

Nr indeksu 362808
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

ZAGADNIENIA IMMUNOLOGII

ASPECTS OF IMMUNOLOGY



Tom 41

WARSZAWA 1992

Numer 4 (217)

W Y D A W N I C T W O N A U K O W E P W N

K O S M O S

Rok założenia 1876

Warszawa 1992

Wydawnictwo Naukowe PWN

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW,
WŁODZIMIERZ OSTROWSKI, HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (przewodniczący), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI
sekretarz: JADWIGA KOBUSZEWSKA

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI, LUCYNA GRĘBECKA,
ANTONI HOFFMAN, WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW,
KRZYSZTOF STAROŃ, JERZY ŻUK
redaktor naczelny: KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI
sekretarz: JADWIGA KOBUSZEWSKA

Redaktor zeszytu: CZESŁAW S. CIERNIEWSKI

Adres Redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

Wydano z pomocą finansową
Komitetu Badań Naukowych

WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN — WARSZAWA, ul. Miodowa 10

Ark. wyd. 13/25. Ark. druk. 11/25. Papier offsetowy kl. III. 80 g. 70 × 100 cm.
Oddano do składania w grudniu 1992 r. Podpisano do druku w marcu 1993 r.,
druk ukończono w marcu 1993 r.

Skład: **GP-BIT** Warszawa, ul. Marymoncka 34.

Druk i oprawa: Warszawa, ul. Potażowa 8.

ZAGADNIENIA WSPÓŁCZESNEJ IMMUNOLOGII

W ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwujemy fascynujący rozwój poszczególnych dziedzin immunologii. Odbyna się to dzięki zastosowaniu niezwykle czułych metod biochemicznych, biofizycznych, immunochemicznych, a także technik inżynierii genetycznej w badaniu różnych procesów składających się na odporność organizmu przeciw czynnikom patogennym. Niemal we wszystkich tych procesach szczególną rolę odgrywa moment rozpoznania molekularnego i w efekcie — utworzenia szczególnego kompleksu dwu- lub wielocząsteczkowego o określonej trwałości, w określonym czasie i określonej przestrzeni. Błędne rozpoznanie molekularne w procesach odpornościowych ma krytyczny wpływ na losy organizmu i jest przyczyną ciężkich stanów chorobowych, kończących się często śmiercią.

W celu przybliżenia Czytelnikowi osiągnięć nauki w zakresie poznania mechanizmów leżących u podstaw odporności organizmu, w zeszycie tym zebrane zostały artykuły dające przegląd najważniejszych zagadnień współczesnej immunologii.

Zadaniem układu immunologicznego, na który składają się rozmaite typy komórek (limfocyty T i B oraz komórki prezentujące antygen), a także olbrzymie bogactwo cząsteczek białkowych, jest obrona organizmu przed czynnikami patogennymi wewnątrzkomórkowymi i zewnątrzkomórkowymi, jak również jakimikolwiek zmianami zachodzącymi w komórce, które mogłyby być szkodliwe dla organizmu. Czynniki patogennymi mogą być wirusy i bakterie namnażające się wewnątrzkomórkowo, bakterie i pasożyty zewnątrzkomórkowe oraz ich toksyny. W przypadku zmian patogennych zachodzących we wnętrzu komórek, funkcję obronną przejmują na siebie cytotoksyczne limfocyty T, które neutralizują komórki zakażone lub zmodyfikowane. Wobec zmian patogennych zachodzących pozakomórkowo, tj. w przestrzeni międzykomórkowej lub w płynach ustrojowych, rolę obronną pełnią przeciwciała wydzielane przez limfocyty B w reakcji na pobudzenie przez limfocyty wspomagające.

Przeciwciała wykazują szczególną swoistość rozpoznawania swoich antygenów, tj. tych, dla których ich synteza została zapoczątkowana. Rozpoznają swój antygen wśród wielu rozmaitych białek, kompleksują go i zapoczątkowują serię nieswoistych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Wśród tych ostatnich należy wymienić aktywację czynników układu dopełniacza oraz pobudzenie wydzielania substancji o aktywności chemotaktycznej, tj. ukierunkowujących ruch komórek tak, aby skupiały się one w miejscu zakażenia i neutralizowały patogen na drodze fagocytozy.

Aby wywiązać się z tych zadań obronnych, układ immunologiczny wyposażony został w mechanizmy pozwalające na rozpoznanie obcych różnorodności antygenów, a co najważniejsze, odróżnianie ich od antygenów własnych. Większość z zamieszczonych w tym zeszycie artykułów ukazuje właśnie różne aspekty tego problemu. W pierwszych dwóch pracach przedstawione są elementy reakcji rozpoznania molekularnego antygeny przez składniki układu immunologicznego. Na przykładzie antygenów białkowych opisano najpierw regiony cząsteczki, które mogą tworzyć epitop, tj. ściśle określony przestrzennie region cząsteczki bezpośrednio kompleksujący z paratopem — miejscem wiążącym antygen, obecnym na cząsteczce przeciwciała (E. Lisowska). Pełna charakterystyka struktury epitopu antygenowego dostarcza wiedzy nie tylko o mechanizmie tworzenia kompleksu tego antygeny z przeciwciałem, ale wnosi dużo informacji o samej strukturze cząsteczki białkowej. Przeciwciała o tak dobrze poznanej specyfice kompleksowania są bardzo przydatne jako tzw. sondy molekularne, sygnalizujące zmiany w strukturze lub konformacji regionu tworzącego epitop. Korzysta się z nich w badaniach białek integralnych błon komórkowych podczas identyfikacji regionów ułożonych na powierzchni komórki lub w jej wnętrzu, albo przy opisie miejsc receptorowych. W kolejnej pracy (W. Ptak) przedstawiono złożoność procesu indukcji odpowiedzi immunologicznej, ze szczególnym uwypukleniem mechanizmu prezentacji i rozpoznania antygeny. Na tym etapie ma miejsce rozróżnienie antygeny obcego od własnych cząsteczek organizmu. Odbywa się to dzięki białkom głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC), zwanym też antygenami transplantacyjnymi. Budowa i mechanizm ich działania, zasygnalizowane przez prof. W. Ptaka zostały szczegółowo opisane w następnym artykule — P. Kuśnierczyka.

Komórki immunologicznie czynne mogą spełniać swoje funkcje dzięki niezwyklej ruchliwości oraz przez ukierunkowane krążenie między układem krwionośnym a układem chłonnym (A. Górski). Migracja komórek, a zwłaszcza przenikanie ich przez ścianę naczyń, jest możliwa dzięki obecności receptorów należących do rodziny integryn, które rozpoznają różne składniki zewnątrzkomórkowego matriksu. Zadanie, jakie spełniają receptory integrynowe w procesach odpornościowych, polega nie tylko na umożliwieniu adhezji i migracji komórek, ale także ich swoistej agregacji. Wspomaganie przez te receptory tworzenia swoistych kompleksów przez limfocyty T zasygnalizowane zostało w artykule prof. W. Ptaka.

Centralną rolę w inaktywacji czynników patogennych działających zewnątrzkomórkowo odgrywają cząsteczki przeciwciał. Ich struktura, niezwykle różnorodność oraz mechanizm genetyczny odpowiedzialny za syntezę, a także aktywność biologiczna zostały przedstawione w dwóch kolejnych pracach (W. Rudnicka; M. Janusz). Mimo tego samego celu, w obu pracach cząsteczki przeciwciał scharakteryzowane zostały w inny sposób, a podane informacje wzajemnie się uzupełniają. Przeciwciałom poświęcone są również trzy następne artykuły (H. Długońska i W. Rudnicka, J. Salwa, W. Rudnicka i M. Chmiela).

Ze względu na szczególnie sposób selekcji podczas otrzymywania, przeciwciała monoklonalne reprezentują populację cząsteczek immunoglobulin o tej samej budowie oraz tej samej swoistości wiązania epitopu antygenowego. Ze względu na te cechy oraz możliwość otrzymywania dużych ilości jednorodnych preparatów, przeciwciała monoklonalne znalazły szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach biologii i medycyny. Stanowią one niezwykle cenne narzędzie podczas analizy rozmaitych białek, wykrywania ich modyfikacji, blokowania ich funkcji, lokalizacji w różnych strukturach komórkowych, itp. Szczególnym przypadkiem przeciwciał, ze względu na charakter rozpoznawanego epitopu, są przeciwciała antyidiotypowe. Charakterystyka przeciwciał antyidiotypowych, ich potencjalne znaczenie regulacyjne podczas odpowiedzi immunologicznej, a także praktyczne możliwości wykorzystania zostały opisane w artykułach J. Salwy oraz W. Rudnickiej i M. Chmieli. Pierwszy z nich dotyczy regulacji odpowiedzi immunologicznej przez przeciwciała antyidiotypowe. Zgodnie z teorią Jernego, przeciwciała antyidiotypowe mogą pełnić taką rolę, chociaż coraz więcej obserwacji nie popiera tego poglądu. Niewątpliwie, regulacja odpowiedzi immunologicznej, oprócz możliwej roli przeciwciał antyidiotypowych, jest kontrolowana przez złożone mechanizmy genetyczne i neuroendokrynologiczne (W. Jędrzejczak, M. Zimecki, P. Berezowicz).

W obecnym zbiorze nie udało się zamieścić prac przedstawiających aktualną wiedzę na temat wielu innych bardzo istotnych zagadnień, nurtujących współczesnych immunologów, np. problemów związanych z immunopatologią, autoimmunizacją, alergią czy immunologią nowotworów. Nie została także omówiona rola układu dopełniacza w procesie odpornościowym i procesach zapalnych. Sądzę, że ze względu na wagę tych problemów zasługują one na opracowanie w oddzielnym zeszycie.

Przegląd różnorodnych zagadnień współczesnej immunologii, sporządzony przy współpracy wielu autorów, w którym każdy naświetla oddzielny problem, wiąże się zawsze z koniecznością powtarzania niektórych zagadnień. Jest to niezbędne dla pełniejszego wyjaśnienia tematu i powiązania go z kontekstem problemów immunologicznych. W przypadku dwóch takich zagadnień, tj. budowy i właściwości przeciwciał oraz udziału cytokinin w regulacji procesu odpornościowego, w obecnym zbiorze zamieściliśmy podwójne, niezależne opracowania traktujące w sposób odmienny i uzupełniający poszczególne tematy.

Dziękuję wszystkim Autorom za cenny wkład w przygotowanie tego zeszytu.

Czesław S. Cierniewski

ASPECTS OF MODERN IMMUNOLOGY

During the recent dozen or so years we have been observing a fascinating development of some branches of immunology. This happened owing to the application of extremely sensitive biochemical, biophysical and immunochemical methods as well as genetic engineering techniques to the investigation of various processes contributing to the organism's immunity to pathogens. The moment of molecular recognition, resulting in the formation of a unique bi- or multimolecular complex possessing a certain stability in particular spatial and temporal dimensions, plays a very important role in almost all of those processes. Incorrect molecular recognition in the immune processes has a critical effect on the organism and leads to severe pathologic conditions and sometimes to death.

The purpose of the present issue is to acquaint the readers with the latest achievements in research on the mechanisms underlying the organism's immunity, and to provide a review of the most important problems of modern immunology.

The immune system, which consists of various cell types (T and B lymphocytes as well as antigen-presenting cells), and of a wealth of protein molecules, protects the organism against intracellular and extracellular pathogens, as well as against any changes in the cells which might be harmful to the organism. The pathogens may be viruses and bacteria proliferating inside the cells, extracellular bacteria and parasites, and their toxins. In the case of intracellular pathogenic changes, the defensive function is assumed by cytotoxic T lymphocytes, which neutralize the infected or modified cells. The defensive role in respect of extracellular pathogenic changes, i.e. those occurring in the intercellular space or in the extracellular fluids, is played by antibodies released by B lymphocytes as a response to activation by helper cells.

Antibodies demonstrate a unique capability for specific recognition of their antigens, i.e. those antigens, for which their synthesis was initiated. They recognize their antigen among numerous other proteins, form a complex with it and initiate a series of nonspecific immune response mechanisms. Among the latter, the activation of complement system factors should be mentioned as well as stimulation for secretion of substances with chemotactic activity, i.e. directing the movements of cells so that they could aggregate at the site of infection and neutralize the pathogen by phagocytosis.

To be able to fulfill those defensive tasks, the immune system has been equipped with mechanisms allowing for the recognition of an enormous variety of antigens, and, what is most important, for their differentiation from the endogenous ones. Most of the papers comprising the issue present various aspects of this problem. The first two articles describe the elements of the reaction of molecular recognition of an antigen by the components of the immune system. On the basis of protein antigens, the regions of the molecule

which may form an epitope, i.e. a strictly defined region of the molecule directly involved in forming the complex with the paratope — an antigen-binding site present on the antibody molecule — were described for the first time (E. Lisowska). A comprehensive analysis of the structure of the antigen epitope provides not only information concerning the mechanism of the formation of a complex by this antigen and its antibody, but also concerning the structure of the protein itself. Antibodies with well known complex-forming characteristics are very useful as so-called molecular probes, detecting changes in the structure or determining the region constituting the epitope. They are also used to investigate the regions localized on the cell surface or inside the cell, or to recognize the receptor sites. The subsequent paper discusses the process of induction of the immune response in its all complexity, with particular emphasis on the mechanism of presentation and recognition of the antigen (W. Ptak). The differentiation between foreign antigens and the own cells of the organism occurs at this stage. It is possible owing to the proteins of the main histocompatibility complex (MHC), also referred to as transplantation antigens. Their structure and mechanism of action mentioned in brief by Professor W. Ptak, have been described in detail in the next paper by P. Kuśnierczyk.

Performing the function designed for the immunoactive cells requires their great motility, as well as directed circulation between the systems of blood and lymphatic vessels (A. Górski). Migration of cells, and their penetration through the vascular walls in particular, are possible owing to the presence of receptors belonging to the integrin family, which recognize the various components of the extracellular matrix. The function performed by integrin receptors in the immune processes consists in making possible not only adhesion and migration of the cells, but also their specific aggregation. The adjunctive role of these receptors in the formation of specific complexes by T lymphocytes has been mentioned in the paper by Professor W. Ptak.

Inactivation of the pathogenic factors acting extracellularly is mainly conducted by antibody molecules. Their structure, great variety, the genetic mechanism responsible for their synthesis, and their biological activity have been dealt with in two subsequent papers (W. Rudnicka, M. Janusz). Despite the same aim of these works, they are complementary to each other, because of different approaches to characterizing the antibody molecules. The next three papers (H. Długońska and W. Rudnicka, J. Salwa, W. Rudnicka and M. Chmiela) are also concerned with antibodies. Since monoclonal antibodies are obtained using a particular method of selection, they represent a population of immunoglobulin molecules with an identical structure and specificity of binding the antigen epitope. Owing to these characteristics and the possibility to obtain large quantities of homogeneous preparations, monoclonal antibodies have been commonly applied in various fields of biological and medical research. They provide a valuable tool for the analysis of various

proteins, detection of their modifications, blocking their functions, localization in various cellular structures, etc. Anti-idiotypic antibodies are a very particular case, because of the character of the recognized epitope. The peculiarities of such antibodies, their putative regulatory role during the immune response, and their practical applicability have been presented in the papers by J. Salwa, and also by W. Rudnicka and M. Chmiela. The former initiates a series of articles describing the mechanisms regulating the immune response. According to Jerne's theory, anti-idiotypic antibodies may play such a role, although more and more reported observations do not support this view. Undoubtedly, the regulation of the immune response, besides the possible involvement of anti-idiotypic antibodies, is controlled by complex genetic and neuroendocrine mechanisms (W. Jędrzejczak, M. Zimecki, P. Berezowicz).

It was impossible to include in the present issue many papers representative of the current state of knowledge about numerous other important problems investigated by immunologists, e.g. problems associated with immunopathology, autoimmunization, allergy or immunology of neoplasmas. The role of the complement system in immune and inflammatory processes has not been included here, either. I think that, considering the importance of these immunological problems, the papers devoted to them should be published in a separate issue.

A review of various problems of modern immunology based on contributions of numerous authors, each of whom presents a selected problem, is always associated with the recurrence of many of these problems in some papers. It is indispensable for a more comprehensive presentation of the problems described and their relationships with a wider context of immunological problems. In the cases of two problems, i.e. the structure and properties of antibodies, and the role of cytokinins in the regulation of the immune process, we have included two papers prepared independently and presenting different and complementary approaches to these topics.

I would like to thank all the authors for their valuable contributions to the present publication.

Czesław S. Cierniewski

ELWIRA LISOWSKA

Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda
Wrocław

BIAŁKA JAKO ANTYGENY: REAKCJE Z PRZECIWCIAŁAMI I ANALIZA EPITOPÓW

Nie ma dużej przesady w stwierdzeniu, że geny kodują białka, te zaś pełnią wszystkie inne funkcje z produkcją genów włącznie, dzięki swej zdolności selektywnego wiązania się do innych cząsteczek. Mogą to być trwale oddziaływania między jednakowymi lub różnymi cząsteczkami, prowadzące do powstania większych struktur stanowiących tkanki lub fragmenty tkanek. Białka uczestniczące w tych oddziaływaniach nazywamy strukturalnymi. Mogą to być też krótkotrwałe oddziaływania, w wyniku których zachodzą reakcje chemiczne (enzymy), przekazanie sygnału do wnętrza komórki (receptory komórkowe), aktywacja lub hamowanie innych biologicznie czynnych białek (białka regulatorowe) itp. Przykładem swoistego niekowalencyjnego oddziaływania między białkami jest też reakcja antygenu białkowego z przeciwciałem, będąca tematem niniejszego artykułu.

Przeciwciała są jednym z głównych produktów odpowiedzi immunologicznej. Prawidłowo funkcjonujący system immunologiczny jest niezbędnym warunkiem przeżycia w sytuacji nieustannej inwazji na organizm różnych szkodliwych mikroorganizmów (bakterie, wirusy) i cząsteczek. System ten jest regulowany przez różne typy komórek układu immunologicznego i cytokiny przez nie wydzielane. Celem tej regulacji jest utrzymanie procesów immunologicznych na optymalnym poziomie i zachowanie zdolności do odróżniania antygenów własnych od obcych. Przeciwciała mają zdolność swoistego wiązania się z antygenem użytym do immunizacji. Utworzenie tego kompleksu nie niszczy antygenu bezpośrednio, ale umożliwia jego zniszczenie przez inne obronne systemy białkowe (komplement) czy komórkowe (makrofagi). Antygenem może być każda obca dla immunizowanego organizmu struktura (białkowa, cukrowa i wiele innych), ale tutaj ograniczamy się do omówienia antygenów białkowych.

POWSTAWIANIE PRZECIWCIAŁ DLA ANTYGENÓW BIAŁKOWYCH

Rozmiar reagujących ze sobą komplementarnych obszarów antygenu i przeciwciała stanowi kilka do kilkunastu reszt aminokwasowych. Zważywszy,

że białko średniej wielkości zbudowane jest z kilkuset aminokwasów, staje się oczywiste, że taka cząsteczka zawiera wiele strukturalnie różnych obszarów (epitopów) mogących reagować z przeciwciałem. W rzeczywistości, średniej wielkości białko użyte jako antygen (tzn. wprowadzone do ustroju drogą pozajelitową) może reagować z tysiącami różnych limfocytów B, mających powierzchniowe immunoglobuliny (receptory komórek B), z miejscami wiążącymi komplementarnymi dla różnych epitopów antygeny. W wyniku tej interakcji, oraz najczęściej na drodze kooperacji z innymi komórkami układu immunologicznego, limfocyty B są indukowane do różnicowania i intensywnego wzrostu, dając kłony komórek produkujących i wydzielających przeciwciała. Zważywszy, że jedna komórka produkuje tylko jedno przeciwciało, liczba różnych przeciwciał w surowicy immunizowanego organizmu jest równa liczbie różniących się między sobą indukowanych komórek B. Przeciwciała te różnią się nie tylko rozpoznawaniem różnych epitopów antygeny, ale również powinowactwem oraz elementami struktury poza miejscem wiążącym antygen (różne klasy i podklasy immunoglobulin). Różnorodne przeciwciała są obecne w surowicy poliklonalnej w różnych ilościach i oznaczając ich reakcje z antygenem, wykrywamy przede wszystkim te, które przeważają ilościowo.

Teoretycznie, każdy fragment antygeny białkowego może stanowić epitop. Jednakże większość przeciwciał wykrywanych w surowicy odpornościowej jest skierowana zwykle przeciw niektórym fragmentom antygeny, które uważa się za bardziej immunogenne niż inne. Immunogenność jest bowiem ograniczona do tych fragmentów cząsteczki, które mają budowę obcą dla immunizowanego organizmu, które są dostępne do reakcji z receptorami komórek układu immunologicznego gospodarza, i które znajdują odpowiednie receptory w immunizowanym organizmie. Z tego ostatniego powodu repertuar przeciwciał powstających w wyniku immunizacji zależy nie tylko od antygeny, ale też w pewnym stopniu od immunizowanego organizmu.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Stosunkowo łatwe jest wydzielenie puli przeciwciał z surowicy poliklonalnej przez zastosowanie chromatografii powinowactwa z użyciem antygeny związanego ze stałym nośnikiem. Jednakże uzyskanie indywidualnych przeciwciał z tej puli jest niewykonalne ze względu na duże podobieństwo strukturalne różnych cząsteczek immunoglobulin. Można natomiast wydzielić kłony komórkowe wywodzące się z pojedynczej komórki produkującej przeciwciało i każdy z takich klonów staje się producentem określonego przeciwciała. Metoda ta, która dokonała przełomu w immunologii, została wprowadzona przez Köhlera i Milsteina w 1975 r. [12], a jej autorzy otrzymali wraz z Jerne nagrodę Nobla w 1984 r. Komórki śledziony immunizowanego zwierzęcia (najczęściej myszy, rzadziej szczura) hybrydyzuje się z komórkami nowotworowymi w celu zapewnienia im zdolności do nieograniczonego wzros-

tu *in vitro* i wydzielone w selektywnym medium komórki hybrydoma używa się do selekcji klonów produkujących interesujące nas przeciwciała [14]. Opracowane zostały również metody otrzymywania ludzkich przeciwciał monoklonalnych, co jest ważne ze względu na możliwość stosowania ich u ludzi bez wywoływania odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała monoklonalne są obecnie powszechnie używane i stanowią reagenty pozwalające na precyzyjne określenie epitopów przez nie rozpoznawanych.

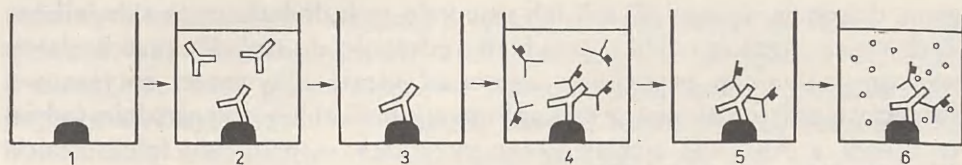
EPITOPY ANTYPENÓW BIAŁKOWYCH W ODNIESIENIU DO STRUKTURY BIAŁEK

Precyzyjne określenie epitopu rozpoznawanego w antygenie białkowym przez przeciwciało wymaga znajomości struktury antygeny. Pierwszorzędową strukturę białka stanowi sekwencja aminokwasów w jego łańcuchu peptydowym. Znajomość sekwencji aminokwasów była ograniczona do stosunkowo niewielkiej liczby białek, gdyż metody pozwalające na jej wyznaczenie były żmudne i pracochłonne. W ostatnich latach, rewolucji w tej dziedzinie dokonało zastosowanie metod inżynierii genetycznej oparte na fakcie, że nieporównywalnie łatwiej jest określić sekwencje kwasów nukleinowych niż białek. Obecnie lawinowo rośnie liczba białek, których sekwencje aminokwasowe określono na podstawie oznaczenia sekwencji kodujących fragmentów genu (cDNA). Jednakże pełna znajomość struktury białka powinna obejmować również poznanie kształtu przestrzennego łańcucha polipeptydowego, czyli konformacji białka. Złożoność struktury przestrzennej białka wynika z oddziaływań między łańcuchami bocznymi aminokwasów wchodzących w jego skład. Pierwszym poziomem tej organizacji przestrzennej jest struktura drugorzędowa, tzn. lokalna organizacja fragmentów łańcucha polipeptydowego (np. α -spirała, struktura β). Ponadto, cały łańcuch polipeptydowy ulega pofałdowaniu, przybierając określony kształt przestrzenny, co stanowi jego strukturę trzeciorzędową. Łańcuchy wielu białek składają się z fragmentów tworzących niezależne struktury przestrzenne, zwane domenami, połączone „rucho-
mym” odcinkiem łańcucha. Wiele funkcjonalnych białek ma jeszcze wyższy poziom organizacji, a mianowicie złożone są one z dwóch lub więcej odrębnych łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkami dwusiarczkowymi lub oddziaływaniami niekowalencyjnymi. Przykładem mogą być immunoglobuliny zbudowane z dwóch łańcuchów ciężkich (H) i dwóch lekkich (L). Mostki dwusiarczkowe mogą się też tworzyć między resztami cysteiny w tym samym łańcuchu, spinając jego mniej lub bardziej odległe fragmenty, co dodatkowo stabilizuje konformację cząsteczki. Tutaj również typowym przykładem mogą być białka z rodziny immunoglobulin, których łańcuchy tworzą kilka pętli spiętych mostkami —S—S—. Oprócz sekwencji aminokwasów na strukturę przestrzenną białka mogą mieć wpływ jego potranslacyjne modyfikacje, np. fosforylacja, glikozylacja i inne.

