią się od siebie m.in. składem chemicznym i kolejnością ułożenia cukrów, typem wiązań, odgałęzieniami bocznymi oraz zawartością niecukrowych podstawników [1, 7–9]. Różnorodność cukrów obecnych w łańcuchu O-swoistym nadaje mu charakter obojętny, kwaśny lub zasadowy. Dotychczas w strukturach O-antygenów różnych gatunków bakterii zidentyfikowano kilkadziesiąt monosacharydów oraz ich pochodnych, m.in. D-glukozę, D-mannozę, N-acetyloglukozaminę, D- i L-ramnozę, abekwozę, D-mannopiranozę i inne [10–14]. Wśród składowych O-antygenów znajdują się również związki niecukrowe, takie jak: aminokwasy, fosforany, rybitol, glicerol czy kwas sialowy [8, 15, 16].

LPS spełnia ważne funkcje biologiczne, mające ogromne znaczenie dla przebiegu procesów życiowych bakterii Gram-ujemnych. Należy jednocześnie do najważniejszych czynników decydujących o ich patogenności. Pokrywając powierzchnię komórki bakteryjnej, chroni drobnoustroj przed mechanizmami obronnymi gospodarza, kwasami żółciowymi i hydrofobowymi antybiotykami. Uwolniona do krwi endotoksyna, tworząc kompleksy ze znajdującymi się w surowicy białkami ostrej fazy, stymuluje monocyty i makrofagi, limfocyty i komórki śródbłonna naczyń krwionośnych do uwalniania produktów, takich jak: czynnik martwicy nowotworu (TNF- α), interleukiny, prostaglandyny, czynnik aktywujący płytki krwi (PAF), tlenek azotu oraz wolne rodniki [1, 2, 7].

Występowanie mannanu

Mannan jest polimerem zbudowanym z wielu powtarzających się cząsteczek D-mannozy połączonych ze sobą wiązaniem α - lub β -glikozydowym [17]. Jest materiałem zapasowym w wielu komórkach roślinnych, występuje także w ścianie komórkowej grzybów np. z rodzaju *Candida* [18]. Znajdujące się w ścianie komórkowej mykobakte-

rii lipomannan i lipoarabinomannan są ważnymi czynnikami wirulencji tych drobnoustrojów [19, 20]. Obecność mannanu obserwuje się również w O-antygenie różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych [10, 12, 21, 22]. Należą do nich szczepy z rodzajów *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* oraz *Serratia* (tab. 1).

Wśród 42 O-serotypów pałeczek z rodzaju *Citrobacter*, obecność D-mannanu stwierdzono w O-antygenach szczepów należących do serogrup O1, O7, O21 i O23 [5]. Zakwalifikowane do serogrupy O1 szczepy *C. youngae* PCM 1506, PCM 1492 oraz PCM 1493, w swoim rozgałęzionym łańcuchu O-swoistym mają powtarzającą się tetrasacharydową podjednostkę, zawierającą reszty D-mannozy, D-rybozę i D-ramnozę [5, 12]. Szczep *Citrobacter braakii* PCM 1532, należący do serogrupy O7, zawiera D-mannan w łańcuchu głównym rozgałęzionego O-antygeny oraz pojedynczą resztę D-glukozy w łańcuchu bocznym [23]. Łańcuch główny ma tę samą strukturę co liniowy O-antygen *Escherichia coli* O9, *Klebsiella pneumoniae* O3 i *Hafnia alvei* PCM 1223. Pomimo strukturalnego podobieństwa O-antygenów, nie obserwuje się reakcji krzyżowej między LPS *C. braakii* PCM 1532 a surowicą zawierającą przeciwciała przeciwko łańcuchowi O-swoistemu *H. alvei* PCM 1223. Najprawdopodobniej jest to spowodowane maskowaniem epitopów w obrębie łańcucha D-mannanowego przez resztę D-glukozy łańcucha bocznego polisacharydu *C. braakii* PCM 1532.

Pentasacharydowa powtarzająca się podjednostka O-antygeny, należące do serogrupy O21 szczepu *C. werkmanii* PCM 1554, zawiera D-glukozę, N-acetyloglukozaminę oraz trzy reszty D-mannozy, z których jedna jest O-acetylowana. Rozgałęziony trójsacharydowy fragment O-antygeny szczepu *C. werkmanii* PCM 1554 występuje także w O-antygenie szczepu *C. braakii* PCM 1532, dotychczas nie określono jednak, czy istnieje między nimi pokrewieństwo serologiczne [5].

