

Received: 2007.11.13
Accepted: 2008.05.13
Published: 2008.06.12

Struktura chemiczna lipopolisacharydu *Helicobacter pylori* a wrodzona odpowiedź immunologiczna*

The chemical structure of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and innate immune response

Michał Arabski, Anna Koza, Wiesław Kaca

Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego w Kielcach

Streszczenie

Kolonizacja komórek błony śluzowej żołądka przez *H. pylori*, prowadząca do rozwoju przewlekłego procesu zapalnego, jest następstwem bakteryjnych procesów adaptacyjnych oraz niewielkiej skuteczności wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza na struktury bakteryjne. Celem pracy jest charakterystyka budowy chemicznej lipopolisacharydu *H. pylori* oraz jej znaczenie w mechanizmach identyfikacji przez receptory komórkowe TLR2/4 komórek nabłonkowych żołądka oraz układu immunologicznego. Przedstawiono immunogenne, immunomodulacyjne i cytotoksyczne właściwości endotoksyny *H. pylori*, a także mechanizmy unikania identyfikacji bakterii poprzez mechanizm mimikry molekularnej (antygen Lewis).

Słowa kluczowe:

H. pylori • LPS • antygeny Lewis • TLR

Summary

H. pylori is a causative agent of chronic gastritis. Gastrointestinal disorders are associated with a bacterial mechanism of adaptation to the stomach's environment and the immune responses of gastric epithelial cells. The efficacy of *H. pylori* lipopolysaccharides identification by host cells is determined by their chemical structure. This paper focuses mainly on the molecular mechanisms of innate immune evasion by *H. pylori*, the Toll-like receptor 2/4 activity of epithelial and immune system cells, and molecular mimicry (Lewis antigen).

Key words:

H. pylori • LPS • Lewis antigen • TLR

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=860574>

Word count: 2955

Tables: –

Figures: 5

References: 45

Adres autora:

dr Michał Arabski, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im. Jana Kochanowskiego, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce; e-mail: arabski@pu.kielce.pl

* Praca powstała w Zakładzie Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego dzięki wsparciu z projektu MNiSW (N N304 4114 44).

1. WPROWADZENIE

Helicobacter pylori jest jedną z najlepiej poznanych bakterii Gram-ujemnych o znaczeniu chorobotwórczym. Badania o charakterze interdyscyplinarnym z zastosowaniem nowoczesnych metod diagnostyki zakażeń *H. pylori* oraz narzędzi molekularnych mają nie tylko charakter poznawczy, lecz także kliniczny [2,34]. W 80–90% przypadkach infekcja *H. pylori* ma charakter bezobjawowy. U około 10% osób zakażonych *H. pylori* jest głównym ogniwem w łańcuchu zmian patologicznych śluzówki żołądka [13]. Zmiany chorobowe wywołane infekcją *H. pylori* są związane m.in. z właściwościami ureolitycznymi bakterii, aktywnością biologiczną białek CagA i VacA, zmiennością fazową szczepów, adhezją do powierzchni nabłonka, bakteryjnymi systemami transportu białek na powierzchnię komórki oraz niepożądanymi następstwami aktywacji mechanizmów obronnych gospodarza [4,9]. Przeżycie *H. pylori* w specyficznym środowisku żołądka jest więc z jednej strony wynikiem procesów adaptacyjnych drobnoustroju, z drugiej strony mało skuteczną odpowiedzią immunologiczną gospodarza na to zakażenie bakteryjne. Procesy te mogą prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej, który jest podstawowym etapem rozwoju choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, łącznie z procesem transformacji nowotworowej [32] (ryc. 1). Rozwój przewlekłego procesu zapalnego komórek błony śluzowej żołądka w wyniku kolonizacji przez *H. pylori* jest zależny m.in. od struktury chemicznej LPS, która warunkuje skuteczną identyfikację endotoksyny przez receptory komórek układu immunologicznego gospodarza.

Lipopolisacharyd (endotoksyna – LPS) jest jednym z głównych składników błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Heteropolimer ten jest zakotwiczony niekowalencyjnie w błonie zewnętrznej bakterii za pomocą hydrofobowego lipidu A i poprzez część rdzeniową jest połączony z hydrofilowym łańcuchem O-swoistym (antygen O), bezpośrednio oddziaływającym ze środowiskiem zewnętrznym. LPS bakterii Gram-ujemnych wykazuje dużą różnorodność zarówno pod względem właściwości fizyko-chemicznych, masy cząsteczkowej, a także struktury chemicznej. Duże zróżnicowanie strukturalne i heterogenność LPS wpływa na jego właściwości immunogenne, immunomodulacyjne i cytotoksyczne.

Celem pracy jest charakterystyka struktur chemicznych endotoksyn *H. pylori* oraz ich znaczenia w mechanizmach

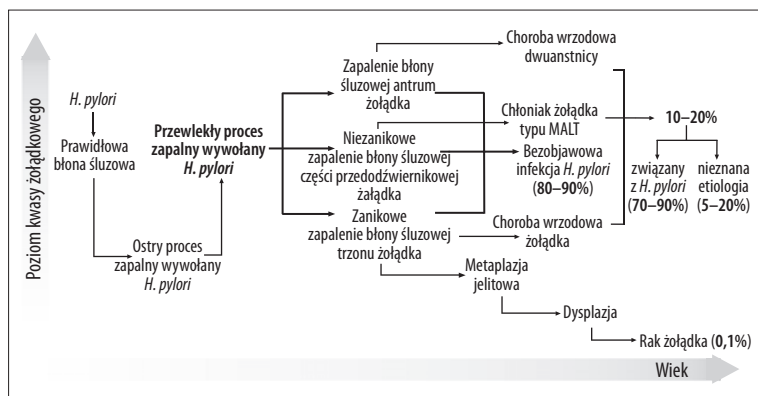
identyfikacji przez receptory komórkowe we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