Powyższe skrótowe omówienie zasad budowy przestrzennej białek ma służyć uświadomieniu, że w cząsteczce białka odległe w sekwencji reszty aminokwasowe mogą znajdować się w bliskim sąsiedztwie i wchodzić w skład epitopu rozpoznawanego przez przeciwciało. Takie epitopy nazywane są konformacyjnymi lub nieciągłymi. Niektórzy badacze uważają, że większość epitopów białkowych ma charakter konformacyjny [13]. Zależy to jednak od rodzaju antygeny białkowego, wykazano też bowiem, że przeciwciała rozpoznają w pewnych białkach pojedyncze odcinki sekwencji, zwane epitopami linearnymi lub ciągłymi. Istnieje pogląd, że białka wewnątrzkomórkowe oraz wydzielane z komórek są bardziej prawdopodobnymi kandydatami do posiadania epitopów konformacyjnych, podczas gdy epitopy liniowe są częściej spotykane w białkach membranowych komórek eukariotycznych i bakteryjnych oraz w antygenach kapsydów wirusowych.

METODY OZNACZANIA REAKCJI ANTYPEN — PRZECIWCIAŁO (Ag — Ab)

Podstawą charakterystyki epitopu jest dysponowanie dogodną metodą oznaczania reakcji antygen — przeciwciało. Zasadą tego pomiaru jest oddzielenie kompleksu Ag — Ab od nadmiaru co najmniej jednego z partnerów reakcji (np. Ab), aby móc oznaczyć jego zawartość w kompleksie. Jest to znacznie ułatwione, jeżeli drugi składnik reakcji (np. Ag) jest przyłączony do stałej fazy. Stałą fazą są najczęściej powierzchnie plastikowe, do których antygen jest wiązany przez adsorpcję. Do wykrycia związanego z unieruchomionym antygenem przeciwciała stosuje się ligandy sprzężone z enzymem (metody immunoenzymatyczne lub ELISA od ang. enzyme-linked immunosorbent assay) lub znakowane izotopem (metody radioimmunologiczne), albo związkami fluorescencyjnymi (ta ostatnia metoda jest najczęściej stosowana do oznaczania wiązania przeciwciała do antygeny na powierzchni komórki). Jednakże, zamiast znakowania każdego badanego przeciwciała, praktyczniej jest użyć metody pośredniej, tzn. stosować znakowany reagent wtórny rozpoznający testowane przeciwciała. Mogą nim być np. poliklonalne przeciwciała (kozie, królicze) anty-Ig mysie, które nadają się do oznaczania wszystkich mysich przeciwciał monoklonalnych. Istnieje ogromna różnorodność ilościowych i jakościowych metod służących do oznaczania reakcji Ag — Ab i ich omawianie wykracza poza ramy tego artykułu. Pozwolę sobie jedynie zilustrować omówione wyżej w skrócie reguły podstawowym wariantem mikropłytkowego testu ELISA, który jest powszechnie używany i jest bardzo przydatny do analizy epitopów (Rys. 1). W metodzie tej stosuje się płytki plastikowe z 96 wgłębieniami, których powierzchnie opłaszczą się antygenem przez zwykłą kilkunastogodziną inkubację roztworu antygeny (50 — 100 μ l na jedno wgłębienie, 1 — 10 μ g/ml). Po usunięciu tego roztworu i przemyciu płytki inkubuje się w jej wgłębieniach roztwór badanego przeciwciała (Ab1), a następnie roztwór drugiego przeciwciała (anty-Ab1) sprzężonego z enzymem. Najczęściej stosowany-



Rys. 1. Schemat płytkowego testu ELISA. Do płytki opłaszczonej antygenem (1) dodaje się roztwór testowanego przeciwciała Ab1 (2) i po odmyciu (3) wprowadza się roztwór drugiego przeciwciała anti-Ab1 sprzężonego z enzymem (4); po kolejnym odmyciu (5) dodaje się roztwór substratu (6) dającego barwny produkt reakcji enzymatycznej

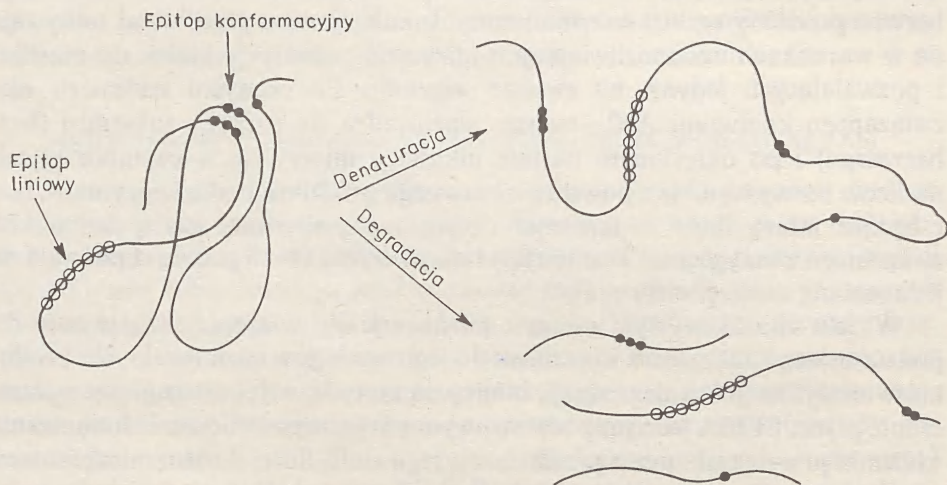
mi enzymami są alkaliczna fosfataza lub peroksydaza chrzanowa, które dają barwne produkty reakcji enzymatycznej. Inkubacje obu przeciwciał odbywają się w warunkach uniemożliwiających „fizyczną” adsorpcję białek do plastiku i pozwalających jedynie na swoiste wiązanie. Po odmyciu nadmiaru niezwiązanego koniugatu Ab2–enzym, wprowadza się roztwór substratu (bezbarwnego) i po określonym okresie inkubacji mierzy się w czytniku płytek nasilenie barwy wynikłe z powstania barwnego produktu reakcji enzymatycznej i będące miarą ilości związanego enzymu, a pośrednio miarą ilości Ab1 związanego z antygenem. Test ten jest łatwy i szybki (4–5 godzin) i pozwala na jednoczesną analizę wielu próbek.

W celu charakterystyki epitopu porównuje się wiązanie przeciwciała do podstawowego antygeny z wiązaniem do jego analogów strukturalnych, produktów modyfikacji lub degradacji. Najlepszą metodą w tej sytuacji jest opłaszczanie płytki ELISA jednym podstawowym antygenem i mierzenie hamowania wiązania przeciwciała przez preinkubację jego stałej ilości z różnymi stężeniami porównywanych antygenów. Uzyskuje się w ten sposób krzywe hamowania, które pozwalają na wyznaczenie stężenia inhibitora potrzebnego do zahamowania wiązania przeciwciała w 50%. Metoda hamowania jest lepsza niż porównywanie wiązania do różnych unieruchomionych antygenów, gdyż eliminuje ona możliwe różnice w stopniu wiązania się różnych antygenów do płytki i zmiany konformacji antygeny spowodowane adsorpcją. Ponadto, metoda hamowania umożliwia oznaczenie aktywności niskocząsteczkowych form antygeny (np. jego fragmentów czy syntetycznych peptydów), które nie wiążą się do płytki.

STRATEGIE STOSOWANE DO IDENTYFIKACJI EPITOPÓW ANTYPENÓW BIAŁKOWYCH

Liczne białka zawierają dodatkowe składniki (np. cukry, grupy fosforanowe, hem i inne grupy prostetyczne) związane kowalencyjnie lub niekowalencyjnie z łańcuchem polipeptydowym. W celu sprawdzenia, czy przeciwciała rozpoznaje epitop peptydowy niezależny od potranslacyjnej modyfikacji anty-

genu, dokonuje się modyfikacji lub usunięcia tych dodatkowych składników. Zachowanie przez zmodyfikowane białko zdolności do reakcji z przeciwciałem wskazuje na epitop peptydowy, natomiast utrata aktywności antygenowej świadczy o pośredniej (wpływ na konformację białka) lub bezpośredniej (udział w reakcji z Ab) roli niebiałkowego składnika w epitopie. Jeżeli istnieją wskazówki, że badany epitop jest peptydowy, następnym etapem jest określenie, czy ma on charakter konformacyjny czy liniowy. O konformacyjnym charakterze epitopu świadczy utrata aktywności antygeny po jego denaturacji, fragmentacji proteolitycznej lub chemicznej, lub redukcji mostków dwusiarczkowych, jeśli takie są w antygenie obecne (Rys. 2).



Rys. 2. Liniowe i konformacyjne epitopy białek. Zachowanie epitopu liniowego i rozpad epitopu konformacyjnego w wyniku denaturacji lub fragmentacji antygeny białkowego

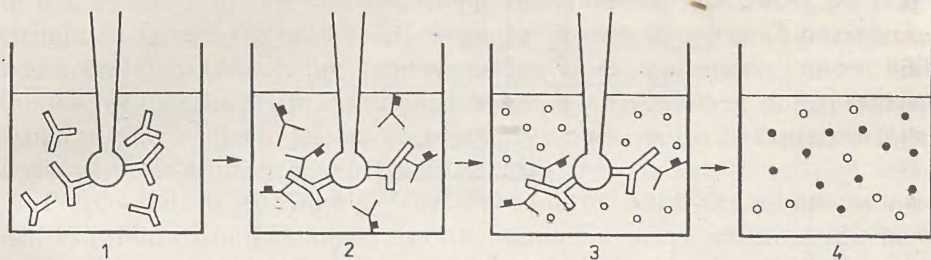
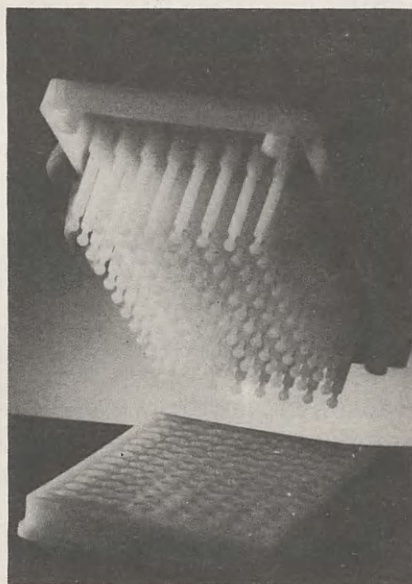
Epitopy konformacyjne, które są najczęstsze, są niestety znacznie trudniejsze do identyfikacji niż liniowe. Pewnych informacji o tym, jakie reszty aminokwasowe uczestniczą w epitopie, może dostarczyć badanie efektu ich modyfikacji na aktywność antygenową. Metoda ta ma jednak ograniczoną wartość, gdyż (i) wiele reszt aminokwasowych nie poddaje się modyfikacjom, (ii) reakcje modyfikacji chemicznych często nie są swoiste, (iii) oraz utrata aktywności w efekcie modyfikacji nie zawsze świadczy o bezpośrednim udziale modyfikowanego ugrupowania w reakcji z przeciwciałem. Na obecnym etapie rozwoju metod biologii molekularnej stosuje się też porównanie aktywności analogów antygeny otrzymanych w wyniku mutacji prowadzących do zmian określonych aminokwasów lub delecji odcinka łańcucha polipeptydowego. Wykorzystuje się też naturalne analogi, np. warianty genetyczne antygeny, lub ten sam typ białka pochodzący z różnych gatunków. Można też badać udział

niektórych aminokwasów antygeny w reakcji z przeciwciałem metodami spektralnymi (np. fluorescencyjnymi). Jednakże nawet w przypadku antygeny o znanej strukturze pierwszorzędowej i przestrzennej metody te dostarczają fragmentarycznych informacji i jedyną metodą umożliwiającą bezpośrednią identyfikację reagujących ze sobą obszarów Ag i Ab jest krystalografia rentgenowska [3, 5, 13, 26]. Metoda ta ma jednak również poważne ograniczenia: wymaga kosztownej i wysoce specjalistycznej aparatury oraz otrzymania kompleksów Ag—fragment Fab przeciwciała w formie krystalicznej. Z tych powodów analizowano dotąd tą metodą tylko kilka przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw lizozymowi i neuraminidazie wirusa grypy. Badania te dostarczyły informacji o rozmiarze i kształcie powierzchni antygeny i przeciwciała, będącej w bezpośrednim kontakcie (zawsze kilkaset Å²), i pozwoliły na identyfikację reszt aminokwasowych antygeny obecnych w tej „kontaktowej” powierzchni. Na reszty te, których jest kilkanaście, składa się kilka krótkich sekwencji liniowych, usytuowanych w różnych fragmentach łańcucha polipeptydowego, oraz dodatkowe pojedyncze reszty aminokwasowe. Stwierdzono ściśle dopasowanie przestrzenne reagujących ze sobą obszarów Ag i Ab, co jest w zgodzie z tworzeniem tych kompleksów przez wiązania wymagające bliskiego kontaktu, tzn. wodorowe, hydrofobowe, Van der Waalsa. Tylko w niektórych kompleksach Ag—Ab istotną rolę odgrywają wiązania jonowe między kwaśnymi i zasadowymi resztami aminokwasowymi antygeny i przeciwciała. Powstało pytanie, czy reagujące ze sobą obszary Ag i Ab mają sztywne pasujące do siebie kształty (zasada zamka i klucza), czy też to dopasowanie przestrzenne jest indukowane w trakcie tworzenia kompleksu. Analiza rentgenowska struktury przestrzennej wolnego antygeny białkowego i tegoż antygeny w kompleksie z fragmentem Fab lub wolnego fragmentu Fab i jego kompleksu z niskocząsteczkowym antygenem (peptydy, progesteron) wykazała w większości przypadków niewielkie przesunięcia przestrzenne w rejonie wiążącym, zarówno antygeny jak i przeciwciała, wskazując na indukowane dopasowanie się reagujących ze sobą obszarów. Dobrą ilustracją tego problemu jest też wykonane 20 lat temu proste doświadczenie z przeciwciałami poliklonalnymi przeciw natywnej mioglobinie (białko barwne zawierające hem i żelazo) i przeciw apomoglobinie (białko bezbarwne pozbawione hemu i żelaza) [1]. Oba antygeny różnią się nieznacznie konformacją. Przeciwciała anty-mioglobina dawały brunatny precypitat z tym antygenem i reagowały słabo z apomoglobiną, wskazując konformacyjny charakter większości rozpoznawanych epitopów. Natomiast przeciwciała anty-apomoglobina zmieszane z natywną (brunatną) mioglobiną dawały biały precypitat. Można sobie wyobrazić, że reakcja z przeciwciałem indukowała w mioglobinie konformację apomoglobiny, co powodowało usunięcie hemu i żelaza z kompleksu. Rosnąca obecnie liczba badań kompleksów Ag—Fab metodą krystalografii rentgenowskiej pozwoli na wyciąganie pewnych ogólnych wniosków z większym prawdopodobieństwem.

Analiza epitopu jest znacznie prostsza, jeśli ma on charakter liniowy, tzn. jest tworzony przez jeden określony odcinek sekwencji polipeptydu. Wstępnej lokalizacji tego epitopu można dokonać przez pomiar aktywności antygenowej fragmentów białka otrzymanych przez degradację proteolityczną lub chemiczną. Zastosowanie kilku metod degradacji rozcinających łańcuch polipeptydowy w różnych miejscach pozwala na ściślejszą lokalizację epitopu. Metoda ta jest szczególnie przydatna, jeśli sekwencja aminokwasowa antygeny i pozycje degradowanych wiązań peptydowych są znane. Zwykle jednak zidentyfikowany aktywny fragment antygeny jest większy od epitopu i dalej nie znamy rozmiaru epitopu, jego ścisłej lokalizacji, ani tego jakie reszty aminokwasowe są najważniejsze dla reakcji z przeciwciałem. Podobnie jak w przypadku epitopów konformacyjnych, można podjąć próby identyfikacji niektórych reszt przez badanie efektu ich modyfikacji na reakcję z przeciwciałem, ale jak omówiono powyżej, metoda ta nie zawsze jest skuteczna. Najpełniejszej informacji o epitopie sekwencyjnym dostarcza zastosowanie syntetycznych peptydów, których sekwencje można odpowiednio zaprogramować. Jednakże, mimo dużego postępu i automatyzacji metod syntezy peptydów, otrzymanie i tradycyjne testowanie (np. przez hamowanie przeciwciała w teście ELISA) dużej ich liczby jest pracochłonne i kosztowne. Przełomu w tej dziedzinie dokonały nowe, niekonwencjonalne metody otrzymywania peptydów i ich stosowania do analizy epitopów. Metody te są omówione poniżej.

ANALIZA EPITOPÓW ZA POMOCĄ SYNTETYCZNYCH PEPTYDÓW ZWIĄZANYCH Z FAZĄ STAŁĄ

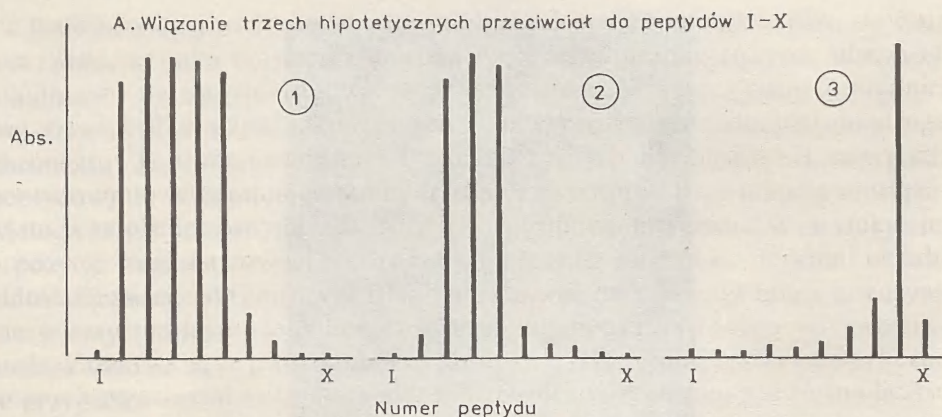
Nowymi elementami tej metody, wprowadzonej przez G e y s e n a i wsp. [7], są: (i) możliwość jednoczesnej syntezy dużej liczby peptydów związanych z fazą stałą oraz (ii) możliwość ich wielokrotnego używania w formie unieruchomionej do badania wiązania przeciwciał. W metodzie tej stosuje się bolce polietylenowe (kształtem przypominające grubą szpilkę, ang. pin), które na swej powierzchni mają grupy chemiczne pozwalające na przyłączenie aminokwasu przez grupę karboksylową, i które przymocowuje się do segmentów dających się zestawić w płytkę odpowiadającą rozmiarem płytce ELISA (Rys. 3). Dokonuje się na tych bolcach syntezy peptydów przez ich zanurzenie w roztworach odpowiednich pochodnych aminokwasów stosowanych w klasycznej syntezie peptydów, umieszczonych we wgłębieniu płytki. Ponieważ przyłączenie jednego aminokwasu zajmuje 1 dobę, można w ten sposób w ciągu kilku do kilkunastu dni (zależnie od długości peptydów) otrzymać na jednej płytce 96 peptydów. Następnie, bolce zawierające na swej powierzchni peptydy stosuje się do testowania wiązania przeciwciał metodą immunoenzymatyczną przez ich kolejne zanurzenie w roztworach: (i) testowanego przeciwciała (Ab1), (ii) drugiego przeciwciała anty-Ab1 sprzężonego z enzymem, (iii) substratu



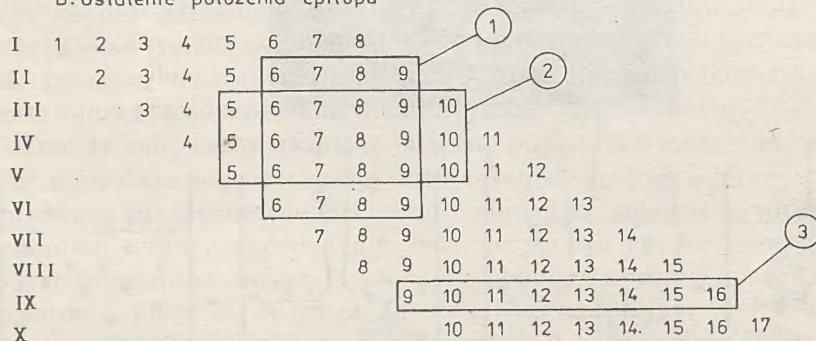
Rys. 3. Pomiar wiązania przeciwciała do syntetycznych peptydów przyłączonych do polietylenowych bolców. Bolce inkubuje się kolejno we wgłębieniach płytki ELISA zawierających 1 — roztwór badanego przeciwciała Ab1, 2 — roztwór drugiego przeciwciała anti-Ab1 sprzężonego z enzymem, 3 — roztwór substratu enzymu; po wyjęciu płytki z bolcami (4) odczytuje się reakcję barwną

enzymu (Rys. 3). Po wykonaniu testu usuwa się z bolców związane przeciwciała roztworem siarczuanu dodecyłu (SDS) i są one gotowe do następnego testu. Metoda ta w sposób decydujący rozwiązuje problem prędkości, ale niestety w mniejszym stopniu problem kosztów, ponieważ handlowo dostępne zestawy zawierające potrzebne materiały, reagenty i program komputerowy są obecnie bardzo drogie. Mimo to metoda ta jest stosowana w wielu laboratoriach [4, 9, 10, 16, 17, 23, 25].