Zakwalifikowane do serogrupy O23 szczepy *C. freundii* PCM 1556 i PCM 2352 mają trzy reszty D-mannozy oraz N-acetyloglukozaminę w łańcuchach O-swoistych [13]. Szczep PCM 1556 syntetyzuje LPS w formie półszorstkiej (SR), gdzie O-antygen łączy się z częścią rdzeniową tylko pojedynczą jednostką oligosacharydową. Szczep PCM 2352 natomiast ma więcej powtarzających się oligosacharydowych podjednostek w O-antygenie (forma gładka – S).

Nieokreślony serotypowo szczep *Citrobacter* sp. 396 zawiera cztery reszty D-mannozy oraz N-acetyloglukozaminę w łańcuchu głównym rozgałęzionego O-antygeny oraz dwa łańcuchy boczne, z których jeden ma abekwozę, a drugi D-glukozę [11].

Tabela 1. Struktury powtarzających się jednostek O-antygenów lipopolisacharydów mających mannan**Table 1.** Structures of the O-antigen repeating units of the lipopolysaccharides possessing mannan

Szczep (Strain)	Struktura powtarzającej się jednostki (Structure of the repeating unit)	Piśmiennictwo (Reference)
<i>E. coli</i> O8	α -D-Manp3Me $\rightarrow$ [3]- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$) _n	21
<i>E. coli</i> O9	$\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp(1 $\rightarrow$	24
<i>C. freundii</i> O23	$\rightarrow$ 4)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$	13
<i>C. werkmanii</i> O21	$\rightarrow$ 6)- α -D-Manp3Ac-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- - α -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)]	5
<i>C. braakii</i> O7	$\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp- (1 $\rightarrow$ α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)]	
<i>C. youngae</i> O1	$\rightarrow$ 4)- α -D-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ α -D-Ribf-(1 $\rightarrow$ 4)]	12
<i>Citrobacter</i> sp. 396	α -Abep2Ac-(1 $\rightarrow$ 3)] $\rightarrow$ 3)- α -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)]	11
<i>H. alvei</i> PCM ¹ 1223	$\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp- (1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$	10
<i>H. alvei</i> PCM 1204	$\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 2)- - β -D-Qui3N(Fo)p-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GlcAp(1 $\rightarrow$	14
<i>K. pneumoniae</i> O5	α -D-Manp3Me $\rightarrow$ [3]- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$) _n	21
<i>K. pneumoniae</i> O3	$\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp- (1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$	22
<i>S. montevideo</i>	[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)] $\rightarrow$ Man-(1 $\rightarrow$ 2)-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-Man-(1 $\rightarrow$	25
<i>S. marcescens</i> O28	$\rightarrow$ 3)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$	26

¹ Polska Kolekcja Mikroorganizmów.¹ Polish Collection of Microorganisms.

Wśród pałeczek *H. alvei* obecność D-mannanu w łańcuchu O-swoistym stwierdzono u szczepów PCM 1204 i PCM 1223. Szczep PCM 1204 zawiera dwie reszty D-mannozy w nierozgałęzionej heksasacharydowej podjednostce O-antygeny [14]. Powtarzająca się pentasacharydowa podjednostka O-antygeny szczepu PCM 1223 także nie ma łańcuchów bocznych, a jej jedyną komponentą jest D-mannoza [10]. Identyczna struktura łańcucha O-swoistego występuje u pałeczek *K. pneumoniae* O3 i *E. coli* O9 [22, 24]. Wykazano także słabą reakcję krzyżową surowicy zawierającej przeciwciała przeciwko *H. alvei* PCM 1223 z LPS szczepu *E. coli* O8, którego O-antygen ma mannan zbudowany jedynie z trzech reszt D-mannozy [10].

