

Wspólne elementy w strukturze antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* jako uniwersalne składniki szczepionek

STRESZCZENIE

Krztusiec jest wysoce zakaźną chorobą wieku dziecięcego, której czynnikiem etiologicznym jest bakteria *Bordetella pertussis*. Objawem patognomicznym jest silny, napadowy i bezproduktywny kaszel, pogarszający się w nocy i powodujący wymioty, bezdech oraz sinicę. Wśród zaszczepionych dzieci, nastolatków oraz dorosłych objawy mogą być znacznie łagodniejsze i mniej specyficzne, a więc trudniejsze do zdiagnozowania (WHO, 2014). Przed wprowadzeniem szczepionki, w Polsce corocznie diagnozowano kilkadziesiąt tysięcy przypadków krztuśca. Wprowadzenie szczepionki pełnokomórkowej (DTwP) oraz obowiązku szczepień okazało się skuteczną metodą zapobiegania zakażeniom. Ze względu na reaktogenność, wywoływaną obecnością lipopolisacharydu, szczepionki DTwP zostały częściowo lub całkowicie, zastąpione szczepionkami bezkomórkowymi (DTaP) zawierającymi oczyszczone białkowe antygeny bakteryjne. Jednak pomimo powszechności szczepień ochronnych obserwuje się wzrost zachorowań na krztusiec, nie tylko wśród najbardziej wrażliwej grupy - noworodków, ale również zaszczepionych nastolatków i dorosłych. Nowoczesne metody badawcze pozwalają zidentyfikować inne gatunki bakterii z rodzaju *Bordetella* wywołujące niezwykle podobne objawy chorobowe, tj. *B. parapertussis* oraz *B. holmesii* (Guthrie i in., 2010; Rodgers i in., 2013). Obecnie stosowane szczepionki nie zapewniają ochrony przed *B. holmesii*, która staje się drugim, pod względem zachorowalności, czynnikiem etiologicznym krztuśca. Niedoskonałość istniejących szczepionek jest przyczyną poszukiwań nowych antygenów szczepionkowych i powtórnego zainteresowania szczepionkami pełnokomórkowymi. Zupełnie innym podejściem jest skierowanie uwagi na niedoceniane antygeny cukrowe.

Bakteryjne polisacharydy można podzielić na 3 grupy. Pierwszą grupę tworzą lipopolisacharydy. LPS zbudowany jest z lipidu A, oligosacharydu rdzenia oraz antygeny O. Jest integralnym składnikiem osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych i indukuje powstawanie swoistych i bakteriobójczych przeciwciał (Rappuoli, 2004), wydaje się być idealnym antygenem szczepionkowym. Jego reaktogenność, wyklucza użycie LPS w natywnej formie. Jednak wyizolowane polisacharydowe fragmenty, przy zachowaniu właściwości antygenowych, tracą aktywność biologiczną. Szczepionki polisacharydowe