Pierwszym etapem analizy antygeny, którego sekwencja jest znana, jest lokalizacja epitopu w łańcuchu polipeptydowym. W tym celu syntezuje się komplet „zachodzących na siebie” peptydów „pokrywających” sekwencję całego antygeny lub jego fragmentu, w którym wstępnie został zlokalizowany



B. Ustalenie położenia epitopu



Rys. 4. Lokalizacja epitopów liniowych w łańcuchu polipeptydowym antygeny za pomocą unieruchomionych „zachodzących na siebie” syntetycznych peptydów. Podano przykład 10 oktapeptydów (cyfry arabskie odpowiadają resztom aminokwasowym w tych pozycjach) „pokrywających” sekwencję 17 kolejnych reszt aminokwasowych w antygenie. Peptydy te testuje się na wiązanie przeciwciała, przykłady możliwych wyników pokazane są w górnej części ryciny. Jeżeli przeciwciało reaguje z peptydami II-VI (przykład 1) rozpoznaje ono epitop tetrapeptydowy 6-7-8-9; przeciwciało reagujące z peptydami III-V (przykład 2) jest skierowane na epitop heksapeptydowy 5-6-7-8-9-10; przeciwciało, które reaguje tylko z peptydem IX (przykład 3) rozpoznaje epitop oktapeptydowy 9-10-11-12-13-14-15-16 lub dłuższy, co można sprawdzić syntezując dłuższe peptydy

epitop. Pomiar wiązania przeciwciała do tych peptydów umożliwia ustalenie dokładnej lokalizacji i długości epitopu (Rys. 4). Dalszych informacji może dostarczyć synteza różnych analogów sekwencji stanowiącej epitop. Jeżeli epitop nie jest zbyt długi, można wykonać pełną „analizę zastąpieniową”, w której każdy z aminokwasów epitopu jest zastępowany wszystkimi innymi aminokwasami. Zważywszy, że w skład białek wchodzi 20 różnych aminokwasów, wymaga to syntezy $n \times 19$ peptydów, gdzie n jest liczbą reszt aminokwasowych w epitopie. W wyniku takiej analizy okazuje się, że nie wszystkie

reszty aminokwasowe w epitopie są jednakowo ważne dla reakcji z przeciwciałem. Aminokwasy, których zastąpienie przez jakikolwiek inny aminokwas powoduje utratę aktywności peptydu, odgrywają decydującą rolę w wiązaniu przeciwciała. Ponadto, w epitopach zwykle są obecne aminokwasy, które można zastąpić niektórymi lub wszystkimi innymi aminokwasami. Wynika z tego, że niesłuszne jest nazywanie wszystkich epitopów liniowych ciągłymi, ponieważ mogą one również zawierać reszty aminokwasowe nieistotne dla reakcji z przeciwciałem. Analizowane dotąd epitopy liniowe dla kilkudziesięciu przeciwciał monoklonalnych zawierały od czterech do kilkunastu reszt aminokwasowych. G e y s e n i wsp. [8] podzielili reszty aminokwasowe epitopów liniowych na dwie grupy, I (0–9 możliwych zastąpień) i II (10–19 możliwych zastąpień). Autorzy ci, analizując ponad 100 epitopów dla różnych przeciwciał monoklonalnych i poliklonalnych, wyliczyli, że średnio w jednym epitopie występuje 4,2 reszt grupy I.

Stosując wyżej opisaną metodę syntezy peptydów, można też podjąć próbę charakterystyki epitopu reagującego z przeciwciałem skierowanym przeciw białku o nieznannej sekwencji aminokwasów [6]. Zaczyna się w tym celu od syntezy na każdym bolcu mieszanek, np. oktapeptydów, które w 6 pozycjach zawierają różne aminokwasy (stosuje się na tych etapach mieszanek pochodnych wszystkich aminokwasów do syntezy), a w dwóch określonych pozycjach, np. 3 i 4, określoną parę aminokwasów, co przy 20 aminokwasach stanowi 400 kombinacji. Sekwencja dwupeptydowa obecna w peptydach o najwyższej aktywności jest dalej rozbudowywana do trójepeptydu przez dodanie każdego z aminokwasów do N- i C-końca dwupeptydu, co stanowi 40 nowych peptydów. Sekwencję trójepeptydową najaktywniejszego z tych 40 peptydów poszerza się dalej w myśl tej samej reguły i w ten sposób można dojść do dłuższej sekwencji wykazującej silną reakcję z przeciwciałem. Wprowadzanie dodatkowych elementów do syntezowanych w ten sposób peptydów, np. wstawianie β -alaniny umożliwiającej przegięcie peptydu, stwarza możliwości syntezy peptydu imitującego epitop konformacyjny. Wydedukowane tą metodą struktury nazywa się mimotopami, ponieważ nie muszą być one całkowicie identyczne z epitopem obecnym w antygenie białkowym. Konstrukcja mimotopów metodą syntezy peptydów wykonywana była w celu wykazania różnych możliwości tej metody, ale jest to zbyt skomplikowana technika do szerszego praktycznego zastosowania.

PEPTYDY SYNTEZOWANE PRZEZ FAGI

Nowym alternatywnym podejściem do analizy peptydowych ligandów (w tym epitopów dla przeciwciał) jest synteza sekwencji peptydowych w bakterio-fagach [2, 20]. Syntezuje się w tym celu mieszaninę oligonukleotydów mogących kodować wszystkie możliwe sekwencje peptydu o określonej długości. Za pomocą technik inżynierii genetycznej wstawia się te oligonukleotydy do genu

fagowego (używano w tym celu głównie genu III). Ponieważ każdy fag zawiera „wstawkę” jednego z oligonukleotydów, wyraża on na powierzchni tylko jedną z sekwencji peptydowych, zawartą w N-końcowym fragmencie białka powierzchniowego pIII, będącego produktem genu III. Z mieszaniny fagów zawierających dziesiątki milionów różnych „wstawionych” sekwencji peptydowych izoluje się za pomocą techniki powinowactwa te, które wiążą się z badanym przeciwciałem (fagi + przeciwciało sprzężone z biotyną, absorpcja do płytki opłaszczonej streptawidyną). Adherentne fagi namnaża się w *Escherichia coli* i kilkakrotnie powtarza się ich frakcjonowanie z użyciem przeciwciała. Z frakcji fagów reagujących z przeciwciałem izoluje się indywidualne kolonie i oznacza się w tych fagach sekwencję odpowiedniego odcinka DNA, co prowadzi do ustalenia sekwencji peptydu reagującego z przeciwciałem. Stosując przeciwciała rozpoznające zidentyfikowany wcześniej epitop, wykazano, że metoda ta może być użyta do identyfikacji mimotopów bez znajomości sekwencji aminokwasowej antygeny i bez wstępnych informacji o swoistości przeciwciała. Rozwój i coraz szersze stosowanie metod biologii molekularnej otwiera więc zupełnie nowe możliwości analizy epitopów, jak i wyznaczania struktury peptydowych ligandów dla innych układów.

W JAKIM CELU ANALIZUJE SIĘ EPITOPY ANTYGENÓW BIAŁKOWYCH?

Badania te mają zarówno aspekt poznawczy, jak i praktyczny. Analiza epitopów prowadzi do poznania mechanizmów ważnej biologicznie reakcji Ag—Ab, a mianowicie do określenia wielkości obszarów reagujących ze sobą, reszt aminokwasowych uczestniczących w oddziaływaniach, typu tych oddziaływań, zmian konformacyjnych i energetycznych towarzyszących reakcji [3, 5, 8, 13, 15, 26]. Analiza licznych epitopów białkowych pozwala na ustalenie zależności między immunogennością i strukturą i stwarza możliwości przewidywania immunogenności określonych obszarów antygeny białkowego na podstawie znajomości jego pierwszorzędowej i przestrzennej budowy [19]. Znajomość struktury epitopów i mimotopów (tzn. struktur reagujących krzyżowo z przeciwciałem) dostarcza też możliwości modulacji właściwości immunogennych i antygenowych białka, co może znaleźć zastosowanie w medycynie. Przez odpowiednie modyfikacje struktury antygeny można zwiększyć jego immunogenność, jeżeli antygen stosowany jest np. jako szczepionka, lub też zmniejszyć immunogenność, jeżeli białko stosowane jest jako lek lub reagent immunodiagnostyczny *in vivo* i odpowiedź immunologiczna jest niepożądana.

Tematem szerokich badań jest zastosowanie syntetycznych peptydów do wywołania produkcji przeciwciał, które reagują z białkiem zawierającym tę sekwencję peptydową [11, 18, 21, 22, 24]. Zastosowanie peptydów nie mających właściwości patogennych jest bowiem najbezpieczniejszym rozwiązaniem przy

sporządzaniu szczepionek przeciwko patogennym białkom. Znajomość epitopów antygenu białkowego jest potrzebna do wyboru odpowiednich sekwencji peptydowych stosowanych jako immunogeny.

Ponadto, przeciwciała monoklonalne i poliklonalne są szeroko stosowane w diagnostyce i prognostyce medycznej, a także w terapii pewnych chorób. Dokładna znajomość epitopów rozpoznawanych przez te przeciwciała czyni z nich bardziej precyzyjne reagenty i pozwala niejednokrotnie na wyciąganie dalej idących wniosków z wykonanych badań. Niepodważalna jest też wartość przeciwciał o dobrze scharakteryzowanej swoistości w badaniach medycyny sądowej i w innych dziedzinach nie związanych bezpośrednio z immunologią.

Podsumowując, analiza epitopów nie tylko przyczynia się do lepszego zrozumienia procesów immunologicznych, ale również stwarza możliwości nowych rozwiązań aplikacyjnych w medycynie i biotechnologii.

ELWIRA LISOWSKA

PROTEINS AS ANTIGENS: REACTIONS WITH ANTIBODIES AND ANALYSIS OF EPITOPES

Summary

The following problems are shortly reviewed: induction of humoral response against protein antigens, linear and conformational epitopes of proteins in the context of protein structure, strategies used for identification of epitopes, including the PEPSCAN method. The approaches to identification of epitope-mimicking structures (mimotopes) in the proteins of an unknown amino-acid sequence with the use of multipin peptide synthesis or peptide library on phages are also described.

LITERATURA*

1. Crumpton M. J. — *Protein Antigens. The molecular bases of antigenicity and immunogenicity*. [w] *The Antigens*, vol. 2 (Sela M., red.), s. 1–79, 1974.
2. Cwirła S. E., Peters E. A., Barrett R. W., Dower W. J. — *Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6378–6382, 1990.
3. Davies D. R., Padlan E. A., Sheriff S. — *Antibody Antigen Complexes*. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 439–473, 1990.
4. Duk M., Czerwiński M., Lisowska E. — *Identification of an epitope recognized by the monoclonal antibody PEP80 in the C-terminal cytoplasmic fragment of glycophorin A*. *Hybridoma*, 11, 181–189, 1992.
5. Getzoff E. D., Tainer J. A., Lerner R. A., Geysen H. M. — *The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens*. *Adv. Immunol.* 43, 1–97, 1988.

* Z powodu bardzo obszernej literatury dotyczącej omawianego tematu oparto się głównie na opracowaniach przeglądowych, podając jedynie nieliczne prace doświadczalne jako przykłady.

6. Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J. — *A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant*. *Molec. Immunol.* 23, 709–715, 1986.
7. Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J., Tribbick G., Schoofs P. G. — *Strategies for epitope analysis using peptide synthesis*. *J. Immunol. Meth.* 102, 259–274, 1987.
8. Geysen H. M., Mason T. J., Rodda S. J. — *Cognitive Features of Continuous Antigenic Determinants*. *J. Molec. Recogn.* 1, 32–41, 1988.
9. Horsfall A. C., Hay F. C., Soltys A. J., Jones M. G. — *Epitope Mapping*. *Immunol. Today* 12, 211–213, 1991.
10. Janvier B., Archinard P., Mandrand B., Gaudeau A., Barin F. — *Linear B cell epitopes of the major core protein of human immunodeficiency virus types 1 and 2*. *J. Virol.* 64, 4258–4263, 1990.
11. Kara U., Pye D., Lord R., Pam C., Gauld H., Geysen M., Jones G., Stenzel D., Kidson C., Saul A. — *Immune response to a synthetic peptide corresponding to an epitope of a parasitophorous vacuole membrane antigen from Plasmodium falciparum*. *J. Immunol.* 143, 1334–1339, 1989.
12. Köhler G., Milstein C. — *Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature* 256, 495–497, 1975.
13. Laver W. G., Air G. M., Webster R. G., Smith-Gill S. J. — *Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities*. *Cell* 61, 553–556, 1990.
14. Lisowska E. — *Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowania w badaniach biochemicznych*. *Post. Biochem.* 32, 5–13, 1986.
15. Nowotny J. — *Protein antigenicity: a thermodynamic approach*. *Mol. Immunol.* 28, 201–207, 1991.
16. Ralston S., Hoepflich P., Akita R. — *Identification and synthesis of the epitope for a human monoclonal antibody which can neutralize human T cell leukemia/lymphotropic virus type I*. *J. Biol. Chem.* 264, 16343–16346, 1989.
17. Ramarany R., Jones G., Lord R. — *Characterisation of an inhibitory monoclonal antibody-defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen*. *Immunol. Lett.* 23, 305–310, 1990.
18. Van Regenmortel M. H. V. — *Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: new insights and applications*. *TIBS* 12, 237–240, 1987.
19. Van Regenmortel M. H. V., Daney de Marcillac G. — *An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins*. *Immunol. Lett.* 17, 95–108, 1988.
20. Scott J. K., Smith P. — *Searching for peptide ligands with an epitope library*. *Science* 249, 386–390, 1990.
21. Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Green N., Lerner R. A. — *Synthetic peptide immunogens as vaccines*. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 351–371, 1983.
22. Spangler B. D. — *Binding to native proteins by antipeptide monoclonal antibodies*. *J. Immunol.* 146, 1591–1595, 1991.
23. Tindle R. W., Smith J. A., Geysen H. M., Selvey L. A., Frazer I. H. — *Identification of B epitopes in human papillomavirus type 16E7 open reading frame protein*. *J. Gen. Virol.* 71, 1347–1354, 1990.
24. Traish A. M., Wotiz H. H. — *Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide (533–547) recognize a specific site in unactivated (85) and activated (45) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptor*. *Endocrinology* 127, 1167–1175, 1990.
25. Waśniowska K., Duk M., Czerwiński M., Steuden I., Duś D., Radzikowski C., Bartosz-Bechowski H., Konopińska D.,

- Lisowska E. — *Analysis of peptidic epitopes recognized by the three monoclonal antibodies specific for the same region of glycophorin A but showing different properties.* Molec. Immunol, 29, 783–791, 1992.
26. Wilson I. A., Stanfield R. L., Rini J. M., Arevalo J. H., Schulze-Gahmen U., Fremont D. H., Stura E. A. — *Structural aspects of antibodies and antibody-antigen complexes.* [w] *Catalytic Antibodies* (Chadwick D. J., red.), Wiley, Chichester, s. 13–39, 1991.

WŁODZIMIERZ PTAK

Zakład Immunologii

Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika

Kraków

MECHANIZMY PREZENTACJI I ROZPOZNANIA ANTYGENU

Wniknięcie antygeny do ustroju wyzwała skomplikowany ciąg procesów, w których biorą udział rozmaite typy komórek i wydzielane przez nie produkty. Dopiero w latach pięćdziesiątych wykazano, że główną komórką odpowiedzi immunologicznej jest limfocyt – później stwierdzono, że istnieją co najmniej dwa typy limfocytów, limfocyty T i B, pełniące odmienne funkcje. Limfocyty T dzielą się na wyspecjalizowane grupy komórek przeznaczone do odmiennych zadań. Efektem działania antygeny i interakcji komórkowych jest pojawienie się odpowiedzi immunologicznej, która może manifestować się wytwarzaniem przeciwciał przez limfocyty B, najczęściej przy współudziale limfocytów T (odpowiedź humoralna), lub też powstaniem tzw. uczulonych limfocytów T (odpowiedź typu komórkowego). Umownie dzielimy cały ten ciąg procesów na fazę indukcji, w której system immunologiczny dokonuje rozpoznania antygeny jako substancji obcej w ustroju, fazę centralną, w której zachodzą liczne skomplikowane interakcje pomiędzy różnego typu komórkami, prowadzące do ekspansji klonów antygenowo-swoistych limfocytów B lub T, wreszcie na fazę efektorową (wykonawczą), w której pojawiają się komórki wytwarzające przeciwciała lub też limfocyty uczulone, mogące np. odrzucić obcy przeszczep.

W latach sześćdziesiątych stwierdzono, że w indukcji odpowiedzi immunologicznej uczestniczy dodatkowo komórka nie będąca limfocytem, którą, nie rozumiejąc w pełni jej funkcji, nazwano komórką pomocniczą lub dodatkową („accessory”). Istotne postępy w wyjaśnieniu jej działania przyniósł rozwój metod hodowli limfocytów, co pozwoliło na odtworzenie odpowiedzi immunologicznej poza ustrojem, *in vitro*, i ilościowe i jakościowe manipulacje komórkami biorącymi udział w odpowiedzi immunologicznej. W jednym z pierwszych doświadczeń tego typu stwierdzono, że komórki śledziony myszy hodowane *in vitro* w obecności antygeny wytwarzają przeciwciała. Komórki te można było podzielić na podstawie ich adherencji do powierzchni na dwie frakcje – nie przylegającą, składającą się z limfocytów, i przylegającą, w której skład wchodziły głównie makrofagi. Żadna z tych frakcji osobno nie wytwarzała w obecności antygeny przeciwciał, natomiast ich ponowne połączenie przywracało tę zdolność. Po raz pierwszy udokumentowano wówczas, że limfocyty, aby wytworzyć przeciwciała, muszą współpracować z makrofagami, komórkami nie będącymi limfocytami. Należy dodać, że makrofagi obdarzone

silną zdolnością do fagocytozy (np. bakterii) były uważane dotąd raczej za komórki o nieskomplikowanej, choć wysoce użytecznej funkcji, biorące udział w usuwaniu i niszczeniu antygenów, a nie niezbędne w jego rozpoznaniu.

Problem, w jaki sposób układ immunologiczny rozpoznaje antygen, jakie warunki muszą być spełnione, aby rozpoznanie takie nastąpiło, stał się jednym z głównych problemów, którymi od przeszło dwudziestu lat zajmuje się immunologia. Mechanizm kooperacji, współdziałania pomiędzy makrofagami a limfocytami okazał się znacznie bardziej skomplikowany niż początkowo sądzono. Przede wszystkim stwierdzono, że funkcję podobną jak makrofagi mogą pełnić również inne typy komórek, stąd też ogólna ich nazwa „komórki prezentujące antygen” (antigen presenting cells, APC). Obecne poglądy są rezultatem wielu, niejednokrotnie nieoczekiwanych odkryć dotyczących zarówno mechanizmu przygotowania i prezentacji antygenów, jak i sposobu, w jaki antygen „widzą” limfocyty T.

Odkrycia te dotyczyły tak pozornie odległych zagadnień jak:

- 1) budowy antygenów transplantacyjnych (MHC) i ich funkcji;
- 2) budowy receptorów limfocytów T;
- 3) antygenów różnicowania limfocytów T;
- 4) cząsteczek powierzchniowych warunkujących przyleganie komórek (cząsteczek adhezyjnych);
- 5) mediatorów wytwarzanych przez makrofagi (monokin);
- 6) metabolizmu antygenów przez makrofagi.

Niniejszy artykuł ma na celu jedynie zasygnalizowanie wysokiego stopnia złożoności układu immunologicznego, a w szczególności skomplikowanych mechanizmów rozpoznawania antygenów. Konieczne więc stało się przedstawienie ich w sposób eliminujący szczegóły, ale nie zmieniający istoty rzeczy. Dla uniknięcia dwuznaczności i odróżnienia antygenów MHC od innych, używam dla tych drugich określenia „antygen konwencjonalny” lub też w zależności od kontekstu „peptydy immunogenne” lub „fragmenty antygenów”.

BUDOWA ANTYPENÓW TRANSPLANTACYJNYCH

Od samego początku badań nad indukcją odporności pojawił się problem tzw. „restrykcji” rozpoznania antygenów. Polega ona na tym, że limfocyty T rozpoznają antygen jedynie wtedy, gdy jest on związany z makrofagami syngenicznymi, tzn. pochodzącymi albo od tego samego osobnika, albo też od identycznego genetycznie (wsobnego). Zwierzęta wsobne mają taki sam zestaw antygenów transplantacyjnych (zgodności tkankowej) na powierzchni komórek. Antygeny te kodowane są przez kompleks genów, tzw. głównego układu zgodności tkankowej (MHC). Istnieją dwa rodzaje antygenów transplantacyjnych — antygeny klasy I, ulegające ekspresji na wszystkich komórkach somatycznych, oraz antygeny klasy II, znajdujące się na niektórych tylko komórkach układu immunologicznego, przede wszystkim na komórkach pre-

zentujących antygen i limfocytach B. Antygeny MHC należą do nadrodziny immunoglobulin (NRI)¹ i składają się z dwóch łańcuchów. Łańcuch ciężki (α) antygeny klasy I ma strukturę trójdomenową, łańcuch lekki (β) jest jedno-domenową β_2 -mikroglobuliną. Antygen klasy II składa się z dwóch łańcuchów o podobnej wielkości (α i β), z których każdy ma dwie domeny. Domeny $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (klasa I) oraz $\alpha 1$ i $\beta 1$ (klasa II) wykazują znaczną zmienność sekwencji aminokwasów (liczne formy alleliczne) i tworzą miejsce wiązania fragmentów antygeny konwencjonalnego w obrębie komórki prezentującej antygen. Miejsce wiązania jest wielofunkcyjne, nie ma podobnie swoistego charakteru jak miejsce wiązania w cząsteczce przeciwciała, czy w receptorze limfocytów T. Antygeny MHC syntetyzowane są w siateczce cytoplazmatycznej. W skład antygenów klasy II wchodzi dodatkowy łańcuch Ii (invariant = niezmienny).

Znaczna heterogenność antygenów MHC w obrębie populacji ludzkiej sprawia, że ilość możliwych ich kombinacji jest niezwykle wysoka (rzędu miliardów). Limfocyty T rozpoznają więc antygen wyłącznie na komórkach APC pochodzących od osobnika, który ma identyczną jak dawca limfocytów budowę molekularną powierzchniowych antygenów transplantacyjnych.

BUDOWA RECEPTORÓW LIMFOCYTÓW T

Limfocyty B rozpoznają antygen bezpośrednio przez wbudowane w błonę komórkową receptory będące immunoglobulinami, które dystrybuowane są w sposób klonalny, tak że określony klon limfocytów (grupa komórek mająca wspólną komórkę macierzystą) ma zakodowaną nieodwracalnie swoistość. Ze względu na niespotykany w przyrodzie poza układem immunologicznym sposób kodowania genetycznego, układ generuje niezwykle wysoką liczbę różnych immunoglobulin, o odmiennej swoistości. Receptory limfocytów B oprócz małego fragmentu zakotwiczonego je w błonie komórkowej są identyczne z immunoglobulinami krążącymi w krwi i w płynach tkankowych. Nie udało się jednak wykazać bezpośredniego wiązania się antygeny z recep-

¹ Materia żywa wykazuje zdolność do generowania nowych struktur, czego dowodem cała ewolucja organizmów, gdy jednak jej wytwór jest szczególnie udany, postępuje konsekwentnie według reguły Occhama („nie należy mnożyć bytów ponad potrzebę”) i raczej wykorzystuje podstawowy wzorec, modyfikując go zgodnie z celami, niż tworzy nowe formy. Jednym z takich udanych produktów ewolucji jest nadrodzina immunoglobulin (NRI), grupa białek, którą łączy pewien wspólny motyw strukturalny. Jest nim istnienie tzw. domen, odcinków około 90–100-aminokwasowych zamkniętych wiązaniami dwusiarczkowymi (S-S) i posiadających specyficzną budowę przestrzenną; najprostszym przedstawicielem tej nadrodziny jest β_2 -mikroglobulina, składnik antygenów MHC klasy I, a najbardziej skomplikowanymi—cząsteczki immunoglobulin czy receptory limfocytów T. Większość białek wchodzących w skład tej nadrodziny bierze udział w powstawaniu i regulacji odpowiedzi immunologicznej. Należą więc tutaj, oprócz wspomnianych receptorów antygenowych limfocytów B i T, antygeny MHC klasy I i II, niektóre receptory adhezyjne (CD2, LFA-2), antygeny różnicowania CD4 i CD8 oraz CD3, niektóre receptory dla interleukin (np. IL-1R, IL-6R) oraz receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin (receptory Fc).

torami limfocytów T (TCR), co sugerowało, że limfocyty T nie rozpoznają antygeny bezpośrednio. Wiadomo obecnie, że TCR zbudowane są na identycznej zasadzie molekularnej jak receptory Ig (zaliczamy je oba do NRI) i mają strukturę dwułańcuchową, choć różnią się od immunoglobulin ukształtowaniem miejsca wiązania antygeny. Nie wiążą się one bezpośrednio z antygenem jak immunoglobuliny, ale rozpoznają na powierzchni komórki APC kompleks, w skład którego wchodzi sfragmentowany enzymatycznie antygen (p.niżej) oraz antygen transplantacyjny klasy I lub II. Mówimy o rozpoznaniu „łącznym” lub „asocjatywnym”, a także o „restrykcji” rozpoznania, spowodowanej wymogiem identyczności genetycznej APC i limfocytów T. W skład receptora antygenowego limfocytów T wchodzi dodatkowo cztery lub pięć łańcuchów peptydowych zlokalizowanych w cytoplazmie (łącznie określanych jako CD3; większość z nich należy do NRI), których zadaniem jest przeniesienie informacji o połączeniu TCR z antygenem do wnętrza komórki. Mimo istnienia wielu funkcjonalnych subpopulacji limfocytów T, wszystkie łączy posiadanie podobnie funkcjonującego receptora antygenowego. W okresie gdy niewiele było wiadomo o mechanizmach rozpoznawania antygeny, a wiedziano jedynie, że limfocyty T rozpoznają go odmiennie od limfocytów B, sir Peter Medawar, jeden z współtwórców współczesnej immunologii, ujął to w aforyzmie „*antygen musi być przedstawiony limfocytom T przez odpowiednie kanały dyplomatyczne*”.