Wśród pałeczek *E. coli* obecność D-mannanu stwierdzono w O-antygenach szczepów należących do serogrup O8 i O9 [21, 24], a u pałeczek *K. pneumoniae* w serogrupach O5 i O3 [21, 22]. Łańcuchy O-swoiste *E. coli* O8 oraz *K. pneumoniae* O5 są serologicznie bardzo podobne lub identyczne i mają resztę 3-O-metylo-D-mannozy oraz powtarzającą się około 10 razy podjednostkę zbudowaną z trzech reszt D-mannozy [21]. Identyczną

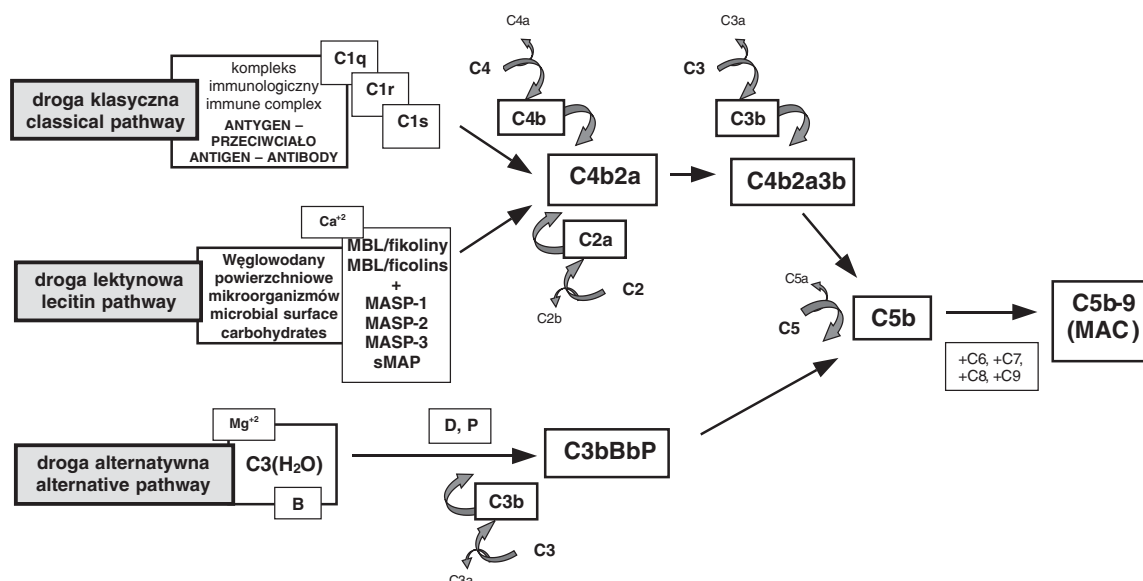
strukturę łańcucha O-swoistego mają również pałeczki *K. pneumoniae* O3 i *E. coli* O9 [22, 24]. Powtarzająca się pentasacharydowa podjednostka O-antygeny tych szczepów ma strukturę liniową, złożoną jedynie z reszt D-mannozy.

Zawierający mannan O-antygen *Salmonella montevideo* ma powtarzającą się podjednostkę, w skład której wchodzi glukoza, N-acetyloglukozamina oraz cztery cząsteczki mannozy [25].

Obecność mannanu stwierdzono także w O-antygenie szczepów *Serratia marcescens* należących do serotypu O28. W skład powtarzającej się podjednostki łańcucha O-swoistego wchodzi trzy cząsteczki D-mannozy [26].

Aktywacja układu dopełniacza

Oporność bakterii Gram-ujemnych na działanie układu immunologicznego jest bardzo ważnym czynnikiem decydującym o ich patogenności. Mechanizmy tej oporności na bakteriobójcze działanie surowicy pozostają nadal nie do końca poznane. Wiadomo jednak, że są związane ze skom-



Ryc. 1. Drogi aktywacji dopełniacza

Fig. 1. The complement activation pathways

plikowaną budową bakteryjnych struktur powierzchniowych, takich jak: lipopolisacharyd, otoczka [27] lub białka błony zewnętrznej (OMP) [28].

Kluczową rolę w mechanizmach chroniących organizm wyższy przed zakażeniami powodowanymi przez bakterie Gram-ujemne odgrywają m.in. białka układu dopełniacza (komplement). Układ dopełniacza bierze udział w opsonizacji, chemotaksji, aktywacji leukocytów oraz bezpośrednim zabijaniu bakterii i zakażonych komórek [29, 30]. Komplement składa się z około 25 białek o charakterze enzymatycznym produkowanych głównie przez komórki wątroby oraz monocyty/makrofagi. Działanie białek dopełniacza jest kontrolowane przez ponad 10 czynników, m.in.: C1-INH (inhibitor C1), fI i fH (czynniki I oraz H), DAF (CD55), MCP (CD46) i inne [8, 31]. Większość białek dopełniacza krąży we krwi oraz różnych płynach ustrojowych w formie nieaktywnej. Podczas aktywacji, mającej charakter kaskadowy, nieaktywne proenzymy przekształcają się w proteazy, dla których substratami są kolejne białka układu dopełniacza. Aktywacja komplementu odbywa się na drodze klasycznej, lektynowej i alternatywnej (ryc. 1).