2. STRUKTURA CHEMICZNA ANTYGENU O *H. PYLORI* A ZJAWISKO MIMIKRY MOLEKULARNEJ

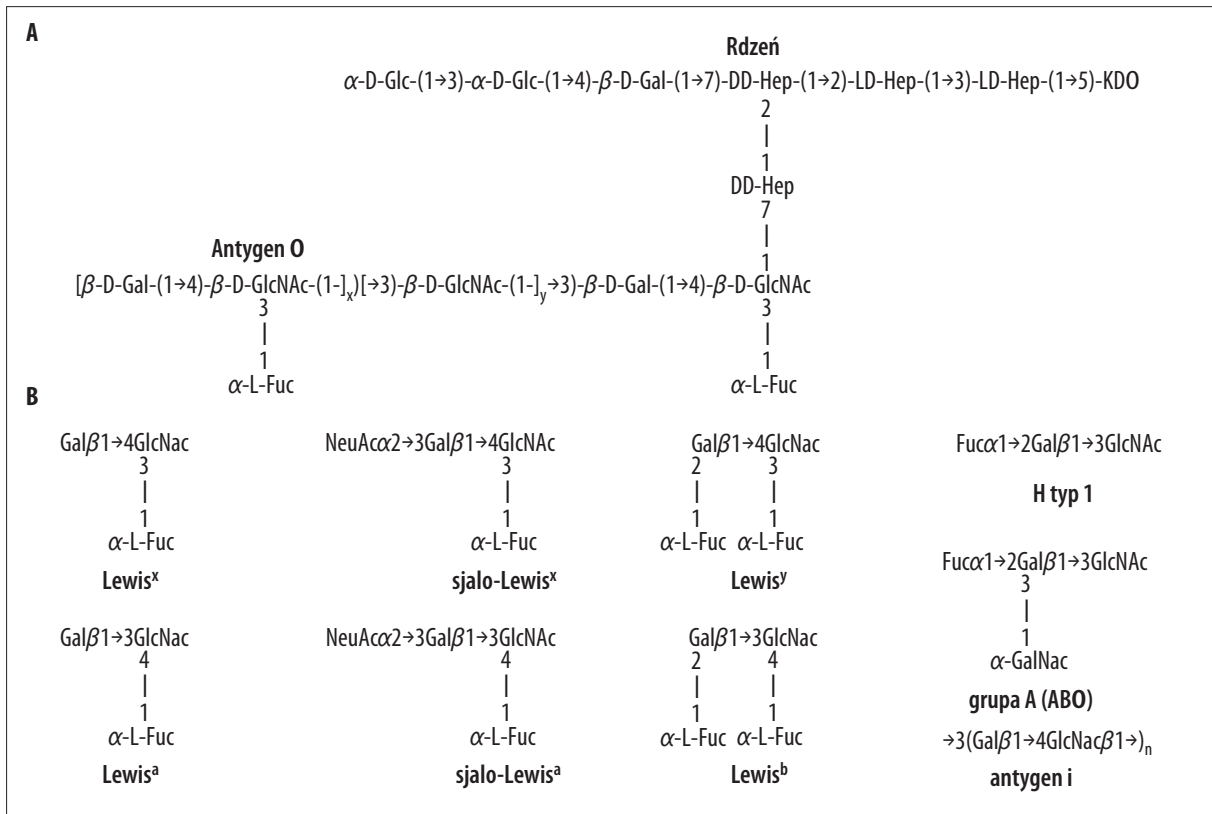
Endotoksyna jest ufosforylowanym lipoglikanem błony wewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Lipopolisacharydy bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* są zbudowane z ufosforylowanego glikolipidu (lipid A) połączonego wiązaniem kowalencyjnym z oligosacharydem rdzeniowym, do którego dołączony jest wielocukier O-swoisty (antygen O) [7].

Wielocukier O-swoisty zawiera od kilku do kilkadziesiątu powtarzających się podjednostek oligosacharydowych (2-8 reszt monosacharydowych) połączonych liniowo bądź w sposób rozgałęziony. W strukturze chemicznej antygeny O bakterii Gram-ujemnych zidentyfikowano dotychczas kilkadziesiąt różnych monosacharydów m.in. 2-amino-2,6-dideoksygalaktozę (*Proteus penneri* 16), kwas N-acetylmuraminowy (*Proteus penneri* 62), kwas N-acetylonauraminowy (*Salmonella enterica* O48, *Hafnia alvei* PCM 2386, *Escherichia coli* O104) czy 2-acetimidyno-2,6-dideoksy-L-galaktozę (*Yersinia ruckeri* 01). Ponadto częstymi monosacharydami występującymi w strukturze antygenów O są: D-glukoza, D-mannoza, D-galaktoza, deoksycukry (L-fukoza, D- i L-ramnoza) oraz aminocukry występujące w postaci piranozowej. Wiele gatunków bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* w części O-swoistej ma składniki niecukrowe, takie jak: aminokwasy, fosforany, rybitol, glicerol, kwas mlekowy czy kwas pirogronowy. Powyższe zróżnicowanie strukturalne (rodzaje cukrów, formy pierścienia, typy wiązań chemicznych, podstawniki niecukrowe) decyduje m.in. o jego swoistości serologicznej [14].

Zróżnicowanie strukturalne antygeny O *H. pylori* jest znacznie mniejsze w porównaniu z innymi bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wielocukry O-swoiste gładkich szczepów klinicznych *H. pylori* charakteryzują się względnie stałą długością i mniejszym stopniem zróżnicowania struktury chemicznej. Budowa chemiczna antygeny O *H. pylori* umożliwia bakterii unikanie odpowiedzi immunologicznej i skuteczną kolonizację błony śluzowej żołądka. Ten przewlekły proces powoduje jednak przewlekłe stany zapalne śluzówki. Unikanie skutecznej odpowiedzi immunologicznej jest związane z podobieństwem strukturalnym cukrów wchodzących w skład polisacharydu O-swoistego *H. pylori* do molekuł powierzchniowych komórek gospodarza.