ANTYGENY RÓŻNICOWANIA LIMFOCYTÓW T

Wśród jednolitej, jak się początkowo wydawało, populacji limfocytów T wyosobniono, biorąc pod uwagę jedynie aspekty funkcjonalne, szereg subpopulacji. I tak, stwierdzono istnienie limfocytów pomocniczych (indukujących), współpracujących z limfocytami B w trakcie odpowiedzi humoralnej, efektorowych — odpowiedzialnych za odpowiedź typu komórkowego, cytotoksycznych — mających zdolność zabijania innych komórek, supresyjnych — hamujących odpowiedź immunologiczną, pamięci immunologicznej — zachowujących pamięć po uprzednim zetknięciu się z antygenem i odpowiedzialnych m.in. za trwałą odporność po przebyciu pewnych zakażeń. Później odkryto, że pewne funkcje limfocytów T korelują z obecnością na ich powierzchni antygenów określanych ogólnie jako antygeny różnicowania. Wśród nich najważniejsze są antygeny CD4 i CD8, oba należące do NRI. Antygen CD4 znajduje się na powierzchni limfocytów pomocniczych (indukujących) i efektorowych, a antygen CD8 na limfocytach cytotoksycznych i supresyjnych. Rola tych antygenów różnicowania była do niedawna niejasna, choć służyły one jako wygodny marker powierzchniowy dla oceny ilościowej (np. w AIDS drastycznemu obniżeniu ulega liczba limfocytów CD4). Niezależnie jednak od antygenów różnicowania, limfocyty T mają w zasadzie identyczny sposób rozpoznawania antygeny. Obecnie wiadomo, że antygeny CD4 i CD8 biorą aktywny

udział w interakcjach komórka APC – limfocyt T, łącząc się z antygenami MHC (określane są też niekiedy jako „koreceptory”, choć z formalnego punktu widzenia można by je było zaliczyć również do grupy adhezyn, p. niżej).

PRZYLEGANIE (ADHEZJA) KOMÓREK (CELL ADHESION MOLECULES, CAM)

Rozwój embrionalny, zachowanie architektury tkanek, odczyn zapalny i gojenie ran, tworzenie przerzutów komórek nowotworowych – to przykłady procesów, których warunkiem są interakcje komórek z innymi komórkami i substancjami międzykomórkowymi. Mechanizmy tych interakcji są domeną badań nowej, burzliwie rozwijającej się dziedziny nauk biologicznych – topobiologii. Układ immunologiczny tworzą limfocyty, które są komórkami ruchliwymi, migrującymi stale w organizmie. Fizyczne zetknięcie się ich (adhezja) z innymi komórkami, które jest warunkiem koniecznym powstania odpowiedzi immunologicznej, zachodzi w strukturalnie stabilnych narządach limfatycznych (węzły chłonne, śledziona). Adhezja polega na łączeniu się odpowiednich receptorów na powierzchni komórek na zasadzie ich podobieństwa strukturalnego (wiązanie homotypowe) lub też odmienności (wiązanie heterotypowe). Budowa receptorów komórkowych biorących udział w procesach adhezji jest przedmiotem intensywnych badań. Receptory te umożliwiają interakcje komórek układu immunologicznego między sobą, przyleganie ich do śródbłonnka naczyń i migrację z naczyń do tkanek (np. w ognisku zapalnym), adherencję do substancji międzykomórkowej i komórek między sobą w różnych tkankach. Obecnie znanych jest kilka grup cząsteczek adhezyjnych o odmiennej budowie chemicznej i funkcji. Z punktu widzenia mechanizmów rozpoznania antygeny najważniejsze są cząsteczki adhezyjne należące do nadrodziny immunoglobulin (NRI) oraz integryny. Integryny mają dwułańcuchową strukturę molekularną. Wśród przedstawicieli tej grupy niektóre integryny warunkują wiązanie się komórek z substancją międzykomórkową (receptory dla fibronektyny, witronektyny, lamininy). Inna grupa integryn jest odpowiedzialna za adhezję komórek układu białokrwinkowego między sobą; wśród nich szczególna rola w mechanizmie prezentacji antygeny przypada integrynie LFA-1. Integryna ta występuje w znacznej ilości na limfocytach T. Ligandem LFA-1 jest ICAM-1 i ICAM-2 (intercellular) należące do grupy NRI. Są one obecne m.in. na komórkach prezentujących antygen, ale również na wielu innych komórkach różnego pochodzenia. ICAM odgrywa również rolę w interakcjach leukocytów ze śródbłonnikiem naczyniowym. Do nadrodziny immunoglobulin należą adhezyny CD2 oraz LFA2, występujące na limfocytach T i APC i reagujące ze sobą na zasadzie receptor–ligand. Inną rodzaje cząsteczek adhezyjnych to selektyny, o niezwykle skomplikowanej budowie, cadheryny i adresyny, które biorą udział w adhezji leukocytów do ściany naczyń.

CYTOKINY I MONOKINY

Indukcja odpowiedzi immunologicznej, a także jej faza efektorowa, podlega regulacji przez rozpuszczalne antygenowo-nieswoiste mediatory, nazywane cytokinami lub interleukinami. Działają one na wrażliwe komórki przez ich odpowiednie receptory powierzchniowe. Większość cytokin jest wielofunkcyjna, ponadto aktywności odrębnych cytokin mogą być identyczne. Interakcje pomiędzy działaniem poszczególnych interleukin są bardzo złożone. Wytwarzane są one zarówno przez komórki układu immunologicznego (monocyty, limfocyty), jak i wiele innych typów komórek. Przykładem interleukin wytwarzanych przez makrofagi, ale i wiele innych komórek, są IL-1, IL-6 oraz TNF α (tumor necrosis factor — czynnik martwicy nowotworów). Najwcześniej odkryta IL-1 jest najważniejszą monokiną wytwarzaną przez makrofagi i partycypuje między innymi w prezentacji i indukcji odpowiedzi immunologicznej. Indukuje autokrynnie ekspresję cząsteczki adhezyjnej ICAM-1 na makrofagach. Działa jednak przede wszystkim na limfocyty T, lecz także na B. Inna monokina TNF α również zwiększa ekspresję ICAM-1.

KOMÓRKI PREZENTUJĄCE ANTYPEN (ANTYPEN PRESENTING CELL, APC)

Obecnie przyjmuje się, że określenie „komórka prezentująca antygen” (APC, antigen presenting cell) jest pojęciem funkcjonalnym i określa jakąkolwiek komórkę mającą zdolność stymulacji antygenowej limfocytów T. Minimalnym zatem warunkiem jest zdolność do endocytozy antygenu i posiadanie antygenów transplancyjnych (MHC) klasy I lub I i II.

W okresie gdy rola makrofagów w indukcji odpowiedzi immunologicznej nie była jeszcze znana, a zdawano sobie już sprawę z ich niezbędności, określono je terminem „komórki dodatkowe” (accessory cells). Później przez pewien czas funkcję prezentacji antygenu przypisywano wyłącznie makrofagom i komórkom pokrewnym, wywodzącym się ze wspólnej komórki prekursorowej w szpiku kostnym.

Rola komórki prezentującej antygen polega na wchłonięciu antygenu, wewnątrzkomórkowym jego przetworzeniu (processing), związaniu jego fragmentów z antygenami transplancyjnymi I lub II klasy i ekspozycji kompleksów na błonie komórkowej. Limfocyty T CD8+ (cytotoksyczne) rozpoznają antygen konwencjonalny w kontekście antygenów MHC klasy I, zatem w ich przypadku jako APC może służyć jakąkolwiek komórka somatyczna. Odmienienie przedstawia się sprawa z limfocytami T CD4+ (pomocnicze/indukujące), które „widzą” antygen konwencjonalny łącznie z antygenami MHC klasy II, ulegającymi ekspresji na niektórych jedynie komórkach. Makrofagi mają oba typy antygenów MHC i mogą prezentować antygen konwencjonalny wszystkim subpopulacjom limfocytów T, niezależnie czy rozpoznają go w kontekście antygenów MHC klasy I, czy klasy II. Jako APC mogą funkcjonować

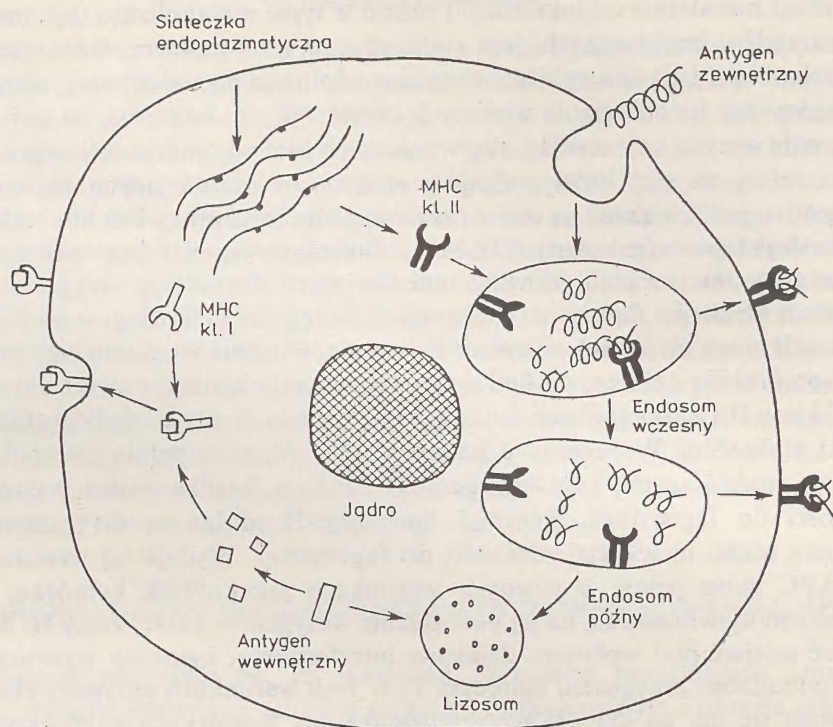
makrofagi niezależnie od lokalizacji i różnic w typie metabolizmu (np. makrofagi narządów limfatycznych, jam ciała, płuc, wątroby, skóry, tzw. komórki Langerhansa). Mają one wybitnie wyrażone zdolności do endocytozy, szczególnie fagocytozy (pochłanianie większych cząsteczek np. bakterii), co związane jest przede wszystkim z wysoką aktywnością ich błony komórkowej, a ponadto z obecnością na niej kilku rodzajów receptorów ułatwiających fagocytozę antygenów, jeśli związane są one z przeciwciałami (receptory Fc) lub białkami układu dopełniacza (receptory C3). Makrofagi mają wreszcie niezwykle bogaty zestaw enzymów proteolitycznych, umożliwiający degradację antygeny. Pod względem szybkości fagocytozy i degradacji antygeny makrofagi o odmiennej lokalizacji mogą się jednak różnić dość istotnie. Obecnie wiadomo, że również inne komórki nie należące do linii makrofagów mają konstytutywnie antygeny MHC klasy II i mogą spełniać funkcję APC, niejednokrotnie bardziej efektywnie niż makrofagi. W narządach limfatycznych rolę taką pełnią nie spokrewnione z makrofagami komórki dendrytyczne, o bardzo słabo wyrażonej zdolności do fagocytozy. Również limfocyty B zdolne są do prezentacji antygeny mimo niewielkiej zdolności do fagocytozy. Wydaje się wreszcie, że rolę APC może pełnić w pewnych warunkach jakakolwiek komórka, pod warunkiem ujawnienia się na jej powierzchni antygenów MHC klasy II. Może to mieć miejsce pod wpływem działania interferonu γ , cytokiny wytwarzanej przez pobudzone antygenem limfocyty T. W tych warunkach antygeny klasy II pojawiają się np. na komórkach śródbłonna czy komórkach nabłonkowych tarczycy. Jak skuteczna jest jednak prezentacja antygeny przez te rodzaje komórek jest sprawą dyskusyjną, tym bardziej że w niewielkim stopniu mają one zdolność przygotowania antygeny.

PRZETWORZENIE (PROCESSING) ANTYGENY (rys. 1)

Celem przetworzenia antygeny wewnątrz komórki APC jest taka jego biochemiczna degradacja, aby stał się on zdolny do związania się z antygenem MHC, nie tracąc równocześnie zdolności wywołania odpowiedzi immunologicznej. Stopień degradacji różnych białek, konieczny do uzyskania tego celu, jest zmienny — niekiedy wystarczy jedynie rozerwanie wiązań dwusiarczkowych, co prowadzi do rozwinięcia cząsteczki (np. białka denaturowane), inne muszą ulec pocięciu na mniejsze odcinki, istnieją wreszcie nieliczne białka nie wymagające w ogóle przygotowania enzymatycznego. Antygeny prezentowane przez APC ze względu na źródło pochodzenia i relację do APC należą do dwóch kategorii:

- 1) antygeny wewnętrzne, endogenne, powstające wewnątrz samej komórki APC,
- 2) antygeny zewnętrzne, egzogenne dostające się do APC drogą endocytozy.

Pojęcie „antygen zewnętrzny” i „antygen wewnętrzny” odnosi się do ich relacji do APC. Obie te grupy obejmują zatem, oprócz antygenów poza-



Rys. 1. Wewnątrzkomórkowy los antygeny (przygotowanie antygeny) i wiązanie fragmentów z antygenami MHC klasy I i II

Białka syntetyzowane w cytoplazmie podlegają tam trawieniu enzymatycznemu. Fragmenty przeniesione do siateczki endoplazmatycznej wiążą się z syntetyzowanymi w niej antygenami MHC klasy I i są transportowane na powierzchnię komórki. Białka zewnętrzne, internalizowane w endosomach, są trawione enzymatycznie do mniejszych fragmentów przez enzymy — katepsyny B i D, a następnie po fuzji endosomu z lizosomem ulegają całkowitej degradacji. Antygeny MHC klasy II zostają inkorporowane do błony endosomu, a ich łańcuch li strawiony enzymatycznie, co pozwala na związanie się z molekułą MHC fragmentu antygeny. Kompleksy transportowane są na powierzchnię komórki. Znaczna część antygenów MHC klasy II ulega recyrkulacji i jest używana powtórnie

ustrojowych (np. białka bakteryjne), również białka własne ustroju. W tym kontekście białka endogenne są własnymi białkami APC, a białka egzogenne białkami np. płynów ustrojowych (albumina, immunoglobuliny etc.). Wewnątrzkomórkowe losy antygenów endogennych i egzogennych są odmienne i są one prezentowane na powierzchni APC, odpowiednio w połączeniu z antygenem MHC klasy I lub II.

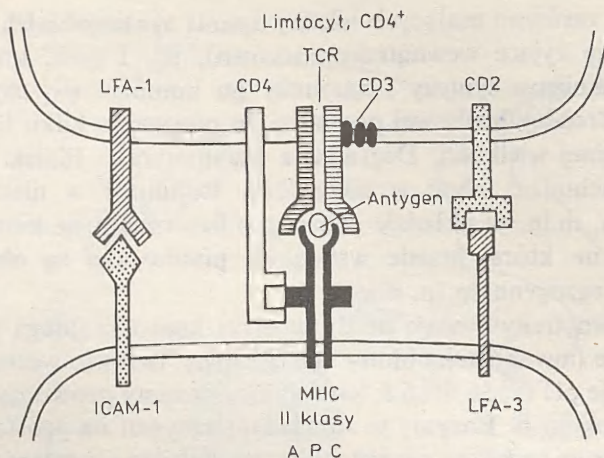
Antygeny endogenne ulegają degradacji enzymatycznej na kilku alternatywnych drogach, z których najważniejszą jest trawienie przez proteazy (enzymy rozkładające białka) znajdujące się w cytosolu komórkowym. Jak wspomniano wyżej, antygenem endogennym może być każde białko znajdujące się w cytoplazmie komórki, tak białka własne komórki, jak i białka pasożytów zakażają-

cych komórkę, zarówno mających własny aparat syntezy białek (np. pierwotniaki i bakterie żyjące wewnątrzkomórkowo), jak i tych, które nie mają własnego mechanizmu syntezy i narzuciły go komórce (wirusy). Trawienie enzymatyczne drobiny białkowej prowadzi do powstania kilku lub kilkunastu fragmentów różnej wielkości. Degradacja enzymatyczna białek endogennych może także zachodzić, choć w niewielkim stopniu i w niektórych tylko okolicznościach, m.in. w układzie endosomo-lizosomalnym komórki. Jest to jednak droga, na której przede wszystkim poddawane są obróbce białka o pochodzeniu egzogennym (p. niżej).

Antygen zewnętrzny dostaje się do wnętrza komórki (ulega internalizacji) przez wgłębienie (inwaginację) błony komórkowej, tworząc wczesny endosom, w którym panuje pH rzędu 6–6,5, zawierający enzymy proteolityczne — katepsynę D i katepsynę B. Enzymy te rozkładają antygen na prostsze fragmenty (peptydy). Wczesny endosom nie jest strukturą stabilną i w miarę upływu czasu ulega w nim zwiększeniu zawartość enzymów i obniżeniu pH; w stadium późnego endosomu, co następuje po około 20 min, pH obniża się do 5,5. W pewnych warunkach, szczególnie w przypadku APC o słabej zdolności do endocytozy (np. komórki dendrytyczne, limfocyty B), trawienie antygeny może zachodzić zewnątrzkomórkowo i mogą brać w tym udział proteazy związane z błoną komórkową. W ostatnim wreszcie stadium endosom ulega połączeniu z lizosomem. Enzymy zawarte w lizosomach, syntetyzowane w aparacie Golgiego, powodują całkowitą degradację białka antygenowego i utratę jego immunogenności. Powstałe dwupeptydy i wolne aminokwasy są następnie transportowane do cytoplazmy, gdzie służą jako materiał budulcowy lub energetyczny.

PREZENTACJA ANTYGENU (rys. 2)

Powstałe we wnętrzu komórki APC fragmenty antygeny konwencjonalnego (immunogenne peptydy) muszą obecnie, w celu prezentacji limfocytom T, zostać przetransportowane na powierzchnię. Mechanizmy transportu w obu przypadkach wyglądają nieco odmiennie. Przygotowane enzymatycznie w cytosolu fragmenty antygenów endogennych ulegają translokacji i związaniu w obrębie siateczki endoplazmatycznej z syntetyzowanymi antygenami MHC klasy I. Nie związane peptydy są degradowane do aminokwasów. Kompleksy antygen konwencjonalny — antygen MHC klasy I są następnie transportowane poprzez aparat Golgiego (gdzie do MHC I przyłączane są reszty cukrowe) na powierzchnię komórki, proces ten trwa około 30 min. Antygeny MHC klasy II, również syntetyzowane w siateczce endoplazmatycznej, zostają inkorporowane do błony endosomu, gdzie enzymatycznemu rozkładowi ulega ich łańcuch Ii (invariant), co odsłania miejsce wiązania dla sfragmentowanego w endosomie antygeny. Endosomy, w których zaszła opisana interakcja, mogą tworzyć wtórne pęcherzyki, które są transportowane na powierzchnię komórki. W na-



Rys. 2. Rozpoznanie antygenu przez limfocyty T

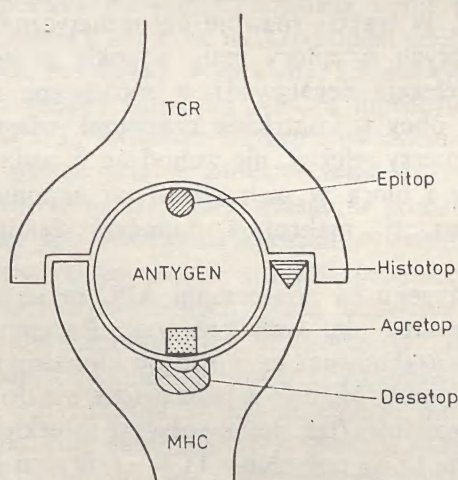
Połączenie receptorów powierzchniowych limfocytów T z ligandami na komórce APC jest warunkiem rozpoznania antygenu. Antygenowo-swoisty receptor TCR-CD3 limfocyta CD4 rozpoznaje antygen na komórce APC w kontekście antygenu MHC klasy II. Antygen różnicowania (koreceptor) CD4 wiąże się z antygenem MHC klasy II. Integryna LFA-1 na powierzchni limfocyta CD4 wiąże się z adhezyną ICAM-1 (lub 2), podobnie wiąże się adhezyny CD2 i LFA-3 (w przypadku limfocyta CD8, koreceptor wiąże się z antygenem MHC klasy I)

stępnym okresie, po ok. 20 min wczesny endosom przechodzi w stadium późnego endosomu, w którym pH obniża się do 5,5 i białko ulega dalszemu trawieniu enzymatycznemu. Choć późny endosom nie wytwarza wtórnych pęcherzyków ulegających recykliczacji na błonę komórki, kompleksy mogą być transportowane na powierzchnię na drodze niedostatecznie poznanych jeszcze procesów.

Wiązanie fragmentów peptydowych z antygenami MHC następuje w obrębie zagłębienia utworzonego przez domenę $\alpha 1$ i $\alpha 2$ łańcucha ciężkiego antygenu MHC klasy I lub też w miejscu zetknięcia łańcuchów α i β antygenów MHC klasy II. Wielkość miejsca wiązania odpowiada odcinkowi 10–20 aminokwasów. Wiązanie fragmentu antygenu konwencjonalnego z antygenem MHC zachodzi relatywnie wolno i polega na utworzeniu wiązań hydrofobowych i elektrostatycznych, natomiast po utworzeniu jest wysoce stabilne. Wiązanie to, jak wspomniano już poprzednio, nie ma charakteru swoistego (takiego jak wiązanie antygen-przeciwciało) i jakikolwiek antygen MHC jest potencjalnie zdolny do przyłączenia wielu rodzajów odmiennych fragmentów. Sprawia to, że istnieje wewnątrzkomórkowa konkurencja fragmentów antygenu o wolne miejsce wiążące na antygenach MHC, przy czym konkurencja ta zachodzi nie tylko między antygenami obcymi dla ustroju, ale również, a może nawet przede wszystkim, między nimi a antygenami własnymi (autoantygenami), które ulegają podobnej fragmentacji w obrębie APC jak antygeny obce. Autoantygeny występują zawsze w nadmiarze w porównaniu z antygenami obcymi, stąd też konieczność istnienia mechanizmów zmniejszających ich szansę na zablokowanie antygenów MHC. Konkurencja ta jest mniej efektyw-

na w przypadku antygenów MHC klasy I, które są produkowane w nadmiarze. Natomiast w przypadku antygenów MHC klasy II wiązanie przez nie fragmentów antygeny uniemożliwia do chwili inkorporacji do błony endosomu wchodzący w skład ich struktury łańcuch niezmienny II. Mimo tych zabezpieczeń znaczna ilość miejsc wiążących antygenów klasy I i II jest połączona z fragmentami antygenów własnych i tak eksportowana na powierzchnię komórki. W zasadzie, ponieważ układ immunologiczny nie rozpoznaje antygenów własnych, nie ma to istotnego znaczenia. Ponadto, stosunkowo niewielka liczba kompleksów antygen MHC – fragment antygeny konwencjonalnego na powierzchni APC jest wystarczająca do rozpoznania przez limfocyty T i wywołania odpowiedzi immunologicznej (poniżej tysiąca). Ze względu na stałą wymianę składników błony komórkowej z wnętrzem komórki, zdeponowane kompleksy MHC – peptyd ulegają po pewnym czasie interioryzacji. Dalszy los kompleksów zależy od klasy MHC. Antygeny klasy I ulegają w większości wewnątrzkomórkowemu metabolizmowi, natomiast antygeny klasy II, po wewnątrzendosomalnym odszczepieniu związanego peptydu, mogą zostać użyte powtórnie. W przypadku makrofagów recyklicacji tej ulega w ciągu godziny 25–30% antygenów MHC klasy II, natomiast tylko 10% w przypadku limfocytów B.