Droga klasyczna rozpoczyna się przyłączeniem składnika C1q do kompleksu immunologicznego, co jest sygnałem do aktywacji podjednostek C1r i C1s [29, 31]. Aktywna podjednostka C1s powoduje proteolityczny rozkład C4 oraz C2 na podjednostki a i b. Podjednostki C4b i C2a tworzą enzym – konwertazę C3 (C4b2a).

Lektynowa droga aktywacji dopełniacza jest

niezależna od przeciwciał. Polega ona na wiązaniu się (w obecności jonów Ca^{+2}) białka wiążącego mannozę (MBL – *mannose binding lectin*) z cukrami obecnymi na powierzchni różnych patogenów, takich jak: bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki [31, 32]. Siła tego wiązania zależy od rodzaju cukru i w przypadku ludzkiego MBL jest następująca: N-acetyloglukozamina > mannoza, N-acetylomannozamina, fukoza > maltoza > glukoza > galaktoza, N-acetylogalaktozamina [33]. Białko MBL krąży w surowicy w kompleksie z proteazami serynowymi MASP-1, MASP-2, MASP-3 oraz sMAP (*small MBL-associated protein*). Związanie się MBL z cząsteczką cukru powoduje przekształcenie proenzymów proteaz serynowych, zawierających jeden polipeptyd, w aktywne formy zbudowane z dwóch łańcuchów polipeptydowych (H-high i L-light). Stwierdzono, że MASP-1 rozszczepia składowe C3 i C2 dopełniacza, a MASP-2 rozbija składowe C4 i C2. Wynikiem tych oddziaływań jest utworzenie konwertazy C3 (C4b2a) [30, 34]. Funkcja MASP-3 polega na blokowaniu aktywności MASP-2, a znaczenie sMAP pozostaje niewyjaśnione [30, 31, 35]. Droga lektynowa może być aktywowana także przez grupę białek zwanych fikolinami, które podobnie jak MBL mają zdolność wiązania się z proteazami serynowymi. U ludzi zidentyfikowano trzy rodzaje fikolin nazwanych: L, H i M. Zaobserwowano, że fikoliny L i H aktywują dopełniacz na drodze lektynowej w powiązaniu z białkami MASP. Nie dowiedziono, czy podobną aktywność ma również fikolina M. Wykazano natomiast, że może ona działać jako receptor umiej-

scowiony na komórkach żernych. Jest on obecny na powierzchni krążących we krwi monocytów oraz makrofagów w płucach i śledzionie. Ludzkie fikoliny wiążą się z N-acetyloglukozaminą, ale nie z cząsteczkami mannozy. Fikolina H ma ponadto zdolność łączenia się z N-acetylogalaktozaminą [30, 31, 35].

Aktywacja komplementu na drodze alternatywnej odbywa się spontanicznie i nie wymaga udziału przeciwciał. Do aktywatorów tej drogi zalicza się bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (szczególnie polisacharydy ścian bakteryjnych), wirusy i zarażone przez nie komórki, grzyby, pierwotniaki, niektóre robaki pasożytnicze oraz komórki nowotworowe. W początkowej fazie aktywacji pobudzona forma czynnika C3, C3(H₂O), wiąże się w obecności jonów Mg⁺² z czynnikiem B. Powstały kompleks C3(H₂O)B oddziałuje z białkiem D, które powoduje oddysocjowanie podjednostki Ba. Następuje hydroliza C3 do C3a i C3b. Utworzona w ten sposób konwertaza C3 (C3bBbP) jest stabilizowana properdyną (P) [29, 31].