Ryc.1. Rozwój schorzeń żołądka i dwunastnicy związany z infekcją *H. pylori* (zmodyfikowane wg [40])



Ryc. 2. Struktura antygeny O *H. pylori* z zaznaczonymi strukturami Lewis^x (A). Panel B przedstawia struktury oligosacharydowe antygenów Lewis oraz systemu grupowego ABO; oligosacharydy o podobnej budowie występują w łańcuchach O-swoistych LPS-ów *H. pylori*; Fuc – fukoza, Gal – galaktoza, GlcNAc – N-acetyloglikozamina, Hep – heptoza, Glc – glukoza (zmodyfikowane wg [28,32])

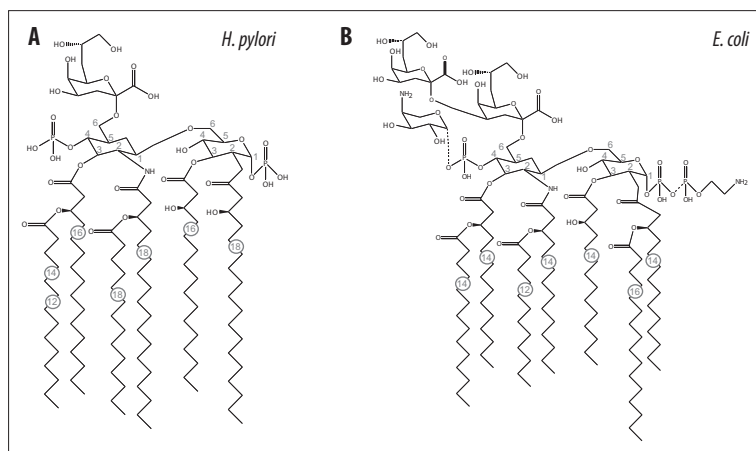
rza. Zjawisko mimikry molekularnej jest przykładem odwracalnej zmiany fenotypowej szczepów (zmiennosc fazy) *H. pylori* i wskazuje na „elastycznosc” strukturalna powierzchni drobnoustroju.

Wyniki przesiewowych badan serologicznych wskazuja, ze 80–90% szczepow klinicznych *H. pylori* powodujacych przewlekle stany zapalne sluzowki charakteryzuje ekspresja antygenow Lewis^x lub Lewis^y [36]. Badania nad mechanizmem zmienności fenotypowej antygeny Lewis w szczepie NCTC 11637 *H. pylori* wykazaly, ze zjawisko to jest wynikiem „poslizgu” polimerazy w trakcie replikacji genow glukozylotransferaz zwiazanym z obecnością homopolimerycznych powtorzen poliC [9]. Powyzszy mechanizm powoduje przesuniecie ramki odczytu w obrębie genow kodujacych $\alpha 3$ -fukozylotransferaze, $\alpha 2$ -fukozylotransferaze, $\beta 3$ -galaktozylotransferaze i $\beta 3$ -N-acetylo-D-glikozaaminotransferaze. Przesuniecie ramki odczytu w trakcie replikacji powyzszych genow przeklada sie na biosynteze enzymow rozniajacych sie swoistością substratowa. Wynikiem powyzszego zroznicowania swoistości enzymatycznej glukozylotransferaz sa rózne warianty strukturalne antygeny O szczepu NCTC 11637 *H. pylori*, w tym populacja antygenow O podobnych do bialek Lewis gospodarza. Molekularna rearanzacja genow glukozylotransferaz ujawnia sie fenotypowo w postaci zroznicowanych chemicznie antygenow Lewis w LPS kolejnych generacji szczepow *H. pylori*. Niejednorodny sklad populacji *H. pylori* (LPS) umozliwia skuteczną kolonizację sluzowki zoladka [26].

Pod wzgledem budowy chemicznej glikotypry antygenow Lewis typu I sa zbudowane z rdzenia disacharydowego: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}$, natomiast typu II z $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}$, podstawionymi resztami cukrowymi fukozy. Na podstawie typu oraz ilosci reszt galaktozy i/lub N-acetyloglikozaaminy podstawionych fukozy mozna wyroznic cztery typy antygenow: Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x i Lewis^y. Struktury takie moga tez wystepowac w postaci usjalowanej po przyłączeniu reszty kwasu sjalowego do galaktozy wiązaniem α -glikozydowym w pozycji 2 lub 3 (ryc. 2) [28].

Uklad immunologiczny gospodarza, ktorego komorki charakteryzuje ekspresja antygeny Lewis^x nie wytwarza przeciwcial anti-Le^x, a to umozliwia kolonizację komorek blony sluzowej zoladka przez szczepy *H. pylori* Le^x-dodatnie [1]. Zjawisko to lezy u podstaw mechanizmu unikania odpowiedzi immunologicznej przez bakterie. Wskazuja na to wyniki analizy porownawczej fenotypow Lewis^x i/lub Lewis^y szczepow *H. mustealae* i komorek gospodarza. Wykazano tez pozytywna korelację częstości występowania grupy krwi A z zakażeniami wywołanego przez szczepy *H. mustealae*, ktorych to endotoksynę charakteryzuje ekspresja antygeny grupowego A [19].

W antygenie O szczepow *H. pylori* zidentyfikowano wielocukry identyczne z ludzkimi antygenami Lewis^a, Lewis^b, sialo-Lewis^x, sialo-Lewis^y, H typu 1 oraz antygeny systemu grupowego krwi ABO, tzn. antygen A i B [18,20]. Powyzsza zalezność nie jest jednoznaczna, a rozbieżności



Ryc.3. Schemat budowy lipidu A lipopolisacharydów *H. pylori* (A) i *E. coli* (B). Liczby oznaczają ilość atomów węgla w łańcuchu alifatycznym (zmodyfikowane wg [23,32]), opis w tekście

są związane z wynikami badań przesiewowych, tzn. u tego samego gospodarza zidentyfikowano zarówno szczepy Le^+ jak i Le^- dodatnie w kolejnych generacjach w różnych regionach żołądka [26]. Jednak zarówno rozwój zanikowego zapalenia żołądka o podłożu autoimmunologicznym (typ A), jak również związanym z infekcją *H. pylori* (typ B) są wynikiem mimikry strukturalnej [6]. Podobieństwo LPS *H. pylori* do antygenów grupowych krwi gospodarza, odgrywa istotną rolę w mechanizmie kolonizacji błony śluzowej żołądka oraz adhezji bakterii do powierzchni komórek żołądka [44].