Na krótkie omówienie, z funkcjonalnego punktu widzenia, zasługuje sposób wiązania fragmentu antygeny z antygenem MHC, gdyż warunkuje on sposób rozpoznania kompleksów przez receptor limfocytów T. Wyodrębniono 4 struktury funkcjonalne (rys. 3). Dwie z nich determinują sposób przestrzen-



Rys. 3. Trójcząsteczkowy kompleks antygeny konwencjonalnego, antygeny MHC i receptora limfocytów T

Epitop (determinant antygenowy) jest rozpoznawany przez receptor limfocyta T łącznie (asocjatywnie) z histotopem (MHC). Agretop jest strukturą immunogenego peptydu, odpowiedzialną za wiązanie z częścią MHC (desetop). Mechanizmy tych interakcji nie są w pełni poznane

nego wiązania fragmentu antygeny z drobiną MHC. Obszar MHC wiążący fragment antygeny określaný jest jako DESETOP (Determinant selection, *topos*, gr. = miejsce). Wiążąca się z MHC struktura peptydu stanowi AGRE-TOP (Antigen recognition). Połączenie się desetopu z agretopem ustawia cząsteczkę antygeny w określonej konfiguracji przestrzennej, dzięki czemu jej determinanta antygenowa (EPITOP; Epi (gr.) = ponad) zostanie rozpoznana przez receptor limfocyta T łącznie z częścią antygeny MHC (HISTOTOP, od histocompatibility = zgodność tkankowa). Ponieważ usytuowanie przestrzenne antygeny zależy od interakcji AGRETOP-DESETOP, różne antygeny MHC mogą odmiennie „widzieć” cząsteczkę, a więc też eksponować do rozpoznania przez TCR odmiennie jej epitopy.

ROZPOZNANIE ANTYGENY PRZEZ LIMFOCYTY T

Makrofagi i inne APC internalizują w sposób nieswoisty wiele antygenów równocześnie, stąd mogą jednocześnie eksponować na swojej powierzchni wiele różnych immunogennych fragmentów w połączeniu z MHC. Istnieje pewna minimalna liczba kompleksów peptyd-MHC na powierzchni APC, rzędu kilkuset — konieczna, aby zostały one rozpoznane przez antygenowo-swoisty limfocyta T. Ponieważ na poziomie APC nie zachodzi selekcja peptydów, tzn. prezentowane są zarówno fragmenty antygenów obcych, jak i antygenów własnych, decyzja, na jaki antygen eksponowany na powierzchni APC układ immunologiczny będzie reagować zależy od repertuaru limfocytów T. W trakcie rozwoju ontogenetycznego ulegają eliminacji te limfocyty T, których receptory mają wysokie powinowactwo do antygenów własnych (selekcja negatywna), a zachowane są jedynie te, które rozpoznają antygen obcy w kontekście cząsteczek własnych MHC (selekcja pozytywna). Oba procesy selekcji, nie wchodząc w wyjaśnienie mechanizmu, zachodzą w grasicy i biorą w nich udział co najmniej 3 różne komórki prezentujące antygen, tj. makrofagi, komórki dendrytyczne i komórki nabłonkowe grasicy.

Rozpoznanie antygeny na powierzchni APC przez limfocyty T wymaga bezpośredniego kontaktu obu tych komórek. Receptory antygenowe limfocytów T (TCR) dystrybuowane są w sposób klonalny i — jak wspomniano poprzednio — są jednowartościowe w przeciwieństwie do przeciwciał, które są co najmniej dwuwartościowe (tzn. mogą połączyć mostkiem dwie determinanty antygenowe). Sprawia to, że połączenie TCR — (antygen + MHC) jest relatywnie słabe i mało stabilne i łatwo ulega rozerwaniu. Ponieważ dla dokonania aktu rozpoznania antygeny konieczny czas bezpośredniego kontaktu limfocyta T-APC mierzy się w skali godzin, konieczna jest stabilizacja wzajemnego połączenia obu komórek. Zostało to osiągnięte na dwóch drogach. Po pierwsze antygeny różnicowania CD8 i CD4 służą jako koreceptory rozpoznawcze;

mogą one wiązać się domenami niezmiennymi (nie biorącymi udziału w wiązaniu antygeny) odpowiednio antygenów MHC klasy I ($\alpha 3$) i II ($\alpha 2$ i $\beta 2$). Drugim elementem wzmacniającym połączenie są drobiny adhezyjne — ICAM-1 i 2 oraz LFA-3 na APC oraz LFA-1 i CD2 na limfocytach T. Adhezja zachodzi pomiędzy cząsteczkami ICAM-1 i 2 i LFA-1 oraz CD2 i LFA-3. Połączenie obu komórek i powstały w błonie komórkowej sygnał sprawiają, że APC zaczynają produkować interleukinę 1, cytokinę o szerokim spektrum działania. Ligandy wiążące się z receptorem T, tzn. (antygen + MHC) koreceptory CD4 lub CD8 oraz wytworzona IL-1 uruchamiają dwie drogi aktywacji limfocytów T. Nie wchodząc w szczegóły tych skomplikowanych procesów biochemicznych, jedna z nich, wiodąca m.in. przez fosfolipazę C, dwuacyloglicerol i 1,4,5-trójfosforan, uruchamia kanały wapniowe, a druga uruchamia enzym — kinazę tyrozyny. Obie te drogi prowadzą, w złożony i częściowo jedynie znany sposób, do podjęcia działalności transkrypcyjnej m.in. genu interleukiny 2. Tutaj rozpoczyna się cykl podziałów limfocytów T, otwierający fazę centralną odpowiedzi immunologicznej.

BIOLOGICZNE ZNACZENIE MECHANIZMU PREZENTACJI ANTYGENU

Ewolucyjnie układ immunologiczny u wyższych zwierząt wielokomórkowych powstał jako system obronny przed pasożytnictwem. Podstawowym problemem stojącym przed ewolucją było utworzenie systemu, który byłby przygotowany do rozpoznawania wielkiej obfitości różnych antygenów, a równocześnie wykazywał wysoką zdolność dyskryminacji między odpowiedzią na antygeny własne i obce. Przyczyny te sprawiły, że niezwykle skomplikowane i pośrednie interakcje między komórką APC a limfocytym T, jak również między limfocytami B i T, związane z prezentowaniem i rozpoznawaniem antygeny, mają dwa główne cele — zabezpieczenie ustroju przed reakcjami szkodliwymi skierowanymi na struktury własne, a ponadto ukierunkowanie reakcji na właściwy cel. Dla zwalczenia zakażeń wywołanych przez pasożyty żyjące pozakomórkowo system ten uruchomił produkcję rozpuszczalnych receptorów (przeciwciał) wytwarzanych przez limfocyty B, wiążących się z powierzchnią pasożytów i ułatwiających ich eliminację. Limfocyty B wiążą się z antygenem bezpośrednio, rozpoznają jego trzeciorzędowe, przestrzenne struktury, ale w trakcie ich rozwoju ontogenetycznego brak wystarczających mechanizmów dla całkowitej eliminacji tych spośród nich, które rozpoznają antygeny własne. Stąd też wbudowane zabezpieczenie pod postacią konieczności kooperacji z limfocytami T, które w rozwoju ontogenetycznym podlegają drastycznemu ocenzeniu (eliminacja tych komórek T, które mogłyby rozpoznać antygeny własne). Limfocyty pomocnicze T, rozpoznają zaś nie jakikolwiek antygen, ale antygen zdeponowany w wyspecjalizowanych komórkach mających antygeny MHC klasy II. Tak więc każdy antygen konwen-

cjonalny przechodzi dwa progi selekcji — jego fragmenty muszą wiązać się z antygenami MHC, a kompleks ten musi zostać rozpoznany przez receptor limfocytów T. Dopiero wtedy równoczesne rozpoznanie antygeny natywnego przez limfocyty B i odpowiedni sygnał generowany przez limfocyty T prowadzi do produkcji przeciwciał.

Zwalczanie pasożytów wewnątrzkomórkowych, ze względu na ich trudną dostępność, było znacznie trudniejszym problemem do rozwiązania. Konieczne zatem stało się opracowanie strategii, której celem było rozpoznanie i zniszczenie zakażonej komórki, przy równoczesnym „zakazie” rozpoznawania komórki niezakażonej i samego wolnego pasożyta. Ponieważ zakażeniu może ulec jakakolwiek komórka organizmu, jako jeden z elementów rozpoznawczych użyte zostały antygeny MHC klasy I obecne na wszystkich komórkach. Receptor limfocytów cytotoksycznych CD8 rozpoznaje jedynie kompleks „antygen MHC+antygen pasożyta”, nie zaś poszczególne jego składniki, nie może więc być zablokowany np. przez wolny wirus (stąd „zakaz” rozpoznawania samego wirusa). Mechanizm ten ukierunkowuje aktywność limfocytów cytotoksycznych jedynie na zakażone komórki. Dotyczy to oczywiście i antygenów wszystkich innych pasożytów wewnątrzkomórkowych (bakterie, pierwotniaki).

WŁODZIMIERZ PTAK

THE MECHANISMS OF ANTIGEN PRESENTATION AND RECOGNITION

Summary

The article gives a short overview of multiple mechanisms acting simultaneously and/or sequentially and responsible for generation of immune T lymphocytes. The antigen undergoes a series of intracellular events in macrophages known as antigen processing. Antigens originate in one of the two ways — intracellularly or extracellularly. Short segments (oligopeptides) of processed antigen bind intracellularly to a groove in major histocompatibility complex (MHC) molecules. Intracellular antigens (e.g. intracellular pathogens) bind preferentially to class I MHC molecules, while extracellular antigens (the majority of conventional antigens) bind to class II MHC molecules. Antigen-MHC complexes are transported to, and exposed on, the macrophage surface where they are recognized by different populations of T lymphocytes by their clonally distributed receptors. Cooperation of lymphocytes and macrophages is facilitated by cell-adhesion molecules that help cells to interact, and also by secreted macrophage products (monokines) that trigger T cell proliferation. Distinct T lymphocyte subpopulations that recognize the macrophage-bound antigen in the context of MHC molecules perform such diverse functions as mediation of delayed hypersensitivity reactions, and help B cells to produce antibodies (class II MHC) or cytotoxic damage of infected cells (class I MHC).

LITERATURA*

1. Adorini L. — *The presentation of antigen by MHC class II molecules*. Year in Immunology 6, 1–37, 1990.
2. Albeida S. M., Buck C. A. — *Integrins and other cell adhesion molecules*. FASEB J. 4, 2868–2880, 1990.
3. Brodsky F. M., Guagliardi L. E. — *The cell biology of antigen processing and presentation*. Ann. Rev. Immunol. 9, 707–744, 1991.
4. Edelman G. M. — *Topobiology*. Sci. Amer. 5, 76–88, 1989.
5. Janusz M. — *Immunoregulatorowa funkcja makrofagów*. Post. Hig. Med. Dośw. 45, 1–15, 1991.
6. Levine F. P., Chain B. M. — *The cell biology of antigen processing*. Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 26, 439–474, 1991.
7. Springer T. A. — *Adhesion receptors of the immune system*. Nature 346, 425–434, 1990.
8. von Boehmer H., Kisielow P. — *Jak układ immunologiczny poznaje sam siebie*. Świat Nauki (Sci. Amer.) 1, 48–56, 1991.
9. Walczak M. — *Biologiczne właściwości interleukin*. Immunol. Pol. 16, 169–187, 1991.

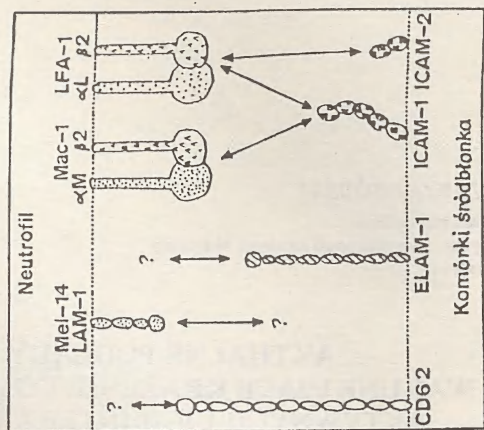
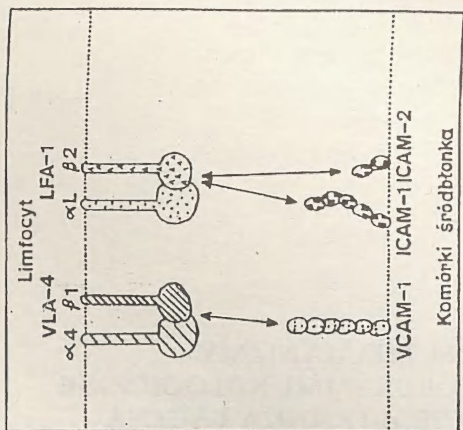
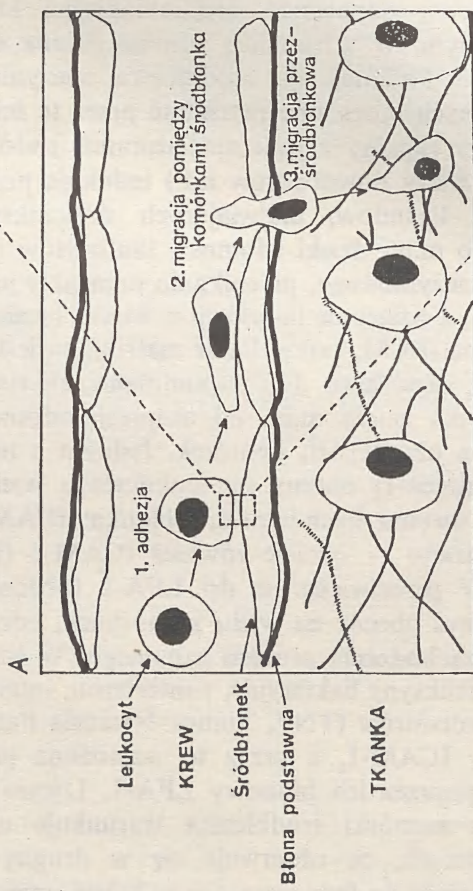
* Sposoby prezentacji i rozpoznania antygeny należą do grupy podstawowych problemów, którymi zajmuje się współczesna immunologia. Znaczna liczba oryginalnych prac poświęconych różnym aspektom tego zagadnienia nie pozwala na zacytowanie nawet niewielkiej ich części. Szersze omówienie tematów poruszanych w artykule znajdzie czytelnik w niektórych pracach przeglądowych.

ANDRZEJ GÓRSKI

Zakład Immunologii
Instytutu Transplantologii Akademii Medycznej
Warszawa

AKTUALNE POGLĄDY NA MECHANIZMY WARUNKUJĄCE KRĄŻENIE KOMÓREK IMMUNOLOGICZNI AKTYWNYCH I ICH INTERAKCJE Z TKANKĄ ŁĄCZNĄ

Komórki zaangażowane w odpowiedź immunologiczną krążą pomiędzy krwią a układem chłonnym. W warunkach zdrowia ściana naczyniowa nie sprzyja przyleganiu tych komórek do śródbłonka naczyniowego, jednak w sytuacjach patologicznych mogą one przenikać przez tę ścianę i naciekać tkanki i narządy. Proces zapalny z jego mediatorami (endotoksyny, interleukina 1, czynnik martwicy nowotworów itd.) indukuje pojawienie się na komórkach śródbłonka ligandów, ułatwiających dotkankową wędrówkę komórek. Odbywa się to m.in. dzięki zdolności limfocytów i fagocytów do adhezji do śródbłonka naczyniowego, przenikania pomiędzy jego komórkami i przez błonę podstawną, a następnie interakcji z tkanką łączną, a ściślej z jej pozakomórkową macierzą (ECM, extracellular matrix), co jest schematycznie przedstawione na rys. 1, część lewa. Jak wspomniano, zjawisko przylegania leukocytów do śródbłonka zależy m.in. od ekspresji odpowiednich receptorów i ich ligandów na obu typach komórek. Jednym z nich jest LFA-1 (Leukocyte-Function-Antigen-1) obecny na leukocytach wielo- i jednojądrzastych, wiążący się z dwoma ligandami śródbłonka: ICAM-1 i ICAM-2, a — jak ostatnio wykazano — istnieje również ICAM-3 (Interstitial Cell Adhesion Molecule). W przeciwieństwie do LFA-1 (obecnego na leukocytach) ICAM-1 może być obecny na wielu komórkach, gdzie jego poziom wzrasta m.in. w czasie zachodzenia procesu zapalnego. W istocie mediatory zapalenia, takie jak endotoksyny bakteryjne, γ -interferon, interleukina-1 (IL-1) i czynnik martwicy nowotworów (TNF, Tumor Necrosis Factor) powodują znaczny wzrost syntezy ICAM-1, a przez to wzmożone przyleganie limfocytów i monocytów poprzez ich błonowy LFA-1. Uważa się, że wzrost syntezy ICAM-1 przez komórki śródbłonka warunkuje nacieki złożone z komórek jednojądrzastych, co obserwuje się w drugiej fazie procesu zapalnego (w przeciwieństwie do fazy wczesnej, w której przeważają granulocyty obojętnochłonne). W przeciwieństwie do ICAM-1, ICAM-2 jest obecny na normalnym śródbłonku i zachowuje się bez zmian w odpowiedzi na bodziec zapalny.



Rys. 1. A — schemat przechodzenia leukocytów z krwi do tkanki łącznej. B — interakcje adhezywne limfocytów z komórkami śródbłonka zależą m.in. od wiązania VLA-4 z VCAM-1 oraz LFA-1 z ICAM-1 i ICAM-2 (a prawdopodobnie i ICAM-3). C — neutrofile przylegają do śródbłonka za pośrednictwem swych receptorów Mac-1 i LFA-1, reagujących z ICAM. LAM (LECAM) wiąże się z nieznanym ligandem śródbłonkowym, z kolei ligandy śródbłonkowe CD62 (PADGEM) i ELAM-1 umożliwiają adhezję neutrofilu za pośrednictwem ich niezbyt dobrze jeszcze sprecyzowanych receptorów

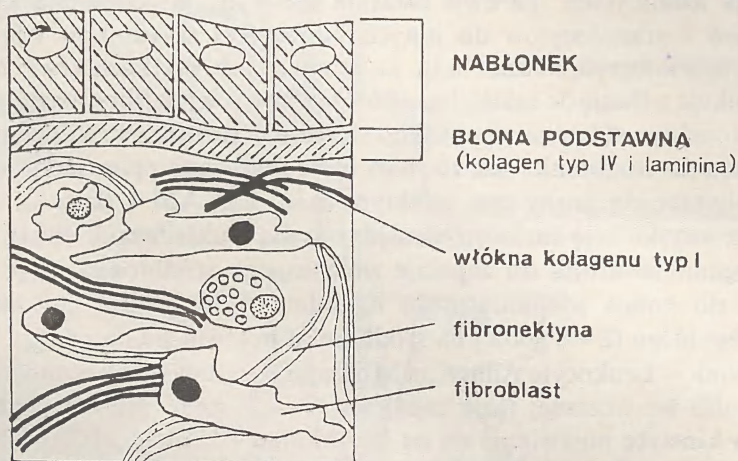
LFA-1 należy do białek określanych nazwą integryn i zbudowanych z łańcuchów α i β . Na podstawie zróżnicowania strukturalnego łańcuchów β wyróżnia się trzy zasadnicze grupy integryn: β_1 , β_2 i β_3 . LFA-1 jest przedstawicielem grupy β_2 , do której należy także Mac-1 i p150,95, które są obecne na leukocytach. Te dwie ostatnie integryny odpowiadają za adhezję monocytów i granulocytów do innych komórek i składników dopełniacza. Z kolei grupa integryn, obecna m.in. na monocytach, płytkach krwi i śródbłonku, warunkuje adhezję do takich ligandów białkowych jak fibrynogen, witronektyna i fibronektyna (obecna w wysokim stężeniu w surowicy krwi i samej ECM).

Adhezja do śródbłonka jest również uwarunkowana przez nie-integrynowe białka zaliczane do grupy tzw. selektyn, m.in. LECAM-1 (Leu-8), odpowiedzialny za recyrkulację limfocytów między krwią a układem chłonnym, a także za przyleganie neutrofilów do zapalnie zmienionego śródbłonka za pośrednictwem nie do końca zdefiniowanego ligandu. Nieco później po zadziałaniu bodźca zapalnego (2–8 godz.) na śródbłonku pojawia się natomiast ELAM-1 (Endothelial – Leukocyte Adhesion Molecule), warunkujący wzmożoną adhezję neutrofilów we wczesnej fazie zapalenia (rys. 1, część prawa). Sądzi się, że różnice w kinetyce pojawiania się na śródbłonku ELAM-1 i ICAM-1, a także niedawno opisanego VCAM-1 (Vascular – Cell Adhesion Molecule) (w pierwszych godzinach po zadziałaniu bodźca zapalnego ELAM, a potem ICAM-1 oraz VCAM-1) warunkują pierwotny napływ do ogniska zapalnego granulocytów obojętnochłonnych (neutrofile), a następnie komórek jednojądrzastych (monocyty i limfocyty).

Kolejną, niedawno opisaną selektyną, jest PADGEM, białko pojawiające się stosunkowo szybko po zadziałaniu bodźca zapalnego i które, według najnowszych badań, ma być współodpowiedzialne za zjawisko tzw. toczenia się (rolling) leukocytów. W myśl tej hipotezy PADGEM przyczynia się do zmiany szybkiego wewnątrznaczyniowego ruchu leukocytów z prądem krwi na ich powolne „toczenie się” przy ścianie naczyniowej, a następnie zależne od interakcji LFA-1: ICAM przyleganie do śródbłonka z następowym przenikaniem pomiędzy jego komórkami, za co odpowiada m.in. ICAM i VCAM. Jak wynika z powyższego, proces adhezji leukocytów do śródbłonka zależy od interakcji co najmniej kilku receptorów z ich odpowiednimi ligandami, które – pojawiając się w różnym czasie od zadziałania inicjującego je bodźca – wpływają w znaczący sposób na skład komórek przechodzących przez śródbłonek do tkanki łącznej podśródbłonkowej.

Po przejściu przez śródbłonek limfocyty i fagocyty napotykać na swej drodze ECM. Stosunkowo najlepiej poznaną i odgrywającą szczególną rolę w interakcjach limfocytów z ECM jest grupa β_1 integryn, określana także terminem VLA (Very Late Antigen, tzn. pojawiająca się późno po pobudzeniu komórki – nawet po tygodniach). Wspólny łańcuch β może się tu łączyć z co najmniej 6 łańcuchami α , tworząc odpowiednie integryny VLA-1 do VLA-6. Ligandy tkanki łącznej dla integryn VLA-1 ($\alpha_1: \beta_1$) i VLA-2 ($\alpha_2: \beta_1$) nie są

dokładnie zdefiniowane, przypuszcza się, że są nimi kolagen i laminina, znajdująca się w błonie podstawnej (rys. 2). Dla VLA-3 ($\alpha_3\beta_1$) ustalono kolagen jako docelowy składnik ECM, lecz nie wyklucza się możliwości wiązania przez ten receptor również fibronektyny i lamininy (rys. 2).