Powstałe konwertazy wszystkich trzech dróg aktywują czynnik C3, w wyniku czego powstają: podjednostka C3a o charakterze anafilatoksyny oraz C3b, mająca zdolność wiązania się do błony docelowej. Cząsteczki C3b są również składową konwertaz C5 drogi klasycznej i lektynowej (C4b2a3b) oraz drogi alternatywnej (C3bBbP). Powodują proteolizę czynnika C5 na C5a i C5b. Fragment C5b przyłącza kolejno pozostałe składniki dopełniacza (C6, C7, C8 i C9), tworząc w błonie komórki docelowej kompleks atakujący błonę C5b-9 (MAC). MAC uszkadza błonę przez tworzenie w niej kanałów, co prowadzi do zaburzeń gospodarki jonowej, nieodwracalnych zmian w metabolizmie komórki, a w rezultacie do jej śmierci [29, 31].

Biologiczne właściwości mannanu

Biologiczne znaczenie mannanu jako składnika łańcucha O-swoistego lipopolisacharydów bakteryjnych jest stosunkowo słabo poznane. Znaczenie jego obecności w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej makroorganizmu potwierdzają badania przeprowadzone w kilku ośrodkach. Yokochi et al. zaobserwowali, że LPS zawierający mannan, wyizolowany ze szczepu *K. pneumoniae* O3, wykazywał ponad 100 razy silniejszą zdolność aktywacji komplementu surowicy ludzkiej, w porównaniu z lipopolisacharydami niemającymi cząsteczek mannanu w łańcuchu O-swoistym, wyizolowanych ze szczepów *E. coli* O111, *E. coli*

O55, *E. coli* O4 i *S. enteritidis*. Ci sami autorzy wykazali, że lipopolisacharydy izolowane ze szczepów *K. pneumoniae* O5, *E. coli* O8 i O9, zawierające podobnie jak *K. pneumoniae* O3, liniowy homopolimer mannozowy w łańcuchu O-swoistym, charakteryzowały się zbliżonym poziomem zdolności do aktywacji komplementu ludzkiej surowicy [36]. Sugeruje to, że mannan obecny w łańcuchu O-swoistym LPS, odgrywa kluczową rolę w jego nadzwyczaj dużej zdolności do aktywacji układu dopełniacza. Schweinle et al. wykazali, że wiązanie się MBL do bogatego w mannozę LPS szczepu *S. montevideo* wzmacnia aktywację komplementu, czego rezultatem jest opsonizacja i zabicie bakterii przez komórki fagocytyczne [37]. Uwarunkowane jest to wiązaniem się O-antygeny do MBL oraz aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej [38]. Grossman et al. [39] wykazali, że podatność pałeczek *S. montevideo* na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej zależy od ilości powtarzających się jednostek mannanowych w O-antygenie danej cząsteczki LPS oraz od procentowej zawartości cząsteczek lipopolisacharydów mających długie łańcuchy O-swoiste. Oporność bakterii na bakteriobójcze działanie surowicy obserwowano, gdy przeciętna liczba jednostek mannanowych wynosiła 4,3 oraz 20–23% cząsteczek LPS miało więcej niż 14 powtórzeń jednostki manganowej [39].

Ohta et al. [40] stwierdzili, że lipopolisacharydy szczepów *K. pneumoniae* O3 i *E. coli* O9 mają silne właściwości wzmacniające swoistą odpowiedź immunologiczną organizmu. Homopolimery mannozowe zawarte w łańcuchach O-swoistych tych lipopolisacharydów silnie wzmacniały odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów T. Lipopolisacharydy tych bakterii pozbawione części O-swoistej charakteryzowały się znacznie większą zdolnością do aktywacji poliklonalnych limfocytów B. Inni autorzy wykazali, że podskórna iniekcja mieszanki ekstraktu tkankowego z tarczycy i LPS *K. pneumoniae* O3 ośmiotygodniowym myszom, wywoływała silne zmiany zapalne w obrębie całej tarczycy [41]. Podawanie mieszanki zawierającej LPS *K. pneumoniae* O5, *E. coli* O8 lub *E. coli* O9 wywoływało znacznie słabszą odpowiedź, umiejscowioną jedynie wokół naczyń. Podawanie samego LPS, samego ekstraktu tkankowego, a także ekstraktu z LPS wyizolowanym ze szczepów posiadających heteropolisacharydowy łańcuch O-swoisty (*E. coli* O55, *E. coli* O111, *E. coli* O128, *S. typhi*, *S. enteritidis*) nie wywoływało żadnych zmian w tarczycy immunizowanych myszy. Użycie ponadto form szorstkich LPS *K. pneumoniae* O3 również nie powodowało żadnych zmian tkankowych. Znaczenie mannozowych homopolimerów wchodzących w skład łań-