rozwijane są od 50 lat, ale ich główną wadą jest to, że sam polisacharyd jako antygen T – niezależny, wywołuje słabą i krótkotrwałą odpowiedź immunologiczną. Cech antygeny T – zależnego nabiera jako glikokoniugat poprzez skoniugowanie z immunogennym nośnikiem białkowym. Szczepionki glikokoniugatowe łączą w sobie właściwości antygenowe składników cukrowych jak i białkowych. Glikokoniugaty zawierające oligosacharydowe fragmenty LOS *B. pertussis* indukują produkcję przeciwciał bakteriobójczych (Koj i in., 2015). Bakterie należące do klastra *B. bronchiseptica* są blisko ze sobą spokrewnione, ale syntezują lipopolisacharydy różniące się w różnych segmentach. Wspólnych elementów poszukiwano w konserwatywnym ewolucyjnie OS rdzenia. W badaniach nad OS *Escherichia coli* wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko OS rdzenia szczepów szorstkich reagują krzyżowo z rdzeniami szczepów gładkich (Lukasiewicz i in., 2003). Dlatego niezmiernie istotne jest zidentyfikowanie wspólnych elementów antygenowych, których wyizolowane formy mogłyby stanowić składnik uniwersalnych szczepionek chroniących przed zakażeniami bakteriami z rodzaju *Bordetella*. Drugą grupę bakteryjnych glikanów, będących składnikami szczepionek, tworzą polisacharydy kapsularne (CPS). Ich rola polega na ochronie przed mechanizmami obronnymi gospodarza i ochronie komórki bakteryjnej przed wysuszeniem (Roberts, 1996). CPS z komórką związane są poprzez kotwicę lipidową. CPS wydzielany na zewnątrz bakterii zostaje przypisany do trzeciej grupy tzw. egzopolisacharydów (EPS). Według danych literaturowych niektóre *Bordetellae* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica*) produkują egzopolisacharyd Bps (ang. *Bordetella polysaccharide*), zbudowany z homopolimeru GlcNAc, który odgrywa istotną rolę w procesie wytwarzania biofilmu (Conover i in., 2010). Inne publikacje sugerują, że *B. pertussis* produkuje polisacharyd mikrokapsularny, prawdopodobnie zbudowany z homopolimeru GalNAcA, podobnie jak antygen Vi (Hoo i in., 2014; Neo i in., 2010). Jednak w żadnej ze wspomnianych prac nie zaprezentowano bezpośrednich analiz wyizolowanego EPS i CPS. W genomach *Bordetellae* zidentyfikowano geny odpowiedzialne za syntezę CPS, ale nikomu nie udało się dotąd ustalić czy polisacharydy kapsularne są rzeczywiście wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bordetella*. Te niejasności były przyczyną zainteresowania się tematem EPS oraz CPS u *Bordetellae*.

W zrealizowanej pracy przeprowadzono analizy strukturalne i serologiczne heteropolisacharydowych części LPS różnych gatunków *Bordetellae* (*B. pertussis* 186, *B. pertussis* 606, *B. parapertussis* 529, *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943). W pracy po raz pierwszy scharakteryzowano i opisano przesunięcia chemiczne dla

oligosacharydu *B. pertussis* 606, które potwierdzają, że OS *B. pertussis* 606 jest nonasacharydem pozbawionym dystalnego trójcukru. Wyniki te potwierdza również brak reakcji krzyżowej z anty-glikokoniugatowymi surowicami (anty-penta-PT, anty-penta-TTd i anty-disach-HSA) rozpoznającymi dystalny trójcukier dodekasacharydowego OS *B. pertussis* 186. Szczepy *B. bronchiseptica* 530 i *B. bronchiseptica* 1943 zidentyfikowano jako szczepy szorstkie, niesyntezyjące antygeny O. Minimalny OS *B. bronchiseptica* 530 i 1943 jest heptasacharydem. OS tych szczepów jest najkrótszym OS wśród analizowanych gatunków, co potwierdzają bardzo słabe reakcje krzyżowe z surowicami rozpoznającymi pełny OS *B. pertussis* 186 (anty-OS-TTd i anty-OS-PT). *B. parapertussis* 529 określono jako szczep gładki. Surowice anty-glikokoniugatywne (anty-penta-TTd i anty-disach-HSA) rozpoznają krzyżowo immunodominujący epitop OS *B. pertussis* 186 w LPS *B. parapertussis* 529, co sugeruje że w strukturze LPS *B. parapertussis* obecny jest dystalny trójcukier. W strukturach OS rdzenia *B. parapertussis* 529 wyróżniono dwie formy. Minimalny OS jest oktasacharydem, natomiast pełna struktura OS jest dodekasacharydem. Na podstawie przeprowadzonych badań dla posiadanych gatunków i szczepów minimalny OS rdzenia dla *Bordetellae* zdefiniowano jako heksasacharyd. Ustalono, że podstawowa struktura OS rdzenia jest zachowana pomiędzy gatunkami. Modyfikacje polegały na utracie niektórych reszt lub dodatkowym podstawieniu przez niecukrowe podstawniki. Ciekawą obserwacją jest fakt, że w trakcie analiz nie zidentyfikowano pentasacharydowego łącznika, do którego, według danych literaturowych, przyłączony jest antygen O (Preston i in., 2006). Pewnym wyjaśnieniem może być brak syntezy antygeny O przez posiadane szczepy *B. bronchiseptica*, ale tego rodzaju łącznik powinien być obecny w LPS *B. parapertussis*, która syntetyzuje antygen O.