Rys. 2. Po przeniknięciu przez białka błony podstawnej (kolagen typ IV i laminina) limfocyty i fagocyty wnikają w macierz tkanki łącznej, gdzie dochodzi do ich interakcji z kolagenem typ I i fibronektyną, białkami produkowanymi m.in. przez fibroblasty

Najciekawszym receptorem integrynowym dla ECM jest VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), rozpoznająca tzw. fragment CS-1 fibronektyny. Ten sam receptor (aczkolwiek część odmienna od wiążącej FN) łączy się także z VCAM-1 pojawiającym się na zmienionym zapalnie śródbłonku. Jak wynika z powyższego, VLA-4 może potencjalnie odgrywać dużą rolę w patofizjologii krążenia limfocytów, będąc odpowiedzialna za ich przyleganie zarówno do warstwy fibronektyny na śródbłonku, jak i do samych komórek śródbłonka poprzez indukowany na nich VCAM-1. VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) łączy się natomiast z fibronektyną poprzez fragment zawierający trójępeptyd arginina-glicyna-asparagina (RGD). Limfocyty T człowieka, komórki NK (tzw. naturalne killery, odpowiadające m.in. za niszczenie komórek nowotworowych) i limfocyty B wiążą się z fibronektyną. Limfocyty B (w odróżnieniu od pierwszych komórek) łączą się z fibronektyną wyłącznie za pośrednictwem VLA-4, natomiast limfocyty T wykorzystują do tego celu przede wszystkim VLA-5, VLA-6 wiąże się z lamininą.

Zgodnie z powyższymi danymi, limfocyty T wykazują obecność nieznacznych ilości VLA-3 i sporych VLA-4, 5 i 6, zaś po pobudzeniu wzrasta w nich VLA-3, 4 i 5, spada VLA-6 i pojawia się VLA-1 i VLA-2. Limfocyty B są słabo VLA-2 i VLA-3+, mają natomiast duże ilości VLA-4. Monocyty wykorzystują VLA-5 do adhezji do fibronektyny. Neutrofile nie mają powierzchniowych VLA, natomiast eozynofile i bazofile są VLA-4+.

Wymienione wyżej interakcje pomiędzy integrzynami limfocytarnymi a ich odpowiednikami w obrębie ECM wzbudzają ostatnio szczególne zainteresowanie. Jak wynika z dotychczasowych rozważań, limfocyty i monocyty w drodze do miejsca zadziałania antygeny przechodzą przez śródbłonek, a następnie wędrują przez ECM. Jak się wydaje, proces ten nie polega jedynie na biernej wędrówce, ponieważ na drodze swej komórki wchodzi w reakcje ze składnikami ECM, przede wszystkim za pośrednictwem swych receptorów integrzynowych. Wykazano, że np. interakcje limfocytów z fibronektyną i kolagenem mogą sprzyjać procesowi aktywacji limfocytów. Tak więc białka ECM nie są jedynie bierną masą, przez którą muszą się przecisnąć limfocyty i fagocyty na drodze swej wędrówki, lecz stanowią aktywne dla nich ligandy, regulujące nie tylko ich ruchliwość, ale i aktywność immunologiczną. Co więcej, ostatnio stwierdzono, że również molekuly obecne na śródbłonku (ICAM i VCAM, nie zaś ELAM) mogą wywierać działanie aktywujące limfocyty oprócz uprzednio opisanego, znanego działania adhezyjnego w stosunku do tych komórek.

Ostatnio podkreśla się rolę nie-integrzynowych struktur mogących regulować adhezję limfocytów do ECM. Tak więc molekula CD26 może wiązać się z kolagenem. Jest to białko odpowiadające enzymowi błonowemu peptydazie IV, której ekspresja wzrasta po aktywacji komórek. Z kolei CD73 jest identyczny z enzymem 5-nukleotydazą, mogącym wiązać fibronektynę i lamininę.

Dokładniejsze badania wykazują, że sama ekspresja danej integryny nie jest równoznaczna z jej funkcją. Tak więc niepobudzone limfocyty T słabo przylegają do fibronektyny i lamininy pomimo wspomnianej już ekspresji odpowiednich ligandów, natomiast adhezja ta wzrasta gwałtownie już w kilka minut po pobudzeniu komórek. Nie towarzyszy temu wzrost ekspresji odpowiednich integryn, zatem chodzi tu o indukcję zmian jakościowych w cząsteczce integryny, nie zaś ilościowych. To samo zjawisko zostało opisane dla LFA-1: ICAM-1, a także CD44: hialuronian, gdzie nawet wysoka ekspresja CD44 nie oznacza wysokiego powinowactwa do tego ostatniego ligandu, będącego mukopolisacharydem tkanki łącznej. Wykazano również istnienie znaczących różnic w ekspresji integryn przez poszczególne subpopulacje limfocytów, co odnosi się przede wszystkim do limfocytów „naiwnych” (które nie zetknęły się dotychczas z antygenami) i limfocytów „pamięci” (będących po kontakcie z antygenem), odpowiednio posiadających antygeny oznaczane CD45RO i CD45RA. Wykazano m.in., że komórki pamięci wykazują zdolność do lokalizacji w miejscach zadziałania antygeny, stąd ich lokalizacja w narządach objętych procesami autoimmunizacyjnymi, przeszczepach itd. Komórki te wykazują 2–4 razy wyższą ekspresję integryn LFA-1, VLA-4 i VLA-6 oraz ich wspólnego łańcucha β_1 (CD29).

Jak wynika z powyższego, interakcje limfocytów z ECM mogą odgrywać istotną rolę w regulacji ich funkcji. Fakt, że komórki te wykazują obecność integrzynowych i nie-integrzynowych receptorów dla ECM sugeruje, że

interakcje ze składnikami ECM mogą wpływać na migrację tych komórek. Wiadomo, że kolagen i fibronektyna mogą wywierać wpływ na ruchliwość komórek *in vitro*, a zapewne i *in vivo*. Można założyć, że adhezywne reakcje limfocytów z kolagenem IV i lamininą (składniki błony podstawnej) mogą odgrywać zatem rolę w procesie przechodzenia limfocytów i fagocytów przez te błony. Z kolei przyleganie do kolagenu i fibronektyny może warunkować czasowe unieruchomienie komórek immunologicznie kompetentnych w miejscu zachodzenia reakcji immunologicznej. Podobnie, ECM obecna na powierzchni komórek śródbłónka może wpływać na interakcje komórkowe z leukocytami, np. CD44 może ułatwiać przyleganie do śródbłónka przez adhezję do pokrywającego go hialuronianu. Podobnie, fibronektyna związana z błoną komórkową może prawdopodobnie wpływać na adhezję limfocytów do śródbłónka. Istnieją również dane do przypuszczeń, że białka ECM mogą odgrywać rolę w procesie różnicowania limfocytów, np. wspomniana interakcja CD44: hialuronian może mieć znaczenie w procesach krwiotwórczych i w różnicowaniu limfocytów T w grasicy. Kolagen może również nasilać reakcję mieszanej hodowli limfocytów, będącą *in vitro* modelem odporności transplantacyjnej.

Jak zatem już wspomniano, tkanka łączna nie jest jedynie bierną substancją, przez którą limfocyty i fagocyty odbywają wędrówkę pomiędzy krwią, chłonną i tkankami, ale wywiera regulujący wpływ na ich funkcje. Można się spodziewać, że dalsze poznanie charakteru interakcji limfocyty : ECM przyczyni się do opracowania nowych, skuteczniejszych schematów leczenia chorób o podłożu immunologicznym.

ANDRZEJ GÓRSKI

CURRENT VIEWS ON THE MECHANISMS REGULATING THE CIRCULATION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS AND THEIR INTERACTIONS WITH THE CONNECTIVE TISSUE

S u m m a r y

The infiltration of lymphocytes into tissue is an essential component of many immunologic reactions. There has been rapid progress toward our understanding of the initial step in the extravasation and migration of lymphocytes through the extracellular matrix (ECM). Lymphocyte motility in ECM is a property with potentially great impact on the treatment of autoimmune disease and neoplasia. Such lymphocyte: ECM interactions are mediated by integrin and non-integrin receptors on those cells and can be blocked by specific monoclonal antibodies. Likewise, lymphocytes and monocytes possess receptors for molecules present on resting and activated endothelium (ICAM, VCAM, selections) which enable them to roll on, adhere to and transmigrate through the endothelial layer. Again, specific monoclonals are available that interfere with that process. Recent data indicate that those antibodies can provide a novel and efficient means of preventing and treating experimentally induced autoimmune diseases and graft rejection.

LITERATURA

1. Hynes R. O. — *Integrins: versality, modulation, and signalling in cell adhesion*. Cell 69, 11, 1992.
2. Patarroyo M., Prieto J., Rincón J. i wsp. — *Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology*. Immunol. Reviews 114, 67, 1990.
3. Shimizu Y., Shaw S. — *Lymphocyte interactions with extracellular matrix*. FASEB J. 5, 2292, 1991
4. Springer T. A. — *Adhesion receptors of the immune system*. Nature 346, 425, 1990.

PIOTR KUŚNIERCZYK

Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda
WrocławANTYGENY GŁÓWNEGO KOMPLEKSU ZGODNOŚCI TKANKOWEJ.
BUDOWA, GENETYKA I FUNKCJA BIOLOGICZNA

WSTĘP

Wyspecjalizowane komórki układu immunologicznego (odpornościowego), limfocyty T*, rozpoznają na komórkach od różnego genetycznie (allogenicznego) osobnika struktury nazywane antygenami transplantacyjnymi (wywołującymi odrzucanie przeszczepów, czyli transplantatów, przy różnicy genetycznej między dawcą a biorcą) lub antygenami zgodności tkankowej (tzn. przy zgodności, czyli identyczności tych antygenów u dawcy i biorcy, nie następuje odrzucanie przeszczepu). Te antygeny transplantacyjne, które indukują silną i szybką reakcję odrzucania przeszczepu, nazywamy antygenami głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex, stąd powszechnie używany skrót MHC) i te właśnie cząsteczki stwarzają największy problem przy przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów.

Dlaczego jednak ewolucja człowieka (i innych kręgowców) dopuściła do powstania głównego kompleksu zgodności tkankowej? Przecież chyba nie dla utrudnienia pracy chirurgom-transplantologom? Jakie jest biologiczne znaczenie różnic w MHC między osobnikami tego samego gatunku?

Wprawdzie MHC został po raz pierwszy opisany już w roku 1936 (u myszy), ale to odkrycie nie wzbudziło wówczas większego zainteresowania [14]. Dopiero w czasie II wojny światowej, w związku z koniecznością masowego wykonywania przeszczepów skóry po oparzeniach, zajęto się analogicznymi antygenami u człowieka [14], a po wojnie badaniom antygenów zgodności tkankowej człowieka, myszy i innych gatunków poświęciła się rosnąca do dziś grupa uczonych. Mimo to do niedawna nieznana była rola MHC w organizmie i jeszcze w roku 1975 prof. Alena Lengerova z Instytutu Biologii Molekularnej w Pradze mogła bez obaw ogłosić tezę, że antygeny MHC są dlatego tak różne u poszczególnych osobników tego samego gatunku, że ich polimorfizm nie ma żadnego biologicznego znaczenia i zmiany (mutacje) w kodujących je genach

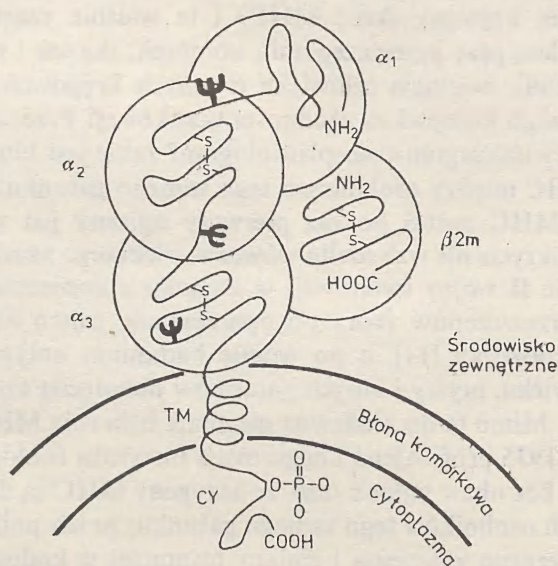
* Limfocyty T — ang. „T lymphocytes”, skrót terminu „limfocyty wywodzące się z grasicy”, ang. „thymus-derived lymphocytes”, dojrzewają w grasicy (ang. „thymus”) w odróżnieniu od wywodzących się ze szpiku kostnego („bone marrow”) limfocytów B.

— jako nieistotne dla przeżycia osobnika — nie są eliminowane w ewolucji gatunku. Jednocześnie jednak ukazywało się coraz więcej prac dowodzących, że tzw. geny odpowiedzi immunologicznej (Ir = immune response), warunkujące zdolność do odpowiedzi na dany obcy antygen, są umiejscowione w obrębie *MHC*. Przez kilka lat toczono spory, czy geny *Ir* są tylko sprzężone z genami *MHC* (tzn. leżą w ich sąsiedztwie), czy też od samych genów *MHC* danego osobnika zależy jego zdolność do odpowiedzi na określone antygeny. Dziś wiemy już, że geny *Ir* i *MHC* to jest to samo, tzn. obcy antygen może być „dostrzeżony” przez limfocyt T tylko wtedy, gdy jest mu „pokazany” przez cząsteczkę *MHC* na powierzchni komórki (zwanej komórką prezentującą antygen). Ta zdolność do „pokazywania” (prezentacji) antygeny zależy od genotypu *MHC* danego osobnika [3].

Celem tego artykułu jest przedstawienie molekularnych podstaw prezentacji antygenów przez cząsteczki *MHC* i roli tej prezentacji w prawidłowej odpowiedzi immunologicznej na obce antygeny. Zaczniemy od krótkiego omówienia budowy cząsteczek *MHC* i genetyki tego układu.

BUDOWA CZĄSTECZEK *MHC*

Cząsteczki *MHC* zostały scharakteryzowane biochemicznie, częściowo poznano sekwencje aminokwasów je tworzących, a wreszcie sklonowanie i zsek-

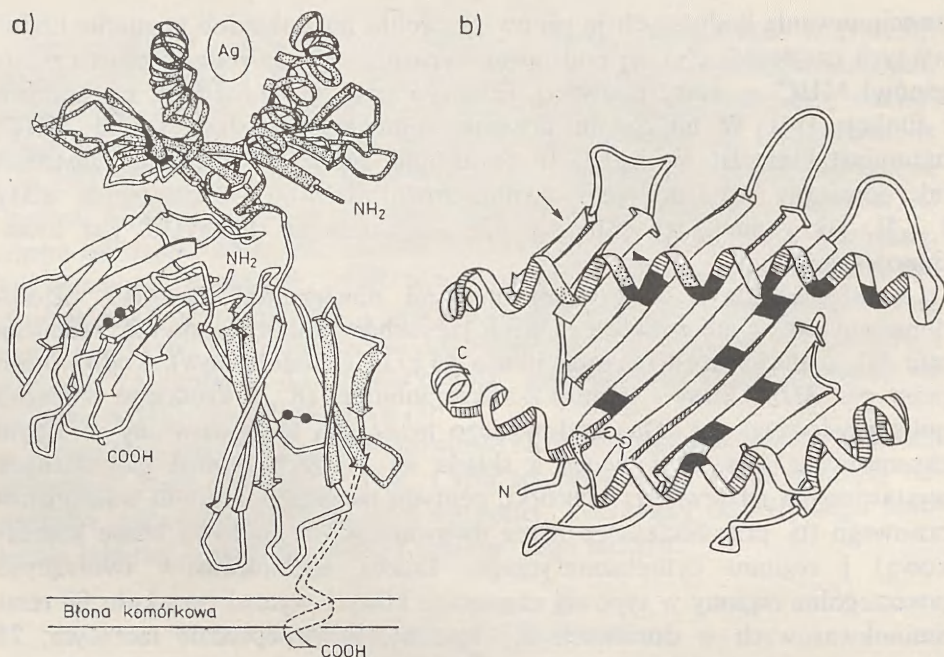


Rys. 1. Schemat budowy cząsteczki *MHC* klasy I. α_1 , α_2 i α_3 — domeny zewnętrzne; TM — region transmembranowy; CY — region cytoplazmatyczny; β_{2m} — β -2-mikroglobulina; ...S...S... — mostek dwusiarczkowy; ψ — łańcuch oligosacharydowy

wencjonowanie kodujących je genów pozwoliło na dokładne poznanie budowy tych cząsteczek. Na tej podstawie wyróżnia się trzy rodzaje cząsteczek (i genów) MHC — klasy pierwszej, drugiej i trzeciej — różniące się budową i funkcją [14]. W niniejszym artykule zajmiemy się klasą I i II MHC, natomiast klasa III nie będzie tu omówiona, ponieważ obejmuje cząsteczki tak odmienne strukturalnie i czynnościowo zarówno od cząsteczek klasy I i II, jak i pomiędzy sobą, że ich przynależność do MHC jest kwestionowana [14].

Cząsteczki klasy I są glikoproteinami powierzchni komórki, heterodimerami złożonymi z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych: łańcucha *alfa* (α), o masie cząsteczkowej około 45 kDa (kilodaltonów), kodowanego przez gen *MHC* klasy I, oraz β -2-mikroglobuliny (β_{2m}), krótkiego łańcucha polipeptydowego (12 kDa) kodowanego przez gen umiejscowiony w innym chromosomie (rys. 1). Łańcuch α składa się z trzech domen globularnych wystawionych na zewnątrz komórki, peptydu łączącego, regionu transmembranowego (tj. przechodzącego przez dwuwarstwową lipidową błonę komórkową) i regionu cytoplazmatycznego. Liczba aminokwasów tworzących poszczególne regiony w typowej cząsteczce klasy I wynosi po około 90 reszt aminokwasowych w domenach α_1 , α_2 i α_3 , 9 w peptydzie łączącym, 25 w regionie transmembranowym i 25–35 w regionie cytoplazmatycznym. Zgodnie ze swym położeniem domeny zewnątrzkomórkowe i region cytoplazmatyczny są hydrofilowe, zaś region transmembranowy jest hydrofobowy. Taki układ regionów hydrofilowych i hydrofobowych zakotwicza cząsteczkę w błonie komórkowej, nie pozwalając jej wysliznąć się przez dwuwarstwową błonę lipidową (rys. 1). Jedna, dwie lub trzy domeny zewnątrzkomórkowe są uglikozylowane, tj. mają przyłączone łańcuchy oligosacharydowe. Dwie reszty cysteiny w domenie α_2 i dwie w domenie α_3 tworzą wewnątrzdomenowe mostki dwusiarczkowe, stabilizując budowę domen. Jednodomenowa, hydrofilna β_{2m} nie jest zakotwiczona w błonie komórkowej, lecz jest niekowalencyjnie połączona z najbliższą w odniesieniu do błony komórkowej domeną łańcucha α (domeną α_3); kontaktuje się również z domenami α_1 i α_2 . β_{2m} oraz domena α_3 mają podobną sekwencję aminokwasów do sekwencji w regionach stałych w cząsteczce immunoglobuliny (przeciwciała). Pozostałe domeny zewnętrzne (α_1 i α_2) nie wykazują takiego podobieństwa i zawierają regiony o dużej zmienności aminokwasów. Głównie w tych regionach stwierdza się różnice przy porównywaniu cząsteczek MHC klasy I kodowanych przez geny alleliczne [3].

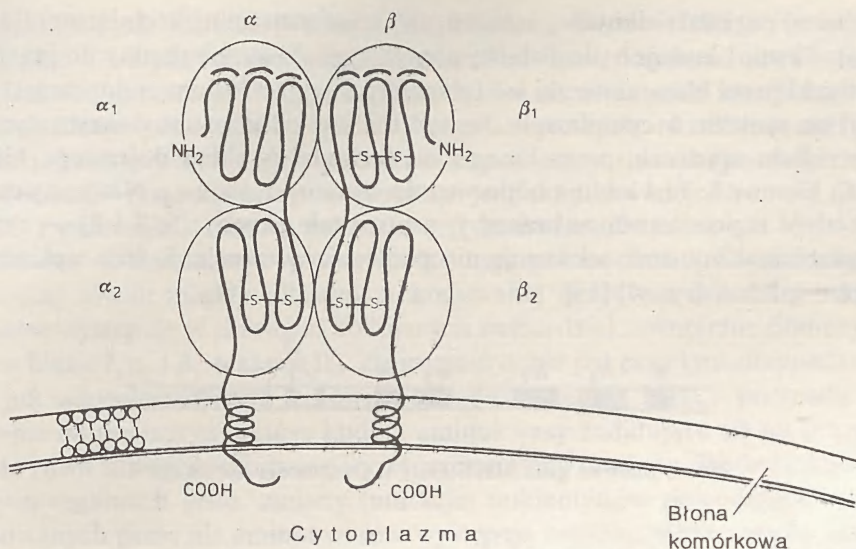
Analiza krystalograficzna wykazała (na przykładzie ludzkich cząsteczek klasy I: HLA-A2 i HLA-A68), że domeny α_1 i α_2 tworzą strukturę podobną do rowu, którego brzegi są utworzone przez dwie spirale α (pochodzące z domen α_1 i α_2), a dno przez arkusze β (tworzone również przez domeny α_1 i α_2). Pozycje zmiennych aminokwasów występują najczęściej na dnie i brzegach rowu (rys. 2) [3].



Rys. 2. Budowa cząsteczki MHC klasy I [3]. a — widok cząsteczki z boku; zaciemniono łańcuch α , β -2-mikroglobulinę pozostawiono białą; b — widok z góry na rów utworzony przez domeny α_1 i α_2 , czarnym kolorem oznaczono pozycje aminokwasów o wysokiej zmienności

Cząsteczki klasy I występują na niemal wszystkich komórkach ciała, z wyjątkiem komórek nerwowych i — u niektórych gatunków — krwinek czerwonych; ich obecność na plemnikach jest kontrowersyjna [14].

Cząsteczki klasy II są również heterodimerami złożonymi z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych, α (34 kDa) i β (29 kDa), połączonych niekowalencyjnie ze sobą. Odmienne niż w przypadku klasy I, oba łańcuchy są kodowane w obrębie *MHC* (przez geny klasy II) i oba mają region transmembranowy, przebijający błonę komórkową i zakończony regionem cytoplazmatycznym. Wystająca na zewnątrz komórki część każdego z obu łańcuchów składa się z dwu globularnych domen, z których każda jest zbudowana z około 90 reszt aminokwasowych. Tak zwany peptyd łączący (9–13 reszt) łączy drugą domenę (α_2 lub β_2) z hydrofobowym regionem transmembranowym (23 reszty aminokwasowe). Region cytoplazmatyczny o zmiennej długości (3–20 reszt) jest hydrofilny, podobnie jak domeny zewnątrzkomórkowe i peptyd łączący (rys. 3). Łańcuch α ma przyłączone dwa łańcuchy oligosacharydowe, po jednym w każdej domenie zewnętrznej. Łańcuch β ma jeden łańcuch oligosacharydowy w domenie β_1 . Łańcuchy cukrowe w cząsteczkach klasy I i II są przypuszczalnie takie same w różnych allelach *MHC*, a różnice antygenowe między allelami wynikają ze zmienności części białkowej cząsteczki (tzn. różnic w sekwencji aminokwasów) [18].



Rys. 3. Schemat budowy cząsteczki MHC klasy II [18]. Oznaczenia jak na rys. 1

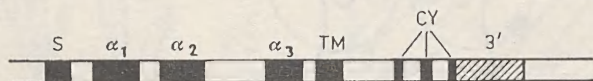
Budowa cząsteczek klasy II nie została dotychczas zanalizowana krystalograficznie. Jednakże znajomość sekwencji aminokwasów oraz właściwości biochemicznych pozwoliła na komputerowe opracowanie modelu cząsteczki klasy II o cechach podobnych do cząsteczki klasy I. Według tego modelu domeny α_1 i β_1 tworzą platformę z arkuszy β podtrzymującą dwie spirale α , analogicznie do rowu utworzonego przez domeny α_1 i α_2 cząsteczki klasy I. Także w cząsteczkach klasy II pozycje zmiennych aminokwasów przypadają głównie na dno i brzegi rowu. Sekwencja aminokwasów w domenach α_2 i β_2 jest podobna do sekwencji w regionach stałych immunoglobulin [20].