cuchów O-swoistych LPS w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu wyższego, potwierdzają również doświadczenia Paeng et al. [42]. Autorzy uzyskali rekombinanty pałeczek *E. coli* K-12 z wyizolowanymi ze szczepów *E. coli* O8, *E. coli* O9 i *K. pneumoniae* O3 genami *rfb*, które są odpowiedzialne za zdolność do wytwarzania homopolimeru mannozowego w łańcuchu O-swoistym. Zrekombinowany LPS wykazywał silne właściwości aktywacji białek dopełniacza, wzmacniał swoistą odpowiedź immunologiczną i aktywność węzłów chłonnych. Działanie to było równie silne, jak działanie lipopolisacharydów pochodzących od *E. coli* O8, *E. coli* O9 i *K. pneumoniae* O3. Badania Paeng et al. [42] wykazały, że zdolność do aktywacji limfocytów B *in vitro* i *in vivo* oraz produkcji cytokin (TNF- α , IFN- γ) *in vivo* nie jest związana z obecnością mannanu w O-antygenie.

Przeprowadzone badania sugerują, że MBL, a tym samym aktywacja dopełniacza na drodze lektynowej, odgrywa znaczącą rolę w początkowym stadium zakażenia jako pierwsza linia obrony organizmu wyższego przed czynnikami zakażenia [32, 43]. U ludzi ma to szczególne znaczenie w 6–18 miesiącu życia oraz w okresie płodowym, kiedy nie są jeszcze w pełni wykształcone mechanizmy odporności swoistej. Interakcję MBL z po-

wierzchnią komórek docelowych potwierdzono badaniami nad zdolnością łączenia się tej kolektyny do cukrów obecnych w strukturach powierzchniowych (np. LPS) pewnych drobnoustrojów. Przyczyny oporności pałeczek Gram-ujemnych na działanie ludzkiej surowicy mają charakter wieloczynnikowy. Bakterie zawierające mannan w łańcuchu O-swoistym, należące do jednego gatunku i serotypu, różnią się stopniem podatności na ludzką surowicę. Są wśród nich zarówno szczepy odporne, jak i wrażliwe na działanie dopełniacza, co wskazuje, że obecność mannanu może, lecz nie musi być czynnikiem ich zjadliwości. Wykazano również, że zmiany w kompozycji cukrów mogą mieć istotny wpływ na osłabienie wiązania się MBL z powierzchnią komórki, co może być ważnym mechanizmem oporności tych bakterii na bakteriobójcze działanie surowicy. Nie można jednak obecnie jednoznacznie przewidzieć jaka będzie interakcja MBL z konkretnym organizmem, mimo iż w wielu przypadkach sekwencja cząsteczek cukrów w strukturach powierzchniowych określonego patogenu jest bardzo dobrze znana. Istnieje więc silna potrzeba ciągłego poznawania mechanizmów wirulencji drobnoustrojów, co umożliwi znalezienie skuteczniejszych sposobów walki z drobnoustrojami.