3. STRUKTURA CHEMICZNA A TOKSYCZNOŚĆ LIPIDU A *H. PYLORI*

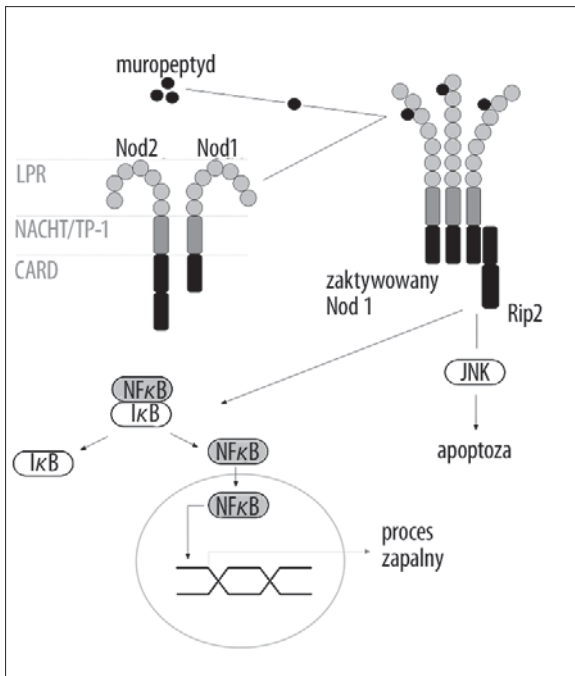
Lipid A bakterii Gram-ujemnych jest konserwatywną strukturą hydrofobową LPS, która najczęściej jest zbudowana z dwucukru β -D-glukozamino-(1-6)- α -D-glukozaminy podstawionej w pozycjach C1 i C4' resztami fosforanowymi oraz etanoloaminą lub 4-amino-4-deoksy-L-arabinozą, a w pozycjach C2, C3, C2' i C3' hydroksylowymi pochodnymi kwasów tłuszczowych. Grupa aminowa jednostki cukrowej jest przeważnie podstawiona (R)-3-hydroksykwasem, natomiast wiązanie estrowe tworzą z nią hydroksykwasu o konfiguracji (S)-2- lub (R)-3-. Podstawą klasyfikacji lipidów A bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jest ilość kwasów tłuszczowych, która wynosi od trzech (triacyl np. u *Porphyromonas gingivalis*) do siedmiu (heptaacyl np. u *Salmonella minnesota*) [7]. Dwucukier występujący w strukturze lipidu A bakterii Gram-ujemnych może być podstawiony mannopiranozą lub dodatkową jednostką glukozaminową [8]. Ponadto składnik cukrowy lipidu A nie zawsze zawiera glukozaminę, np. u *Pseudomonas diminuta* i *Pseudomonas vesicularis* składa się z dwóch cząsteczek 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy połączonych wiązaniem β 1-6 glikozydowym [19]. Immunomodulacja odpowiedzi nieswoistej oraz cytotoxyczność lipidu A są wynikiem jego aktywności biologicznej, przez co nazywany jest on „centrum toksyczności” LPS.

Lipid A *H. pylori* wykazuje niewielką cytotoxyczność w porównaniu z innymi bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*. Działanie pirogenne, mitogenne, poziom indukcji cytokin i chemokin prozapalnych LPS *H. pylori* jest około 1000 razy niższe w porównaniu z endotoksyną izolowaną z *Escherichia coli*. Również indukcja selektyny E (CD62E), cyklooksigenazy 2, prostaglandyny E_2 , tlenku azotu, ak-

tywacja komórek NK czy supresorowych limfocytów T są kilkakrotnie większe w obecności LPS *E. coli* niż *H. pylori* [21,38]. Różnice w aktywności biologicznej obu endotoksyn mogą wynikać z odmienności w budowie strukturalnej ich lipidu A. Lipid A typowy dla większości postaci gładkich *H. pylori* jest zbudowany z dwóch cząsteczek D-glukozoaminy połączonych wiązaniem β 1-6', który jest acylowany w pozycjach C2, C3, i C3' przez odpowiednio reszty kwasów (R)-3-hydroksyoktadekanowego, (R)-3-hydroksyheksadekanowego oraz (R)-3-oktadekanyloktadekanowego. Disacharyd glukozaminowy podstawiony jest resztą fosforanową lub cząsteczką fosforyloetanolaminy w pozycji redukującej C1 [23] (ryc. 2). Aktywność katalityczna 4'-fosfatazy oraz deacylasy 3'-acyloksyacylowej szczepów *H. pylori* wskazuje, że w trakcie biosyntezy następuje defosforylacja i deacylacja prekursora dwufosforanu diglukozaminy acylowanego sześcioma resztami kwasów tłuszczowych. Powstaje lipid A z jedną resztą fosforanową (C1) i czterema resztami acylowymi [43]. Analiza porównawcza struktury chemicznej i właściwości biologicznych lipopolisacharydów *H. pylori* i *E. coli* wskazuje, że mniejsza aktywność biologiczna endotoksyny *H. pylori* może być związana z brakiem reszty 4'-fosforanowej oraz występowaniem tylko czterech 16-18 węglowych zamiast sześciu 12-14 węglowych kwasów tłuszczowych jak w lipidzie A *E. coli* (ryc. 3).

Różnice w budowie chemicznej obu endotoksyn wpływają na kształt supramolekularny cząsteczki oraz jej właściwości biofizyczne [22]. Wyższa temperatura przejścia fazowego oraz mniejszy kąt nachylenia diglukozaminowego szkieletu lipidu A *H. pylori* do płaszczyzny błony komórkowej w porównaniu z innymi lipopolisacharydami z rodziny *Enterobacteriaceae* skutkują ograniczonym oddziaływaniem endotoksyny z immunoreceptorami [24,35]. Ponadto słabe działanie biologiczne LPS *H. pylori* może być dodatkowo modulowane przez cukrowe podstawniki w części rdzeniowej endotoksyny. Swoista fosforylacja lipidu A oraz struktura chemiczna części rdzeniowej endotoksyny *H. pylori* odgrywają istotną rolę w indukcji cytokin, aktywacji prokoagulacyjnej monocytów jednojądrzastych, stymulacji neutrofilów do uwalniania rodników tlenowych oraz zniesienia aktywności limfocytów T supresorowych [21].