W pracy ustalono po raz pierwszy strukturę OS rdzenia oraz antygeny O *B. holmesii* ATCC 51541, która jest nowym, ważnym czynnikiem etiologicznym krztuśca, a o której, z punktu widzenia poszukiwań nowych glikokoniugatowych szczepionek przeciwkrztuścowych, prawie nic nie wiadomo. Na podstawie analiz porównawczych widm NMR oraz MALDI-TOF MS ustalono, że OS *B. holmesii* jest identyczny z rdzeniem *B. pertussis* 606. OS jest nonasacharydem i w swojej strukturze pozbawiony jest dystalnego trójcukru, na co wskazywał również brak krzyżowych reakcji serologicznych z surowicami zawierającymi przeciwciała skierowane przeciwko immunodominującemu epitopowi *B. pertussis*. Przeprowadzone analizy technikami spektroskopii NMR, spektrometrii mas oraz metodami chemicznymi, pozwoliły ustalić

strukturę antygeny O *B. holmesii* ATCC 51541, którego pentasacharydowa podjednostka ma masę 974,32 Da i zbudowana jest wg schematu: $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 3)]\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n$.

Ze względu na rozbieżne dane literaturowe dotyczące EPS wytwarzanych przez *Bordetellae* i brak danych z analiz strukturalnych przeprowadzono analizy EPS izolowanych z medium pohodowlanego badanych gatunków i szczepów *Bordetellae* w celu izolacji i identyfikacji tych glikanów. W medium pohodowlanym rozdzielanym na kolumnie filtracji żelowej wykryto długolańcuchowe polisacharydy, które zidentyfikowano jako dwa homopolimery glukozy podstawione w pozycjach 4 i 6 $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow]$ i $[\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow]$. Wykryto również krótszy egzooligosacharyd. Technikami spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas zidentyfikowano go jako nowy heksasacharyd o masie 1235,5 Da. Ze względu na jego odmienność od hipotetycznych struktur Bps i mikrokapsuły wprowadzono nową nazwę nieopisanego dotychczas egzooligosacharydu „*Bordetella oligosaccharide*” (BOS). BOS okazał się uniwersalny wśród wszystkich badanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Zdefiniowano jego strukturę jako $\alpha\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpNAcAN-(1}\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\alpha\text{-GalpNAcAN-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GlcNAcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha/\beta\text{-GlcNAc}$. Na widmach NMR zarejestrowanych dla frakcji zawierającej BOS zidentyfikowano też sygnały -CH, -CH₂ i -CH₃ przypominające systemy spinowe kwasów tłuszczowych. Ich struktura nie została jeszcze ustalona, ale mogą one funkcjonować jako element kotwiczący BOS w zewnętrznej błonie osłony komórkowej bakterii. Na końcu redukującym BOS zidentyfikowano GlcNAc w konfiguracji zarówno α i β , do której może być przyłączona lipidowa kotwica. Jednak nie udało się wskazać bezpośredniego połączenia między BOS, a ewentualną kotwicą, ponieważ nie zidentyfikowano frakcji zawierającej BOS połączonego z kotwicą lipidową.

Surowice anty-glikokoniugatowe (anty-penta-PT, anty-OS-PT i anty-disach-HSA) oraz surowice zawierające poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko pełnym komórkom bakteryjnym *B. pertussis* (anty-SM Bp 186 i anty-SM Bp miks) rozpoznających LOS na powierzchni komórki wykazywały słabą reakcję krzyżową z BOS. W obu strukturach zidentyfikowano terminalną GlcNAc, która może być epitopem odpowiedzialnym za krzyżowe rozpoznawanie struktur. Reakcje z surowicami na pełne komórki potwierdzają przypuszczenia, że BOS może być kapsułą. Również surowica do aglutynacji szkiełkowej anty-Vi, która wg danych literaturowych, rozpoznaje swoiście GalNAcA tworzący mikrokapsułę, reaguje z BOS.

Poznanie właściwości antygenowych BOS, jego roli w kolonizacji i transmisji bakterii i możliwości zastosowania neoglikoniugatu BOS jako nowego potencjalnego składnika szczepionek przeciwkrtuścowych o szerokim spektrum ochrony wymaga dalszych badań.