Piśmiennictwo

- [1] Łukasiewicz J, Ługowski C: Biologiczna aktywność lipopolisacharydu. *Post Hig Med Dośw* 2003, 57, 33–53.
- [2] Alexander C, Rietschel ET: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001, 7, 167–202.
- [3] Raetz Ch, Whitfield Ch: Lipopolysaccharide endotoxins. *Ann Rev Biochem* 2002, 71, 635–700.
- [4] Knirel YA, Kocharova NA, Bystrova OV, Katzenellenbogen E, Gamian A: Structures and serology of the O-Specific polysaccharides of bacteria of the genus *Citrobacter*. *Arch Immunol Ther Exp* 2002, 50, 379–391.
- [5] Vinogradov E, Frirdich E, MacLean LL, Perry MB, Petresen BO, Duus JO, Whitefield C: Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 2002, 277, 25070–25081.
- [6] Caroff M, Karibian D: Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003, 23, 2431–2447.
- [7] Kaszowska M: Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. *Post Hig Med Dośw* 2004, 58, 333–342.
- [8] Mielnik G, Doroszkiewicz W, Korzeniowska-Kowal A: Struktury zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych a bakteriobójcza aktywność dopełniacza. *Post Mikrobiol* 2004, 43, 39–57.
- [9] Jann B, Reske K, Jann K: Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem* 1975, 60, 239–246.
- [10] Katzenellenbogen E, Kocharova NA, Zatonsky GV, Kübler-Kielb J, Gamian A, Shashkov AS, Knirel YA, Romanowska E: Structural and serological studies on *Hafnia alvei* O-specific polysaccharide of α -D-mannan type isolated from the lipopolysaccharide of strain PCM 1223. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001, 30, 223–227.
- [11] Jann B, Prehm P, Jann K: *Citrobacter* O-Antigens: Structure of the O-antigenic polysaccharide from *Citrobacter* sp. 396. *J Bacteriol* 1978, 134, 462–469.
- [12] Kocharova NA, Mieszala M, Zatonsky GV, Staniszevska M, Shashkov AS, Gamian A, Knirel YA: Structure of the O-specific polysaccharide of *Citrobacter* O1 containing an α -D-ribofuranosyl group. *Carbohydr Res* 2004, 339, 321–325.
- [13] Katzenellenbogen E, Ekiel I, Romanowska E: The structure of the O-specific polysaccharide chain from *Citrobacter* O23-lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* 1988, 179, 349–357.
- [14] Katzenellenbogen E, Romanowska E, Kocharova NA, Shashkov AS, Knirel YA, Kochetkov NK: Structure of the polysaccharide of *Hania alvei* 1204 containing 3,6-dideoxy-3-formamido-D-glucose. *Carbohydr Res* 1995, 273, 187–195.