Toksyczność lipopolisacharydu *H. pylori* zależna jest od obecności w nim lipidu A, co powoduje stany zapalne ko-



Ryc.4. Aktywujący czynnik transkrypcji NF-κB przez receptory Nod1 i Nod2 niezależnie od rodziny TLRs (zmodyfikowane wg [41]), opis w tekście

mórek błony śluzowej żołądka. Następstwem oddziaływania endotoksyny z glikoproteinami macierzy zewnątrzkomórkowej (laminina, kolagen typu IV, witronektyna) jest zaburzenie integralności komórek błony śluzowej żołądka oraz indukcja sygnału proapoptotycznego [31,42]. Wykazano też, że szczepy kliniczne *H. pylori* wyizolowane od osób z chorobą wrzodową dwunastnicy silnie aktywują czynnik mukolityczny jakim jest pepsynogen, co zostało skorelowane z obecnością przeciwciał wiążących się z częścią rdzeniową LPS *H. pylori* [3].

4. AKTYWACJA RECEPTORÓW ROZPOZNAJĄCYCH WZORY MOLEKULARNE PATOGENÓW PRZEZ LIPOPOLISACHARYDY *H. PYLORI*

Naturalnym mechanizmem obronnym gospodarza przed patogenami jest wrodzona odpowiedź immunologiczna, która stanowi zarówno wczesną, nieswoistą fazę eliminacji drobnoustrojów, a także indukuje odpowiedź swoistą. Pierwszym etapem indukującym kaskadę reakcji obronnych gospodarza jest prawidłowe rozpoznanie wysoce konserwatywnych, powierzchniowych związków chemicznych bakterii, tzw. wzorów molekularnych patogenów PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Receptory gospodarza zaangażowane w molekularną identyfikację bakteryjnych wzorów molekularnych PRRs (pattern recognition receptors) charakteryzuje duża swoistość [39]. Do grupy dobrze scharakteryzowanych PRRs należy rodzina receptorów Toll-podobnych (Toll-like receptors – TLRs), rozpoznające lipopolisacharydy (TLR4), lipoproteiny bakteryjne (TLR2), dwuniciowe RNA (TLR3), flagelinę (TLR5), jednoniciowe RNA (TLR7/8) czy wyspy CpG (TLR9) [16].

Do PRRs istotnych w identyfikacji wzorów molekularnych bakterii Gram-ujemnych należy również rodzina białek NLR (Nod-like receptors), które rozpoznają m.in. mu-

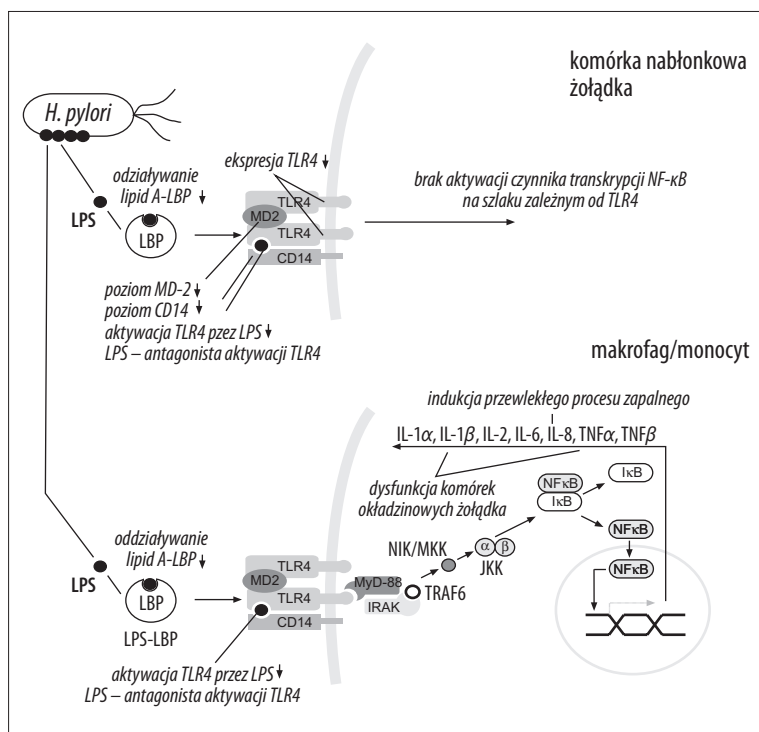
ropeptydy warstwy peptydoglikanu i aktywują czynnik transkrypcji NF-κB niezależnie od rodziny TLRs. Rodzinę NLR tworzy około 20 białek będących homologami roślinnego białka R oraz eukariotycznych regulatorów apoptozy Apaf-1/Ced-4. Białka te są zbudowane z C-końca bogatego w reszty leucynowe (LRR), centralnej domeny NACHT wiążącej nukleotydy i TP-1 (telomerase-associated protein 1) oraz N-końcowego regionu zbudowanego z jednej lub dwóch domen CARD (caspase activation and recruitment domain). Głównie białka Nod1 oraz Nod2 z rodziny NLR uczestniczą w identyfikacji muropeptydów, a ich mutacja jest związana z wystąpieniem choroby Crohna, zespołu Blaua, sarkoidozy oraz chorób atopowych. Struktury peptydoglikanu związane z LRR białka Nod1/Nod2 prowadzą do oligomeryzacji jego domeny CARD z homologicznym regionem kinazy serynowo-treoninowej Rip2. Prowadzi to do aktywacji kinazy IκB oraz białka JNK, czego wynikiem jest odpowiednio uwolnienie NF-κB i transkrypcja genów związanych z procesem zapalnym oraz indukcja apoptozy (ryc. 4) [12,41].

Wynikiem swoistej identyfikacji PAMPs jest rozwój procesu zapalnego, tzn. wybiórcza aktywacja i zgromadzenie komórek układu immunologicznego w celu skutecznego usunięcia patogenu.

Właściwości immunomodulacyjne lipidu A (rozdział 3) oraz podobieństwo strukturalne antygeny *O. H. pylori* do molekuł powierzchniowych komórek gospodarza (rozdział 2), umożliwiają komórce bakteryjnej unikanie odpowiedzi ze strony gospodarza, tzn. słabą identyfikację bakteryjnych wzorów molekularnych przez receptory PRRs.