Tak więc, mimo różnicy w liczbie domen zewnątrzkomórkowych w białkach klasy I i II, ogólny plan cząsteczki klasy I i II jest podobny: dwie domeny przybłonowe (α_3 i β_{2m} w klasie I, a α_2 i β_2 w klasie II) podpierają dwie domeny zewnętrzne (α_1 i α_2 w klasie I, α_1 i β_1 w klasie II), tworzące rów otwarty u góry cząsteczki.

GENETYKA

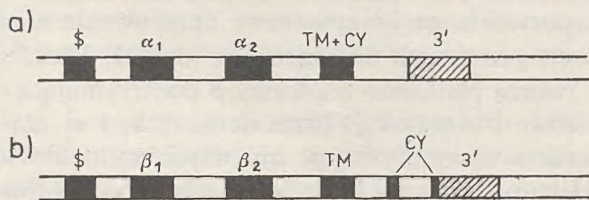
Cząsteczki MHC są kodowane przez geny zgrupowane na jednym chromosomie (poza β_{2m} , kodowaną gdzie indziej i nie zaliczaną do MHC mimo tworzenia kompleksu z łańcuchem α klasy I). Najlepiej poznano geny MHC u myszy (kompleks *H-2*) i u człowieka (kompleks *HLA*), lecz w ostatnich latach dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej dokonał się szybki postęp w identyfikacji, klonowaniu i sekwencjonowaniu genów MHC u innych kręgowców, od naszych najbliższych krewnych, szympansa i goryla, aż po wigilijnego karpia [9]. Gen klasy I składa się z 7 lub 8 sekwencji kodujących

(eksonów) poprzedzielanych „wtrąconymi” sekwencjami niekodującymi (intronami). Ekson 1 koduje hydrofobowy peptyd sygnałowy, niezbędny do przejścia cząsteczki przez błonę siateczki śródplazmatycznej (retikulum endoplazmatycznego) po syntezie w cytoplazmie. Peptyd ten jest odszczepiany enzymatycznie po przejściu cząsteczki przez błonę i nie wchodzi w skład dojrzałego białka MHC. Eksony 2, 3 i 4 kodują odpowiednio domeny α_1 , α_2 i α_3 . Następny ekson (5) koduje region transmembranowy, a pozostałe eksony (6, 7 i 8) — region cytoplazmatyczny oraz sekwencję nie podlegającą translacji, lecz wchodzącą w skład mRNA (rys. 4) [15].



Rys. 4. Budowa genu MHC klasy I. Oznaczenia jak na rys. 1

Geny klasy II składają się z 5 (geny dla łańcuchów α) lub 6 (geny β) eksonów, kodujących odpowiednio peptyd sygnałowy, dwie domeny zewnętrzne oraz regiony transmembranowy i cytoplazmatyczny, a w końcu sekwencję nie podlegającą translacji (rys. 5) [20].



Rys. 5. Budowa genu MHC klasy II. Oznaczenia jak na rys. 1

Geny poszczególnych klas (I, II i III) tworzą osobne regiony w chromosomie, grupujące szereg genów danej klasy. Rysunek 6 pokazuje regiony klasy I, II i III w kompleksie *HLA*, położonym na krótszym ramieniu chromosomu nr 6 u człowieka. Region klasy I zawiera geny dla łańcuchów α , zaś gen dla β_{2m} , jak wspomniano wcześniej, znajduje się na innym chromosomie. Region klasy II zawiera geny dla łańcuchów α i β , zgrupowane w trzech podregionach: *DR*, *DP* i *DQ*. Każdy z tych podregionów zawiera „swoje” geny α i β . Region klasy III zawiera wiele bardzo różnych genów: obok genów kodujących białka odgrywające rolę w funkcjonowaniu układu immunologicznego (geny układu dopełniacza: *C4*, *C2* i *BF*; geny czynnika martwicy nowotworów: *TNF-A* i *TNF-B*; geny białka szoku cieplnego: *HSP70*) również geny dla białek o funkcji nie związanej z układem immunologicznym (geny enzymów: syntetazy walilo-tRNA i 21-hydroksylazy steroidowej) lub w ogóle nieznanej [22].

Cechą szczególną genów klasy I i II jest ich niezwykle wielki polimorfizm* [3, 14, 15, 17]. Fakt ten znany był już od dość dawna, ponieważ obserwowano odrzucanie przeszczepów tkanek i narządów w większości kombinacji nie spokrewnionych dawców i biorców przeszczepu oraz określono antygeny *MHC* u ludzi, myszy i innych gatunków za pomocą surowic odpornościowych i przeciwciał monoklonalnych. Dopiero jednak zsekwencjonowanie genów *MHC* i poznanie struktury przestrzennej kodowanych przez nie białek pozwoliło na dokładniejszy wgląd w istotę tego polimorfizmu. Okazało się, że najwięcej różnic między allelami w kodowanej przez nie sekwencji aminokwasów występuje w eksonach kodujących najbardziej zewnętrzne domeny (α_1 i α_2 w klasie I, α_1 i β_1 w klasie II). Zmienność ta nie jest przy tym przypadkowa, jak już wspomniano przy omówieniu budowy białek *MHC*: przypada ona głównie na nukleotydy, które kodują aminokwasy znajdujące się na brzegach i dnie rowu utworzonego przez wyżej wspomniane domeny. W dodatku tylko w tych regionach genu, zmiany (mutacje) nukleotydów powodujące zmiany kodowanych przez nie aminokwasów występują częściej, niż można by oczekiwać przy czysto przypadkowym ich powstawaniu i nagromadzeniu się w ciągu ewolucji gatunku. Świadczyć to może o pozytywnej selekcji zmienności w tych miejscach cząsteczki [3, 15].

W innych układach genetycznych (np. allele β_{2m} u myszy; u człowieka nie wykryto różnic osobniczych w β_{2m}) różnice między allelami dotyczą na ogół pojedynczych aminokwasów; w *MHC* klasy I i II allele różnią się często wieloma aminokwasami. Przy tym w przypadku innych białek gen ma zwykle niewiele alleli i jeden z nich, tzw. allel „dziki” (tj. niezmutowany) występuje u znacznej większości osobników gatunku. W *MHC* wiele spośród genów klasy I i II ma bardzo wiele alleli (do około 50 u człowieka i być może ponad 100 u myszy), z których żaden nie przeważa w populacji (nie można wskazać allelu „dzikiego”), lecz większość z nich występuje ze stosunkowo niemałą częstością [14, 17]. Biologiczne znaczenie tej różnorodności staje się zrozumiałe w miarę poznawania funkcji cząsteczek *MHC* klasy I i II.

FUNKCJA CZĄSTECZEK *MHC* KLASY I I II

Cząsteczki klasy I i II pełnią bardzo ważną rolę w s w o i s t y c h fazach odpowiedzi immunologicznej, tj. w tych jej etapach, w których antygen jest swoiście rozpoznawany przez limfocyty T: w zapoczątkowaniu reakcji immunologicznej przez pobudzenie tych limfocytów T, których receptory są w stanie związać ten właśnie antygen na makrofagu lub innej komórce prezentującej; we „współpracy” limfocytów T (nazywanych „helper”, czyli wspomagającymi) z limfocytami B potencjalnie zdolnymi do wytworzenia

* Polimorfizm (wielopostaciowość) genetyczny: występowanie dwóch lub więcej alleli w danej populacji, przy czym każdy u co najmniej 1% osobników.

przeciwiiał przeciw temu antygenowi, lecz nie mogącymi tego uczynić bez pomocy limfocytów T; w zabijaniu komórek, mających ten antygen na powierzchni, przez wyspecjalizowane limfocyty T, zwane cytotoksycznymi (tzn. zabójczymi dla komórek) [4].

Już w roku 1974 Zinkernagel i Doherty odkryli, że od myszy zakażonych wirusami można uzyskiwać cytotoksyczne limfocyty T zdolne do zabicia komórek zakażonych wirusem, ale tylko wówczas, jeśli mają taki sam MHC i są zakażone tym samym wirusem co myszy, od których limfocyty T pobrano. Dokładniejsze badania genetyczne wykazały, że elementem MHC rozpoznawanym przez te limfocyty są cząsteczki klasy I. Zjawisko rozpoznawania obcych antygenów przez limfocyty T tylko w kontekście własnych cząsteczek MHC ustroju nazwano „restrykcją MHC”. Wkrótce restrykcję opisano również dla cząsteczek klasy II. Limfocyty T różnią się pod tym względem od limfocytów B, wytwarzających przeciwciała (immunoglobuliny) w odpowiedzi na antygeny rozpoznawane w postaci wolnej, bez połączenia z MHC. Ponieważ jednak limfocyty B na ogół nie są zdolne do samodzielnego pobudzenia przez kontakt z antygenem bez pomocy limfocytów T, więc w efekcie cała odpowiedź immunologiczna zarówno komórkowa, wykonywana przez limfocyty T (np. zabijanie komórek), jak i humoralna, czyli związana z działaniem przeciwciał wytwarzanych i wydzielanych przez limfocyty B, jest kontrolowana przez MHC.

W jaki sposób cząsteczki MHC prezentują obce antygeny limfocytom T i jaka jest w tym rola polimorfizmu MHC?

Krystalograficzna analiza budowy cząsteczki klasy I ujawniła nieznana cząsteczkę (lub mieszaninę cząsteczek) leżącą w rowie utworzonym przez domeny α_1 i α_2 — przypuszczalnie peptyd pochodzący z proteolitycznej degradacji jakiegoś białka [3]. Za tym, że cząsteczki MHC wiążą i prezentują limfocytom T peptydy pochodzące z degradacji antygenów białkowych, przemawiają następujące fakty:

(1) Położenie rowu na wierzchu cząsteczki czyni go łatwo dostępnym dla receptora limfocytu T, mogącego rozpoznać peptyd leżący w rowie [3].

(2) Doświadczalnie wykazano, że cząsteczka MHC, o której wiadomo, że może prezentować dany antygen białkowy limfocytom T, może wiązać peptyd pochodzący z tego białka. Każda cząsteczka MHC może wiązać dość szeroki zakres peptydów pochodzących z różnych białek, ale różne cząsteczki MHC różnią się między sobą zakresem wiązanych peptydów [3].

(3) Jeżeli komórki prezentujące, mające odpowiedni MHC, inkubować z takim peptydem, który ta cząsteczka MHC wiąże, to po inkubacji komórki są zdolne do prezentowania peptydu limfocytom T o odpowiedniej swoistości [3].

(4) Peptydy otrzymane przez oddysocjowanie i izolację z oczyszczonych cząsteczek MHC klasy I wykazują cechy sekwencji aminokwasów wspólne dla peptydów wiązanych przez daną cząsteczkę MHC [8]. Wykazano, że taki

peptyd, jeśli go podać komórkom mającym odpowiednie MHC, rzeczywiście może być przez nie prezentowany limfocytom T o odpowiedniej swoistości.

(5) Z cytozolu komórek można wyizolować peptydy; skład mieszaniny peptydów różni się w komórkach o różnym MHC, tzn. peptyd wiązany przez daną cząsteczkę MHC można wyizolować tylko z komórek mających tę cząsteczkę MHC. Świadczyć to może o ochronie peptydów związanych przez MHC przed całkowitą degradacją enzymatyczną [7].

(6) Większość pozycji zmiennych aminokwasów w cząsteczce MHC przypada na przypuszczalne miejsce wiązania peptydu (dno i brzegi rowu, patrz tab. 1), i w tych właśnie pozycjach częstość podstawień aminokwasów świadczy o pozytywnej selekcji zmienności. Warianty lub mutanty MHC różniące się aminokwasami w tych pozycjach różnią się też zakresem wiązanych peptydów [3].

Tabela 1

Pozycje aminokwasów o wysokiej zmienności
w cząsteczkach MHC klasy I (HLA-A, -B i -C) u człowieka*

Domena	Pozycja aminokw.	Zmienność			Potencjalny kontakt
		HLA-A	HLA-B	HLA-C	
α_1	9	+	+	+	Peptyd
	24		+		Peptyd
	45		+		Peptyd
	62	+			TCR + peptyd
	63	+			Peptyd
	67		+		Peptyd
	69		+		TCR
	70		+		Peptyd
	77		+		Peptyd
	80		+		Peptyd
	81		+		Peptyd
	82		+		TCR
α_2	95	+	+		Peptyd
	97	+	+		Peptyd
	99			+	Peptyd
	114	+	+		Peptyd
	116	+	+	+	Peptyd
	152	+		+	Peptyd
	156	+	+	+	Peptyd
	163		+		TCR + peptyd

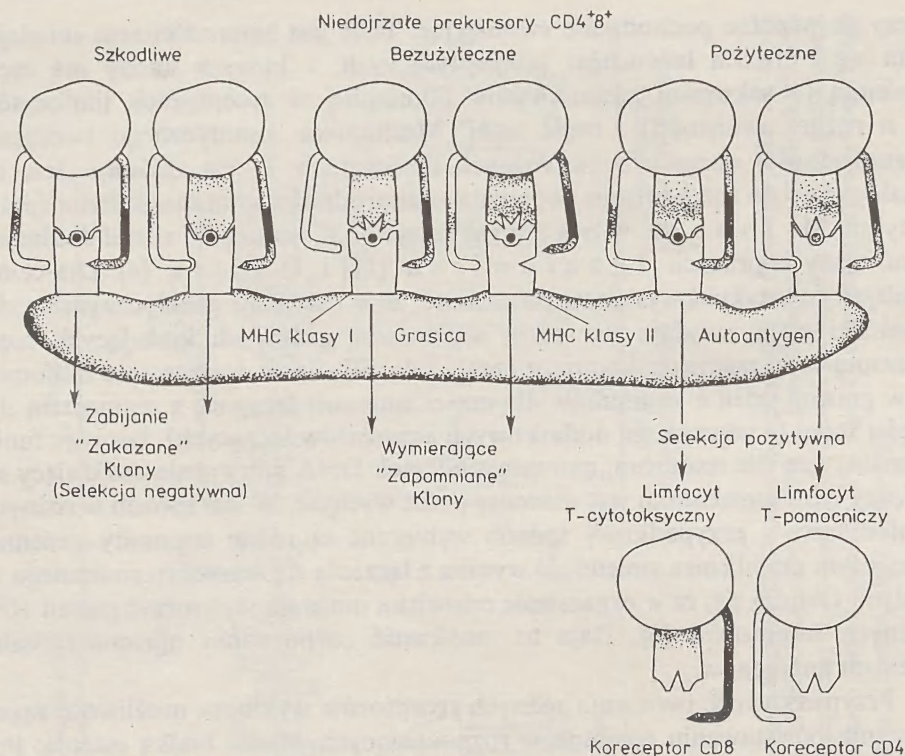
* Wg Bjorkman i Parham [3], zmodyfikowane.

Kompleks peptydu z MHC jest rozpoznawany przez limfocyty T za pośrednictwem swojego receptora (TCR = „T cell receptor”, receptor komórki T) o genetyce i budowie podobnej do immunoglobulin, z którymi zresztą

łączy go wspólne pochodzenie ewolucyjne. TCR jest heterodimerem składającym się z dwóch łańcuchów polipeptydowych, z których każdy ma część zmienną (o sekwencji aminokwasów odmiennej w receptorach limfocytów T o różnej swoistości) i część stałą. Mechanizm somatycznego tworzenia różnorodności receptorów w różnych limfocytach T jest złożony. Jest on analogiczny do mechanizmu tworzenia różnorodności immunoglobulin (patrz artykuł M. J a n u s z w tym samym zeszycie „Kosmosu”) i został dokładnie omówiony w pracach I g n a t o w i c z a [11] i D a v i s a [6]. Dla celów niniejszego artykułu wystarczy powiedzieć, że w materiale genetycznym każdej komórki ciała znajduje się szereg segmentów genowych kodujących część zmienną oraz segmenty kodujące część stałą. W czasie dojrzewania limfocyty T w grasicy jeden z segmentów dla części zmiennej łączy się z segmentem dla części stałej (z włączeniem dodatkowych segmentów łączących), tworząc funkcjonalny gen dla receptora, natomiast odcinek DNA pierwotnie znajdujący się między tymi segmentami jest usuwany przez wycięcie. W ten sposób w różnych limfocytach w przypadkowy sposób wybierane są różne segmenty zmienne, przy czym dodatkowa zmienność wynika z łączenia się segmentu zmiennego ze stałym. Oblicza się, że w organizmie człowieka może się wytworzyć ponad 10^{15} różnych receptorów [6]. Daje to możliwość rozpoznania ogromnej liczby różnych antygenów.

Przypadkowość tworzenia różnych receptorów wyklucza możliwość zapobiegania powstawaniu receptorów rozpoznających własne białka ustroju. Podobnie cząsteczki MHC, wiążące peptydy pochodzące z enzymatycznej degradacji białek, mogą wiązać zarówno peptydy „obce” (wirusowe, bakteryjne itp.), jak i peptydy wywodzące się z własnych białek organizmu, stanowiące ogromną większość dostępnych peptydów. Organizm musi więc zapobiegać powstawaniu reakcji autoimmunologicznych, tj. pobudzaniu limfocytów T o receptorach rozpoznających kompleksy własnych peptydów ustrojowych z własnymi cząsteczkami MHC, a jednocześnie zapewnić sobie zdolność do odpowiedzi na obce antygeny. W grasicy dojrzewają i wychodzą z niej do innych narządów limfatycznych tylko te klony* limfocytów T, których receptory oddziałują z własnymi cząsteczkami MHC ustroju (selekcja pozytywna). Jednakże limfocyty T mające receptory o wysokim powinowactwie do własnej cząsteczki MHC lub do kompleksu tej cząsteczki z peptydem pochodzącym z własnego białka, a więc komórki potencjalnie zagrażające organizmowi reakcją autoagresywną (tzw. „zakazane klony”), nie opuszczają grasicy, lecz są eliminowane na miejscu (selekcja negatywna). Te niedojrzałe limfocyty w grasicy, które nie wytworzyły funkcjonalnego receptora lub których receptory nie

* Klon (ang. „clone”) komórkowy: komórki powstałe przez podziały z jednej komórki wyjściowej i realizujące ten sam, co ona, program genetyczny (markery powierzchniowe, produkowane i wydzielane białka itd.). Tu chodzi o komórki wywodzące się z limfocyty, w którym zaszła rearanżacja genu dla TCR i mające ten właśnie TCR na powierzchni.

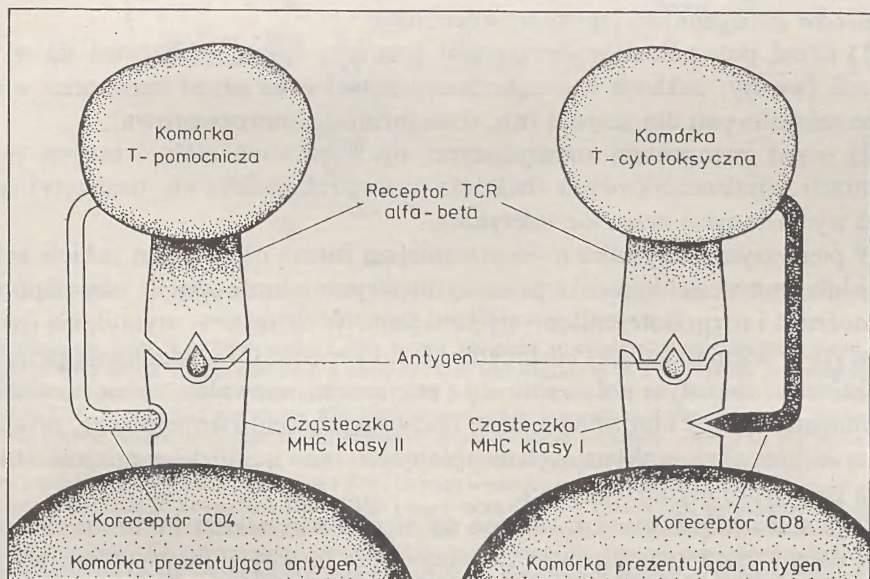


Rys. 7. Dojrzewanie limfocytów T w grasicy [4]. Szczegóły w tekście, s. 359 i 360.

reagują w ogóle z żadną spośród cząsteczek MHC ustroju, nie otrzymują bodźca do dalszego rozwoju („zapomniane klony”) i również giną w grasicy (rys. 7). Dojrzałe limfocyty T, o receptorach słabo oddziałujących z własnym MHC, mogą później, przypadkowo, silnie wiązać jakiś obcy peptyd prezentowany przez MHC. Wciąż wielka – mimo selekcji negatywnej, eliminującej znaczną część klonów – liczba różnych receptorów powoduje, że wśród limfocytów T znajdzie się najczęściej komórka zdolna do odpowiedzi na dany antygen. Tak więc zestaw cząsteczek MHC danego osobnika wpływa na jego repertuar receptorów limfocytów T [4]. Dojrzałe limfocyty T „ignorują” większość cząsteczek MHC na powierzchni komórek ciała, ponieważ zawierają one peptydy pochodzące z własnych białek ustroju. Ulegają natomiast pobudzeniu, gdy napotkają komórkę mającą na swej powierzchni kompleksy MHC z obcym peptydem przypadkowo silnie wiążące się z receptorem danego limfocyta T. Obecność obcego peptydu w zaledwie 0,3–1% cząsteczek MHC na powierzchni komórki już wystarcza, aby mogła pobudzić swoiste limfocyty T (10). Wówczas klon limfocytów ulega namnożeniu, zapoczątkowując reakcję immunologiczną.

*

Dwu klasom cząsteczek MHC, prezentującym peptydy antygenowe, odpowiadają dwie subpopulacje limfocytów T: wspomniane już limfocyty T wspomagające („helper”) i cytotoksyczne. O tym, że są to dwie odrębne subpopulacje komórek, wiadomo już od ponad 15 lat, dzięki odkryciu najpierw u myszy, a później u człowieka, że można je odróżnić od siebie na podstawie występowania na ich powierzchni cząsteczek CD4 i CD8 identyfikowanych przez odpowiednie przeciwciała [13]. Tak więc komórki wspomagające nie mają CD8, lecz mają CD4 (są określane jako $CD4^+$), a komórki cytotoksyczne są $CD8^+$. W ostatnich latach okazało się, że związek funkcji (wspomagająca czy cytotoksyczna) z markerem powierzchniowym (CD4 czy CD8) nie jest absolutny, tzn. można wykazać istnienie komórek wspomagających $CD8^+$ i komórek cytotoksycznych $CD4^+$. Znacznie ściślejszy natomiast jest związek między obecnością CD4 lub CD8 a rozpoznawaną klasą MHC: limfocyty $CD4^+$ mogą rozpoznawać zarówno obce antygeny w połączeniu z własnym MHC klasy II danego osobnika, jak i obce antygeny MHC klasy II; limfocyty $CD8^+$ mogą rozpoznawać antygeny w połączeniu z własnym MHC klasy I, jak również obce MHC klasy I. Cząsteczki CD4 i CD8 są nie tylko markerami czynnościowo odrębnych subpopulacji limfocytów T, ale i strukturami bezpośrednio zaangażowanymi w funkcję tych komórek: wykazano, że cząsteczki CD4 i CD8 wzmacniają wiązanie kompleksu obcy antygen/MHC przez swoisty receptor limfocyty T (TCR), oddziałując z niezmiennymi regionami cząsteczki MHC.



Rys. 8. Cząsteczki odgrywające rolę w rozpoznawaniu kompleksu MHC-peptyd antygenowy przez limfocyt T [4]. Szczegóły w tekście, s. 361 i 362.

Cząsteczka CD8 oddziałuje z domeną α_3 cząsteczki klasy I, a cząsteczka CD4 z domeną β_2 cząsteczki klasy II. Stąd bierze się korelacja subpopulacji limfocytów T ($CD4^+$ i $CD8^+$) z rozpoznawaną klasą MHC (rys. 8).