- [15] Gamian A, Jones C, Lipinski T, Korzeniowska-Kowal A, Ravenscroft N: Structure of the sialic acid-containing O-specific polysaccharide from *Salmonella enterica* serovar Toucra O48 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 2000, 267, 3160–3167.
- [16] Katzenellenbogen E, Kocharova NA, Zatonsky GV, Mieszala M, Gamian A, Bogulska M, Shashkov AS, Romanowska E, Knirel YA: Immunochemical studies of the lipopolysaccharide O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* PCM 1199 related to *H. alvei* PCM 1205. *Eur J Biochem* 1998, 251, 980–985.
- [17] Morrison RT, Boyd RN: Chemia organiczna. Tom 2. PWN, Warszawa 1990, wyd. drugie, 294–328.
- [18] Kobayashi H, Suzuki J, Tanaka S, Kiuchi Y, Oyamada H, Iwadate N, Suzuki H, Shibada N, Suzuki S, Oka-wa Y: Structure of a cell wall mannan from the pathogenic yeast, *Candida catenulate*: assignment of H nuclear magnetic resonance chemical shifts of the inner α -1,6-linked mannose residues substituted by a side chain. *Arch Biochem Biophys* 1997, 341, 70–74.
- [19] Prinzie S, Chatterjee D, Brennan PJ: Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* 1993, 139, 2649–2658.
- [20] Dao DN, Kremer L, Guerardel Y, Molano A, Jacobs WR, Porcelli SA, Briken V: *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* 2004, 72, 2067–2074.
- [21] Jansson P, Lonngren J, Widmalm G: Structural studies of the O-antigen polysaccharides of *Klebsiella* O5 and *Escherichia coli* O8. *Carbohydr Res* 1985, 145, 59–66.
- [22] Curvall M, Lindberg B, Lonngren J, Nimmich W: Structural studies on the *Klebsiella* O group 3 lipopolysaccharide. *Acta Chem Scand* 1973, 27, 2645–2649.
- [23] Kocharova NA, Zatonsky GV, Bystrova OV, Shashkov AS, Knirel YA, Kholodkova EV, Stanislavsky ES: Structure of the O-specific polysaccharide of *Citrobacter braakii* O7a, 3b, 1c. *Carbohydr Res* 2001, 333, 335–338.
- [24] Prehm P, Jann B, Jann K: The O9 antigen of *Escherichia coli*. Structure of the polysaccharide chain. *Eur J Biochem* 1976, 67, 53–56.
- [25] Fuller N, Staub AM: Immunochemical studies on *Salmonella*. 13. Chemical changes appearing on the specific polysaccharide of *S. cholerae suis* (6₂, 7) after its conversion by phage 14 (6, 7). *Eur J Biochem* 1968, 4, 286–300.
- [26] Aucken HM, Wilkinson SG, Pitt TL: Immunochemical characterization of two new O serotypes of *Serratia marcescens* (O27 and O28). *FEMS Microbiol Lett* 1996, 138, 77–82.
- [27] Cisowska A, Bugla-Płoskońska G, Tichaczek-Goska D, Doroszkiewicz W, Jankowski S: The susceptibility of *Escherichia coli* strains with sialic acid-containing lipopolysaccharides or capsules to the bactericidal action of normal human serum. VII Konferencja “Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii”. Warszawa, 4 grudnia 2004. Materiały naukowe: Warszawa, SGGW, 2004, 41–47.
- [28] Cisowska A, Bugla-Płoskońska G, Gamian A, Doroszkiewicz W, Jankowski S: Relationship between susceptibility to bactericidal action of serum and outer membrane protein patterns in *E. coli* K1 strains. *Pol J Environ Stud* 2005, 14, 476–482.
- [29] Sochocka M, Błach-Olszewska Z: Mechanizmy wrodzonej odporności. *Post Hig Med Dośw* 2005, 59, 250–258.
- [30] Fujita T, Matsushita M, Endo Y: The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 2004, 198, 185–202.
- [31] Sim RB, Tsiftoglou SA: Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2004, 32, 21–27.
- [32] Turner MW: The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003, 40, 423–429.
- [33] Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC: Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defence. *Immunol Today* 1994, 15, 67–74.
- [34] Endo Y, Takahashi M, Fujita T: Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* 2006, 211, 283–293.
- [35] Matsushita M, Fujita T: Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* 2001, 180, 78–85.
- [36] Yokochi T, Inoue Y, Kimura Y, Kato N: Strong interaction of lipopolysaccharides possessing the mannose homopolysaccharides with complement and its relation to adjuvant action. *J Immunol* 1990, 144, 3106–3110.
- [37] Schweinle JE, Ezekowitz RAB, Tenner AJ, Kuhlman M, Joiner KA: Human mannose-binding protein activates the alternative complement pathway and enhances serum bactericidal activity on a mannose-rich isolate of *Salmonella*. *J Clin Invest* 1989, 84, 1821–1829.
- [38] Jiang G, Sugiyama T, Kato Y, Koine N, Yokochi T: Binding of mannose-binding protein to *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide possessing the mannose homopolysaccharide as the O-specific polysaccharide and its relation to complement activation. *Infect Immun* 1995, 63, 2537–2540.
- [39] Grossman N, Schmetz MA, Foulds J, Klima EN, Jimenez V, Leive LL, Joiner KA: Lipopolysaccharide size and distribution determine serum resistance in *Salmonella montevideo*. *J Bacteriol* 1987, 169, 856–863.
- [40] Ohta M, Kido N, Hasegawa T, Ito H, Fujii Y, Arakawa Y, Komatsu T, Kato N: Contribution of the mannan O side-chains to the adjuvant action of lipopolysaccharides. *Immunol* 1987, 60, 503–507.
- [41] Yokochi T, Fukada M, Kawai M, Zhang Y, Jiang G, Takahashi K: Novel adjuvant action of lipopolysaccharides as O-specific polysaccharides on immune responses to nonimmunogenic autoantigens in mice. *Infect Immun* 1992, 60, 4953–4956.
- [42] Paeng N, Kido N, Schmidt G, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Yokochi T: Augmented immunological activities of recombinant lipopolysaccharide possessing the mannose homopolymer as the O-specific polysaccharide. *Infect Immun* 1996, 64, 305–309.
- [43] Jack DL, Turner MW: Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem Soc Trans* 2003, 31, 753–757.

Address for correspondence:

Agnieszka Cisowska
Department of Biology and Medical Parasitology
Silesian Piasts University of Medicine
Mikulicza-Radeckiego 9
50-367 Wrocław
Poland
tel. +48 71 784-15-20
cisowska@biolog.am.wroc.pl

Conflict of interest: None declared

Received: 25.07.2006

Revised: 5.09.2006

Accepted: 19.10.2006

Praca wpłynęła do Redakcji: 25.07.2006 r.

Po recenzji: 5.09.2006 r.

Zaakceptowano do druku: 19.10.2006 r.