Amfifilowy charakter lipopolisacharydów umożliwia im tworzenie agregatów, a ich spontaniczny rozpad jest na niskim poziomie. Proces rozpadu kontroluje białko osoczowe LBP (LPS binding protein), które przenosi monomery LPS zarówno na receptor CD14 (rodzina PRRs), jak i lipoproteinę o dużej gęstości HDL (high density lipoproteins). Efektywność wiązania wolnej frakcji LPS przez białko LBP jest związane m.in. ze strukturą chemiczną lipidu A. W przypadku endotoksyny *H. pylori* swoista fosforylacja oraz acylacja lipidu A wpływa na słabe oddziaływanie tej toksyny bakteryjnej z białkiem osoczymym LBP, co prowadzi do słabej aktywacji monocytów [22]. Proces neutralizacji LPS przez HDL zachodzi zawsze po związaniu kompleksu LBP-LPS z CD14, a więc lipopolisacharyd najpierw indukuje układ odpornościowy zanim sam ulegnie deaktywacji chroniącej przed nadmierną stymulacją odpowiedzi immunologicznej [25]. Białko CD14 występuje w postaci rozpuszczalnej (sCD14) lub jako receptor powierzchniowy monocytów, makrofagów i komórek B (mCD14), zakotwiczone w błonie za pośrednictwem glikofosfoinozytoli [39]. Postać sCD14 może bezpośrednio reagować z uwolnioną endotoksyną w procesie katalizowanym przez LBP. Tak powstały kompleks sCD14-LPS aktywuje odpowiedź immunologiczną komórek nabłonkowych, a także mięśni gładkich, które są pozbawione ekspresji receptora mCD14 [10].

Receptorem zaangażowanym w rozpoznawanie endotoksyn bakterii Gram-ujemnych jest białko TLR4. Ten transmembranowy receptor jest zbudowany z bogatej w reszty leucynowe (LRR – leucine-rich repeats) części zewnętrznej,



Ryc. 5. Indukcja sygnału inicjowana przez LPS *H. pylori* i receptor powierzchniowy TLR4 makrofagów i monocytów oraz komórek nabłonkowych żołądka. Kursywą zaznaczono mechanizmy sprzyjające rozwojowi przewlekłego procesu zapalnego komórek błony śluzowej żołądka w obecności *H. pylori*. Opis w tekście

części błonowej oraz cytoplazmatycznej, które wykazują homologię z receptorem interleukiny 1 typu I – IL-1R1. Jego ekspresję wykazano na monocytach, makrofagach, neutrofilach, mastocytach, komórkach dendrytycznych i limfocytach B [45]. Białko CD14 o wysokim powinowactwie do endotoksyny pośredniczy w rozpoznaniu LPS przez TLR4. Receptor TLR4 w przeciwieństwie do białka CD14 zawiera transmembranową domenę sygnałową, która umożliwia transdukcję sygnału. Białko MD-2 (PRRs) stabilizuje kompleks i w postaci CD14-TLR4-MD-2 umożliwia dimeryzację TLR4. Jeden z receptorów TLR4 tworzących dimer ulega aktywacji, co prowadzi do przekazania sygnału na kolejne ogniwa ścieżki sygnałowej [27] (ryc. 5).

W przypadku infekcji *H. pylori*, *H. felis* i *H. hepaticus* komórki bakteryjne mogą indukować wytwarzanie cytokin prozapalnych na szlaku zależnym od receptora TLR2 [38]. Rozbieżności te potwierdzają wyniki badań procesu zapalnego przyzębia wywołanego przez bakterię *Porphyromonas gingivalis*. Endotoksyna *P. gingivalis* jest ligandem TLR2, a jej oddziaływanie z immunoreceptorem, dodatkowo wzmocnione przez białko CD14, indukuje wytwarzanie cytokin przez makrofagi. Podobieństwo w budowie chemicznej lipidów A *P. gingivalis* i *H. pylori* wskazuje na rolę TLR2 w identyfikacji endotoksyn obu gatunków bakterii [11]. TLR2 rozpoznaje zarówno lipoproteiny, jak i kwasy lipoteichojoyowe, których sekwencje powszechnie występują w strukturze błony zewnętrznej *H. pylori*. Powyższe związki mogą teoretycznie stanowić ligand TLR2, jednak dotąd molekula swoiście wiąże się do powyższego receptora nie została zidentyfikowana. Ponadto, zaobserwowano zjawisko hamowania odpowiedzi immunologicznej komórek nabłonkowych żołądka indukowane przez białka szoku cieplnego Hsp60 (heat shock protein 60 kDa) wyizolowane z *H. pylori*, gdy receptor TLR2 został zablokowany przez przeciwciała monoklonalne anty-TLR2 [34].

Wyniki te mogą sugerować udział białek Hsp60 w aktywacji TLR2 jednak należy uwzględnić, że liczba powyższych receptorów na nabłonkach układu żołądkowo-jelitowego jest niewielka, zatem ich udział *in vivo* w infekcjach *H. pylori* jest problematyczny [6]. Wyniki badań z zastosowaniem wysoko oczyszczonego LPS wyizolowanego ze szczepów klinicznych *H. pylori* wskazują na nadrzędną rolę TLR4, a nie TLR2 w wytwarzaniu cytokin przez linię komórkową transfekowaną TLR i makrofagi mysie oraz indukcji reaktywnych form tlenu przez komórki błony śluzowej żołądka świnki morskiej. Powyższe rozbieżności mogą więc być związane ze stopniem oczyszczenia oraz stężeniami endotoksyny zastosowanej w badaniach. Mogą też wskazywać na istotną rolę poziomu ekspresji obu receptorów w unikaniu odpowiedzi immunologicznej przez szczepy *H. pylori* [38]. Fosforylacja i/lub acylacja lipidu A *H. pylori* wpływa na niski poziom aktywacji receptora TLR4 i przy jednoczesnym braku ekspresji TLR2 na powierzchni komórek gospodarza mogą wpływać na ogólnie niski poziom identyfikacji LPS [21].

Komórki błony śluzowej żołądka stanowią pierwszą linię obrony w infekcji *H. pylori* [8]. Mimo identyfikacji *tlr4* mRNA w ludzkich liniach komórek nabłonkowych żołądka AGS, MKN45 i NCI-N87 nie stwierdzono w nich indukcji odpowiedzi zależnej od receptora TLR4 nawet przy stężeniu endotoksyny 1 µg/ml. Rola receptora TLR4 w odpowiedzi komórek nabłonkowych żołądka *in vivo* na LPS *H. pylori* jest również problematyczna, zarówno u osób zdrowych, z przewlekłym procesem zapalnym, jak również ze zdiagnozowanym rakiem żołądka [33]. Ponadto obecność przeciwciał anty-TLR4 nie hamuje uwalniania IL-8 z linii komórkowej AGS w obecności endotoksyny [40]. Jedną z przyczyn braku aktywacji czynnika transkrypcji NF-κB na szlaku zależnym od TLR4 w liniach komórek żołądka jest niewielka ekspresja białek CD14

i MD-2 [17]. Nabłonek żołądka i jelit charakteryzuje także niski poziom ekspresji receptorów TL4 oraz białek powierzchniowych CD14 i MD-2, co w konsekwencji prowadzi do jego słabej wrażliwości na LPS na szlaku TLR4 zależnym. Dodatkowo, LPS *H. pylori* może być antagonistą aktywacji receptora TL4 [30].

Kolejnym etapem aktywacji czynnika transkrypcji NF- κ B zależnym od TLR4 w makrofagach/monocytach jest indukcja białka adaptorowego MyD-88, którego domena śmierci oddziałuje z domeną IRAK (IL-1 receptor associated kinase). Po autofosforylacji IRAK tworzy kompleks z TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), co aktywuje NIK/MKK (KF- κ B inducing kinase/mitogen activated protein kinase) oraz IKK (inhibitory κ B kinase) i ostatecznie kinazy fosforylującej inhibitor czynnika transkrypcji NF- κ B (I κ B) (nuclear factor kappa B) [5]. Uwolniony NF- κ B w wyniku degradacji I κ B aktywuje transkrypcję genów związanych z procesem zapalnym, kodujących interleukiny IL-1A, -1B, -2, -6, -8, czynniki martwicy nowotworu TNF- α , TNF- β oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [29,39].

Interleukina 1 β oraz TNF- α zaburzają funkcjonowanie pompy sodowo-potasowej komórek okładzinowych, przez co blokują aktywny transport jonów wodorowych H⁺ i chlorowych Cl⁻ do światła żołądka. Indukcja transkrypcji genów *il-1b* oraz *tnf- α* (LPS-zależna) może się odbywać ERK-zależnie (extracellular signal-regulated kinase) [5]. Ponieważ między dwoma ścieżkami sygnalnymi zachodzi

zjawisko „cross-talk”, białko będące antagonistą receptora IL-1, współzawodniczy z IL-1 β o wiązanie się do receptora IL-1 (IL-1RI), co prowadzi do hamowania jego aktywności [38]. IL-1 β oraz TNF- α powodują zahamowanie aktywności komórek okładzinowych transportujących do światła żołądka jony H⁺ i Cl⁻. Alkaliczacja środowiska umożliwia kolonizację błony śluzowej żołądka przez *H. pylori*, prowadząc do jej zaburzeń strukturalnych i funkcjonalnych [37]. Rozwój procesu zapalnego o charakterze przewlekłym spowodowany obecnością *H. pylori* jest związany z indukcją cytokin prozapalnych IL-8 i IL-10. Główną funkcją IL-8 jest indukcja chemotaksji neutrofilów i ich diapedeza do miejsca reakcji zapalnej oraz pobudzanie ich właściwości bakteriobójczych, hamowanych przez IL-10 [15]. Duże stężenie IL-10 oraz małe IL-8 wydłuża czas trwania infekcji *H. pylori* [32].

5. PODSUMOWANIE

Zróznicowanie strukturalne i heterogenność LPS wpływają na jego właściwości immunogenne, immunomodulacyjne i cytotoksyczne. *H. pylori* wykształcił mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej związane m.in. ze swoistą fosforylacją i acylacją lipidu A, strukturą chemiczną części rdzeniowej oraz mimikrą molekularną antygenów O do struktur powierzchniowych gospodarza (antigen Lewis). Swoista struktura chemiczna LPS *H. pylori* powoduje jego słabe oddziaływanie z receptorami TLR4, co może prowadzić do rozwoju przewlekłego procesu zapalnego komórek błony śluzowej żołądka, który leży u podstaw schorzeń żołądka i dwunastnicy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Appelmelk B.J., Monteiro M.A., Martin S.L., Moran A.P., Vandenbroucke-Grauls C.M.: Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol.*, 2000; 8: 565–570
- [2] Arabski M., Błasiak J.: Molekularne aspekty infekcji wywołanej *Helicobacter pylori*. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 4: 679–694
- [3] Aspinall G.O., Mainkar A.S., Moran A.P.: A structural comparison of lipopolysaccharides from two strains of *Helicobacter pylori*, of which one strain (442) does and the other strain (471) does not stimulate pepsinogen secretion. *Glycobiology*, 1999; 9: 1235–1245
- [4] Cooke C.L., Huff J.L., Solnick J.V.: The role of genome diversity and immune evasion in persistent infection with *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005; 45: 11–23
- [5] Croinin T.O., Clyne M., Drumm B.: Molecular mimicry of ferret gastric epithelial blood group antigen A by *Helicobacter mustelae*. *Gastroenterology*, 1998; 114: 690–696
- [6] D'Elios M.M., Appelmelk B.J., Amedei A., Bergman M.P., Del Prete G.: Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol. Med.*, 2004; 10: 316–323
- [7] Darveau R.: Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1998; 1: 36–42
- [8] Ferrero R.L.: Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Mol. Immunol.*, 2005; 42: 879–885
- [9] Godlewska R., Jaguszyń-Krynicka E.K.: Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki. *Post. Mikrobiol.*, 2003; 42: 115–137
- [10] Hessen M., Blomeke B., Schluter B., Heussen N., Rossaint R., Kunz D.: Lack of association between C-T 260 promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and the soluble CD14 plasma levels. *Intensive Care Med.*, 2001; 27: 1770–1775
- [11] Hirschfeld M., Weiss J.J., Toshchakov V., Salkowski C.A., Cody M.J., Ward D.C., Qureshi N., Michalek S.M., Vogel S.N.: Signalling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 1477–1482
- [12] Inohara N., Ogura Y., Chen F.F., Muto A., Nunez G.: Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 2551–2554
- [13] Kusters J.G., Van Vliet A.H., Kuipers E.J.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19: 449–490
- [14] Lodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z.: Metody derywatywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 113–128
- [15] Lu W., Pan K., Zhang L., Lin D., Miao X., You W.: Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 631–636
- [16] Majewska M., Szczepanik M.: Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 52–63
- [17] Mandell L., Moran A.P., Cocchiarella A., Houghton J., Taylor N., Fox J.G., Wang T.C., Kurt-Jones E.A.: Intact Gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via Toll-like receptor 2 not Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 6446–6454
- [18] Monteiro M.A.: *Helicobacter pylori*: a wolf in sheep's clothing. The glycoconjugate families of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides expressing histo-blood groups: structure, biosynthesis, and role in pathogenesis. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2001; 57: 99–158
- [19] Monteiro M.A., Zheng P.Y., Appelmelk B.J., Perry M.B.: The lipopolysaccharide of *Helicobacter mustelae* type strain ATCC 43772 expresses the monofucosyl A type 1 histo-blood group epitope. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997; 154: 103–109
- [20] Moran A.P.: *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. *J. Physiol. Pharmacol.*, 1999; 50: 787–805
- [21] Moran A.P.: Lipopolysaccharide in bacterial chronic infection: insights from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and lipid A. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007; 297: 307–319

- [22] Moran A.P.: The products of *Helicobacter pylori* that induce inflammation. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 1998; 10: S3–S8
- [23] Moran A.P., Lindner B., Walsh E.J.: Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. J. Bacteriol., 1997; 179: 6453–6463
- [24] Moran A.P., Schromm A.B., Andrä J., Koch M.H., Seydel U., Brandenburg K.: Influence of endotoxic activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide on physicochemical parameters. Helicobacter, 2005; 10: 489–495
- [25] Moreno C., Merino J., Ramírez N., Echeverría A., Pastor F., Sánchez-Ibarrola A.: Lipopolysaccharide needs soluble CD14 to interact with TLR4 in human monocytes depleted of membrane CD14. Microbes Infect., 2004; 6: 990–995
- [26] Nilsson C., Skoglund A., Moran A.P., Annuk A., Engstrand L., Normark S.: An enzymatic ruler modulates Lewis antigen glycosylation of *Helicobacter pylori* LPS during persistent infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006; 103: 2863–2868
- [27] Olivares D., Gisbert J.: Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Rev. Esp. Enferm. Dig., 2006; 98: 374–386
- [28] Orczyk-Pawłowicz M.: Znaczenie fukozytacji glikokoniuatów w zdrowiu i chorobie. Post. Hig. Med. Dośw., 2007; 61: 240–252
- [29] Pålsson-Mcdermott E., O’Neill L.A.: Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, toll-like receptor 4. Immunology, 2004; 113: 153–162
- [30] Park J.Y., Kim H.Y., Lee J.Y., Kim K.H., Jang M.K., Lee J.H., Yoo J.Y., Han D.S., Hahm J.S.: Macrolide-affected Toll-like receptor 4 expression from *Helicobacter pylori*-infected monocytes does not modify interleukin-8 production. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2005; 44: 171–176
- [31] Piotrowski J., Piotrowski E., Skrodzka D., Slomiany A., Slomiany B.L.: Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Scand. J. Gastroenterol., 1997; 32: 203–211
- [32] Raetz C.R., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem., 2002; 71: 635–700
- [33] Schmausser B., Andrulis M., Endrich S., Lee S.K., Josenhans C., Müller-Hermelink H.K., Eck M.: Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. Clin. Exp. Immunol., 2004; 136: 521–526
- [34] Schmausser B., Andrulis M., Endrich S., Müller-Hermelink H.K., Eck M.: Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an amplification for interaction with *Helicobacter pylori*. Int. J. Med. Microbiol., 2005; 295: 179–185
- [35] Seydel U., Oikawa M., Fukase K., Kusumoto S., Brandenburg K.: Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. Eur. J. Biochem., 2000; 267: 3032–3039
- [36] Simoons-Smit I.M., Appelmelk B.J., Verboom T., Negrini R., Penner J.L., Aspinall G.O., Moran A.P., Fei S.F., Shi B.S., Rudnica W., Savio A., de Graaff J.: Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. J. Clin. Microbiol., 1996; 34: 2196–2200
- [37] Smith G.V., Moran A.P., Bajaj-Elliott M., Farthing M.J.: Induction of cyclooxygenase 2 by *Escherichia coli* but not *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide in gastric epithelial cells *in vitro*. Helicobacter, 2003; 8: 513–520
- [38] Smith M.F., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A.M., Ryan K., Crowe S., Goldberg J.B.: Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. J. Biol. Chem., 2003; 278: 32552–32560
- [39] Stanisławska J., Interewicz B., Olszewski W.L.: Odpowiedź leukocytów gospodarza na antygeny bakteryjne. Post. Mikrobiol., 2003; 42: 301–317
- [40] Su B., Ceponis P.J., Lebel S., Huynh H., Sherman P.M.: *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. Infect. Immun., 2003; 71: 3496–3502
- [41] Tattoli I., Travassos L.H., Carneiro L.A., Magalhaes J.G., Girardin S.E.: The nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. Semin. Immunopathol., 2007; 29: 289–301
- [42] Terres A.M., Pajares J.M., Hopkins A.M., Murphy A., Moran A., Baird A.W., Kelleher D.: *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. Infect. Immun., 1998; 66: 2943–2950
- [43] Tran A.X., Stead C.M., Trent M.S.: Remodeling of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. J. Endotoxin Res., 2005; 11: 161–166
- [44] Wirth H.P., Yang M., Peek R.M., Höök-Nikanne J., Fried M., Blaser M.J.: Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same strain. J. Lab. Clin. Med., 1999; 133: 488–500
- [45] Wirth H.P., Yang M., Peek R.M., Tham K.T., Blaser M.J.: *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. Gastroenterology, 1997; 113: 1091–1098