To, czy TCR będzie reagował z cząsteczką MHC klasy I, czy z cząsteczką klasy II, nie jest z góry zdeterminowane przez jego strukturę. Niedojrzałe limfocyty T w grasicy mają na powierzchni zarówno CD4, jak CD8. Dopiero kontakt limfocyty o danym receptorze (TCR) z „pasującą” do niego cząsteczką MHC klasy I albo II wyznacza jego dalszy rozwój odpowiednio w kierunku komórki $CD8^+$ albo $CD4^+$ (ryc. 7). Zatem MHC danego osobnika wyznacza drogę rozwoju poszczególnych klonów limfocytów T. Brak miejsca nie pozwala na szersze omówienie tego interesującego i ważnego problemu; zainteresowanych odsyłamy do artykułu von Boehmera i Kisielowa w polskim wydaniu „Scientific American” [4]. Na tym wszakże nie kończy się rola cząsteczek CD4 i CD8: po rozpoznaniu antygeny przez TCR, biorą one udział w przewodzeniu bodźca pobudzającego do wnętrza komórki [1]. Ale to już „całkiem inna historia”, jako że mechanizmy aktywacji komórki wykraczają poza ramy tego artykułu.

*

Jaki jest biologiczny sens istnienia dwu klas cząsteczek MHC, prezentujących peptydy antygenowe dwu odrębnym subpopulacjom limfocytów T?

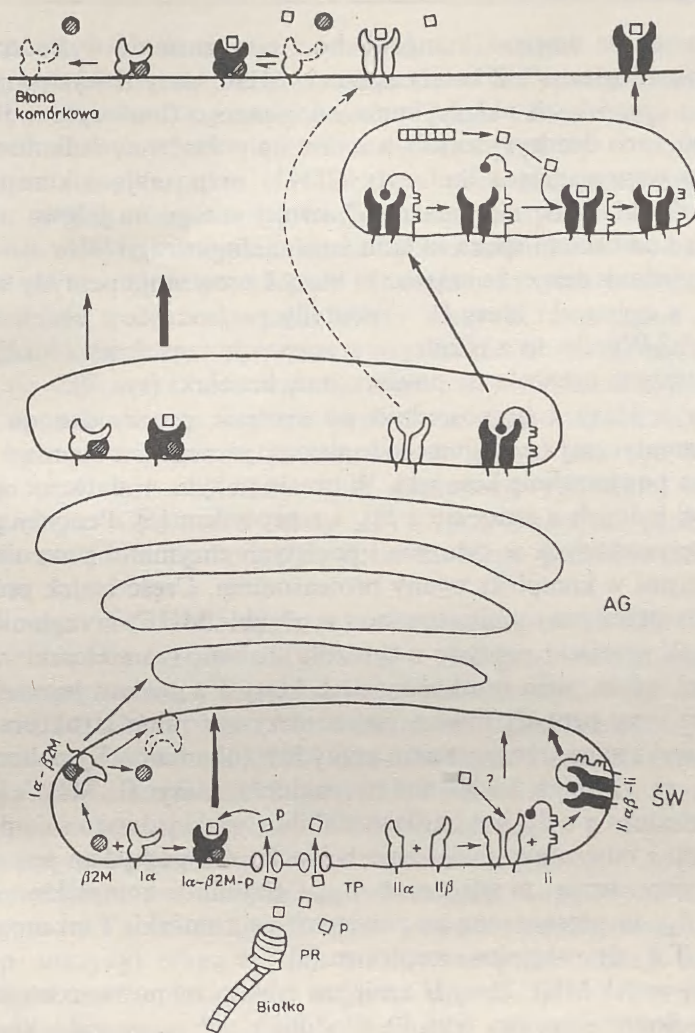
Układ immunologiczny musi bronić organizm przed dwoma rodzajami czynników patogennych (chorobotwórczych):

(1) przed patogenami zakażającymi komórki i namnażającymi się w ich wnętrzu (wirusy, bakterie wewnątrzkomórkowe) oraz przed zmianami w komórce szkodliwymi dla ustroju (np. transformacja nowotworowa);

(2) przed patogenami rozwijającymi się w płynach ciała i innych przestrzeniach pozakomórkowych (bakterie zewnątrzkomórkowe, pasożyty) oraz przed wydzielanymi przez nie toksynami.

W pierwszym przypadku najskuteczniejszą formą obrony jest zabicie zakażonej lub zmienionej komórki przez cytotoksyczne limfocyty T, aby zapobiec namnożeniu i rozprzestrzenianiu się patogenu. W drugim — stymulacja (przez limfocyty T wspomagające) limfocytów B do produkcji i wydzielania przeciwciał, które po swoistym połączeniu się z antygenem wyzwalają różne nieswoiste mechanizmy reakcji immunologicznej (aktywacja układu dopełniacza, produkcja czynników chemotaktycznych zwabiających inne komórki w miejsce wtargnięcia patogenu, fagocytoza itp.).

Cząsteczki MHC klasy I, obecne na niemal wszystkich komórkach ciała, mogą dzięki temu sygnalizować zakażenie lub zmiany nowotworowe w tych komórkach, prezentując peptydy pochodzące z produkowanych wewnątrz komórki białek obcych lub patologicznie zmienionych. Mogą one być rozpoznawane przez cytotoksyczne limfocyty $CD8^+$. W ten sposób patogen nie może



Rys. 9. Schemat łączenia się cząstek MHC klasy I i II z peptydami i ich transportu na powierzchnię komórki (wg [5], zmodyfikowany)

Szlak cząstek klasy I: Łańcuch α ($I\alpha$) i β 2m tworzą kompleks w siateczce wewnątrzplazmatycznej (ŚW). Kompleks bez peptydu (p) jest nietrwały, a pusty $I\alpha$ może ulec degradacji w ŚW. Peptydy powstają wskutek degradacji cytozolowych białek przez proteasom (PR) i przechodzą do ŚW za pośrednictwem transportera peptydów (TP). W obecności peptydu $I\alpha$, β 2m i peptyd tworzą trwałe kompleksy, który wędruje na powierzchnię komórki i może prezentować peptyd limfocytowi T o odpowiednim swoistym receptorze. Na powierzchni komórki część kompleksów $I\alpha$ - β 2m-p, o słabo związanym peptydzie, może dysocjować. Puste łańcuchy $I\alpha$ mogą wiązać peptydy pochodzenia zewnętrznego i β 2m, tworząc trwałe kompleksy, lub mogą ulec degradacji.

Szlak cząstek klasy II: Łańcuchy α ($II\alpha$) i β ($II\beta$) klasy II łączą się w ŚW z łańcuchem niezmiennym (Ii) tworząc stabilny kompleks trzech podjednostek ($II\alpha$ - $II\beta$ -Ii), mający zasłonięte miejsce wiązania peptydów. Kompleks ten jest transportowany z ŚW poprzez aparat Golgiego (AG) do endosomu. Tu Ii zostaje proteolitycznie przecięty, co pozwala cząsteczce $II\alpha$ - $II\beta$ wiązać peptyd. Peptydy pochodzą z degradacji w endosomie białek pobranych spoza komórki. Związanie peptydu być może stanowi sygnał do dalszej degradacji Ii i transportu kompleksu $II\alpha$ - $II\beta$ -p na powierzchnię komórki, gdzie może on mieć kontakt z limfocytami T o odpowiednim receptorze. Niewielka część kompleksów $II\alpha$ - $II\beta$ może się tworzyć w ŚW bez udziału Ii i przechodzić na powierzchnię komórki, gdzie mogą prezentować peptydy pobrane z otoczenia i, być może, także peptydy pochodzące z białek cytozolowych, przyłączone już w ŚW.

się ukryć nawet we wnętrzu komórki, bo i tam zostanie wysledzony przez „policję immunologiczną”. Z kolei cząsteczki MHC klasy II występują w zasadzie tylko na komórkach układu immunologicznego (limfocytach B, makrofagach, komórkach dendrytycznych, a nawet na pobudzonych limfocytach T), dzięki czemu wspomagające limfocyty $CD4^+$, rozpoznające kompleks peptyd – cząsteczka klasy II, nie „marnują” swojej energii na jałowe usiłowania współpracy z komórkami spoza układu immunologicznego [4].

Jak to się jednak dzieje, że cząsteczki klasy I prezentują peptydy wewnątrzkomórkowe, a cząsteczki klasy II – peptydy pochodzące z białek zewnątrzkomórkowych? Wynika to z różnicy w transporcie cząsteczek obu klas MHC z miejsca syntezy w cytozolu na powierzchnię komórki (rys. 9).

Łańcuchy α klasy I bezpośrednio po syntezie przechodzą do siateczki wewnątrzplazmatycznej (reticulum endoplazmatycznego), a stamtąd są transportowane na powierzchnię komórki. W czasie pobytu w siateczce wewnątrzplazmatycznej łańcuch α łączy się z β_{2m} i z peptydem [5]. Peptydy pochodzą z białek syntetyzowanych w cytozolu i pociętych enzymami proteolitycznymi zorganizowanymi w kompleks zwany proteasomem. Część białek proteasomu jest kodowana przez geny umiejscowione w obrębie MHC, w regionie klasy II (rys. 6) [21]. W przejściu peptydu z cytozolu do wnętrza siateczki wewnątrzplazmatycznej, gdzie może spotkać łańcuch klasy I z pustym jeszcze (tzn. nie zajęтым przez inny peptyd) rowem pośredniczy specjalna struktura (heterodimer białkowy) zwana transporterem peptydów (oba łańcuchy polipeptydowe tego dimeru są również kodowane w regionie klasy II MHC [12, 19]). Połączenie łańcucha α z β_{2m} jest bardziej stabilne, jeżeli jednocześnie przyłączony jest peptyd, i odwrotnie: połączenie łańcucha α z peptydem jest silniejsze, jeśli towarzyszy temu przyłączenie β_{2m} . Stabilne kompleksy łańcucha α – peptyd – β_{2m} są przenoszone na powierzchnię komórki. Tam mogą napotkać limfocyt T z odpowiednim receptorem [5].

Droga cząsteczek MHC klasy II z miejsca syntezy na powierzchnię komórki jest bardziej skomplikowana (rys. 9). Podobnie jak cząsteczki klasy I, po syntezie przechodzą one do siateczki wewnątrzplazmatycznej. Tutaj łączą się z tzw. łańcuchem niezmiennym (I_i = invariant chain; nazwano go tak, ponieważ w przeciwieństwie do cząsteczek MHC nie wykazuje zmienności osobniczej), kodowanym poza MHC, w innym chromosomie. Uważa się obecnie, że I_i pełni dwojaką rolę: (1) zasłania rów w cząsteczce klasy II, chroniąc go przed związaniem peptydu pochodzenia wewnątrzkomórkowego, zanim cząsteczka MHC dotrze do miejsca, gdzie może spotkać peptyd pochodzenia zewnątrzkomórkowego; (2) umożliwia przejście cząsteczki klasy II z siateczki wewnątrzplazmatycznej poprzez aparat Golgiego do endosomów, czyli pęcherzyków utworzonych przez wpuklenie i zamknięcie błony komórkowej wokół płynu pobranego z otoczenia. Płyn ten zawiera rozpuszczone białka pochodzące zarówno z ustroju (białka surowicy i inne), jak i ewentualnie obce białka produkowane przez intruzów – bakterie i pasożyty. Również białka produkowane

wane przez bakterie i wirusy wewnątrz komórek ciała, uwolnione po zabiciu komórki przez patogen, mogą się w ten sposób dostać do wnętrza żywej, jeszcze nie zakażonej komórki. Także różne receptory występujące na powierzchni komórki wiążą różne białka i peptydy — hormony, czynniki wzrostowe itp. Wszystkie te białka po pobraniu przez komórkę do endosomu ulegają stopniowemu trawieniu enzymatycznemu, aż wreszcie w lizosomach ulegają całkowitej degradacji do aminokwasów. Jednakże, zanim to nastąpi, peptydy pochodzące z częściowo strawionych białek mogą być związane przez cząsteczki MHC klasy II napotkane w endosomie. Po wejściu kompleksu cząsteczka klasy II-łańcuch Ii do endosomu łańcuch Ii zostaje częściowo odszczepiony przez enzym proteolityczny, odsłaniając w ten sposób miejsce wiążące peptyd na cząsteczce MHC. Poszczególne etapy tego procesu nie są jeszcze dobrze znane, lecz być może związanie peptydu powoduje odłączenie i/lub degradację pozostałej części łańcucha niezmiennego. Cząsteczka klasy II z przyłączonym peptydem wędruje teraz na powierzchnię komórki, gdzie może go prezentować limfocytom T [5].

Tak więc rozdzielenie szlaków transportu cząsteczek MHC klasy I i II na powierzchnię komórki i udział β_2m i Ii w tych procesach powoduje segregację peptydów pochodzenia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego wiązanych przez cząsteczki MHC obu klas. W rezultacie antygeny wewnątrzkomórkowe są prezentowane limfocytom $CD8^+$ oddziałującym z cząsteczkami klasy I obecnymi na powierzchni niemal wszystkich komórek, a antygeny pochodzące spoza komórki — limfocytom $CD4^+$ oddziałującym z cząsteczkami klasy II występującymi na komórkach układu immunologicznego. Dzięki temu patogeny namnażające się w różnych komórkach ciała mogą zostać zniszczone przez zabicie produkujących je komórek, zaś patogeny pozakomórkowe i ich produkty (np. toksyny) mogą być neutralizowane przez reakcje immunologiczne wyzwalane przez opłaszczenie antygeny przeciwciałem. Ten dualizm układu immunologicznego nie jest jednak absolutny: antygeny patogenów wewnątrzkomórkowych mogą po rozpadzie zakażonej komórki być pobrane przez inne komórki i prezentowane przez cząsteczki MHC klasy II, wyzwalając ciąg reakcji: limfocyt $CD4^+$ $\rightarrow$ limfocyt B $\rightarrow$ swoiste przeciwciało $\rightarrow$ nieswoiste mechanizmy obronne (opsonizacja, chemotaksja, fagocytoza, liza) doprowadzające do zniszczenia komórek produkujących patogeny i mających ich antygeny na powierzchni. Podobnie limfocyty $CD4^+$ mogą niekiedy bezpośrednio zabijać komórki zakażone, rozpoznając antygen patogenu prezentowany przez cząsteczkę MHC klasy II.

Powróćmy teraz do pytania postawionego na wstępie: jakie jest biologiczne znaczenie różnic w MHC między osobnikami tego samego gatunku?

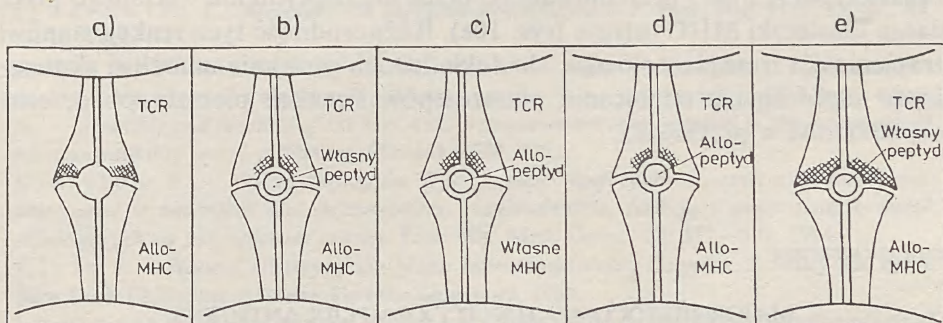
Jak już powiedziano wcześniej, każda cząsteczka MHC (klasy I i II) może wiązać duży, lecz ograniczony zakres różnych peptydów [15]. Zwykle w organizmie występują dwa lub trzy rodzaje cząsteczek klasy I (u człowieka

HLA-A, -B i -C)* i dwa do czterech rodzajów cząsteczek klasy II (np. HLA-DR, -DP i -DQ; u wielu ludzi są dwa rodzaje cząsteczek DR: $DR\alpha\beta_1$ oraz $DR\alpha\beta_3$ lub $DR\alpha\beta_4$ lub $DR\alpha\beta_5$, patrz rys. 6). Każdy z tych rodzajów cząsteczek wiąże inne peptydy własnoustrojowe, wywołując na nie tolerancję (brak odpowiedzi immunologicznej) przez delecję odpowiednich klonów limfocytów T w czasie dojrzewania w grasicy lub przez funkcjonalne unieczynnienie (tzw. klonalną anergię) klonów limfocytów T w tych tkankach, gdzie te antygeny są prezentowane. Jednakże nie wszystkie peptydy ustrojowe są wiązane przez cząsteczki MHC danego osobnika. Dzięki temu „dziury”, czyli „plamki ślepe” w repertuarze limfocytów T wywołane przez selekcję negatywną i klonalną anergię nie są tak wielkie, by uniemożliwiały rozpoznawanie i odpowiedź na obce antygeny [15]. Zdarzają się jednak patogeny, których antygeny przypominają własne białka danego osobnika i w ten sposób trafiają w owe „dziury” w repertuarze jego limfocytów T. Patogen taki może wnikać i rozwinąć swoją szkodliwą działalność u tego osobnika bez wywoływania reakcji immunologicznej. Ponieważ jednak u różnych osobników gatunku (np. *Homo sapiens*) występują różne allele MHC, gatunek jako całość może przeżyć konfrontację z wielkim spektrum patogenów. Nawet gdy epidemia u ludzi lub epizootyja u zwierząt powoduje śmierć wielu osobników, to jednak ci, których zestaw cząsteczek MHC umożliwia wiązanie i prezentację antygenów czynnika zakaźnego, a wyprofilowany przez ten zestaw MHC repertuar limfocytów T pozwala na skuteczną obronę immunologiczną, mogą przeżyć infekcję i pozostawić potomstwo odporniejsze na dany patogen niż populacja wyjściowa. Przykładem braku odporności na patogen w populacji, która się jeszcze z nim nie zetknęła, były fatalne dla mało licznych plemion Indian amerykańskich epidemie ospy zawleczone (nieraz celowo) przez kolonistów europejskich. Im liczniejsza populacja i im większy w niej polimorfizm MHC, tym większą ma ona szansę przeżycia takiej epidemii. Jednym z rzadkich wśród ssaków wyjątków od tej reguły jest chomik syryjski, u którego nie udało się wykryć polimorfizmu cząsteczek (ani genów) MHC klasy I (przy pewnym jednakże polimorfizmie w klasie II). Gęstość populacji tego gatunku jest jednak bardzo mała, a poszczególne osobniki żyją samotnie, stykając się z innymi osobnikami swego gatunku (płci odmiennej) tylko na krótki czas aktu płciowego, więc sposobności do wzajemnego zakażenia się nie mają wiele [14].

Ceną wszakże, jaką płacimy za różnorodność cząsteczek MHC w populacji ludzkiej, jest brak zgodności tkankowej między komórkami od różnych osób. Ten brak zgodności uwiadcza się w przypadku przeszczepów obcych komórek, tkanek i narządów jako dwa typy reakcji: reakcja odrzucania przeszczepu

* Dla jasności wyводу pomijamy tu tzw. „nieklasyczne” cząsteczki klasy I (u człowieka HLA-E, -F i -G, patrz ryc. 6), które występują w znacznie mniejszej ilości i tylko na niektórych komórkach, są niepolimorficzne lub b. mało polimorficzne i ich zdolność do prezentacji obcych antygenów nie jest znana.

przez jego biorcę (przy przeszczepianiu obcej tkanki nielimfoidalnej, tj. spoza układu immunologicznego, np. nerki, serca, skóry) oraz reakcja przeszczepu przeciw gospodarzowi (przy przeszczepianiu komórek limfoidalnych osobie z upośledzoną funkcją układu immunologicznego; np. przy przeszczepianiu odmiennego pod względem MHC szpiku obecne w przeszczepie limfocyty T mogą rozpoznać obce dla nich antygeny MHC gospodarza, czyli biorcy, i zapoczątkować reakcję przeciw jego tkankom).



Rys. 10. Modele rozpoznawania alloantygeny MHC przez limfocyt T. TCR — receptor limfocyty T; allo-MHC — allogeniczna cząsteczka MHC; allopeptyd — peptyd pochodzący z allo-MHC. Zakreskowano region TCR rozpoznający obcy antygen

Do niedawna sądzono, że to właśnie same allogeniczne (genetycznie różne) cząsteczki MHC są rozpoznawane przez limfocyty T. Sprawa nie jest jednak tak prosta. Analiza pozycji zmiennych aminokwasów w cząsteczkach MHC (zarówno klasy I, jak i II) pokazuje, że wprawdzie allogeniczne cząsteczki MHC w niektórych przypadkach rzeczywiście się różnią aminokwasami w pozycjach przypuszczalnego kontaktu z receptorem limfocyty T (TCR) i wówczas limfocyty T mogą te różnice rozpoznawać bezpośrednio (rys. 10a), ale największa zmienność występuje na dnie i brzegach rowu, czyli miejsca wiązania peptydu (rys. 2 i tab. 1). Różnice w tych pozycjach nie mogą być bezpośrednio „dostrzegane” przez limfocyty T, natomiast mogą wpływać — i często wpływają — na wiązanie peptydów prezentowanych tym limfocytom. W sytuacji, gdy różnice występują tylko w rowie, limfocyt T rozpoznaje nie samą allogeniczną cząsteczkę MHC jako obcą (ponieważ w dostępnych jego receptorowi miejscach nie ma różnic między własnym a obcym MHC), tylko taki peptyd pochodzący z własnoustrojowego białka, który nie jest wiązany przez cząsteczki MHC danego osobnika, natomiast może być związany i zaprezentowany przez obcą cząsteczkę MHC (rys. 10b). Peptyd taki, nie będąc prezentowanym przez własne MHC w czasie rozwoju limfocytów T w grasicy, nie wywołał tolerancji i może pobudzać limfocyty T do odpowiedzi tak jak obcy antygen (jest postrzegany przez gospodarza jako coś obcego, mimo iż może pochodzić od niego lub z białka identycznego u dawcy i biorcy!). Wreszcie allogeniczna

cząsteczka MHC może zostać pobrana i częściowo strawiona przez komórkę gospodarza, a produkty jej degradacji — peptydy — mogą być prezentowane limfocytom T gospodarza przez jego własne cząsteczki MHC (rys. 10c). Istnieją dowody doświadczalne na wszystkie te trzy sytuacje [2, 16]. Oczywiście można sobie wyobrazić również szereg sytuacji pośrednich, np. prezentację allogenicznego peptydu MHC przez taką samą lub inną allogeniczną cząsteczkę MHC (rys. 10d) lub równoczesne rozpoznanie przez limfocyt T zarówno samej obcej cząsteczki MHC, jak i prezentowanego przez nią peptydu nie wiążanego przez własne cząsteczki MHC ustroju (rys. 10e). Różnorodność tych reakcji stanowi utrapienie dla transplantologów, ale dokładne ich poznanie umożliwi skuteczniejsze zapobieganie odrzucaniu przeszczepów i reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi w przyszłości.

PIOTR KUŚNIERCZYK

MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX ANTIGENS: STRUCTURE, GENETICS AND BIOLOGICAL FUNCTION

S u m m a r y

The major histocompatibility complex (MHC) class I molecules are glycoprotein heterodimers of a heavy (α) and light (β -2-microglobulin, β_{2m}) chains, of which only α chain is encoded in the MHC region. MHC class II molecules are also heterodimers of α and β chain, both MHC region-encoded. Both class I and class II molecules exhibit extreme genetic polymorphism and function as antigen-presenting molecules. Class I molecules bind antigenic peptides derived from intracellular proteins and present them to $CD8^+$ T lymphocytes. Class II molecules bind peptides derived from extracellular proteins and present them to $CD4^+$ T lymphocytes. This dichotomy is a consequence of a distinct traffic pattern of class I and II molecules from the site of their synthesis to the cell surface, and of the recognition of class I and II monomorphic domains on the antigen-presenting cell by $CD8$ and $CD4$ coreceptors of the T cell, respectively. The role of MHC polymorphism and of distinct mechanisms for presentation of endo- and exogenous antigens in the defence of the organism against pathogens is discussed.

LITERATURA

1. Alexander D. R., Cantrell D. A. — *Kinases and phosphatases in T-cell activation*. Immunol. Today, 10: 200—205, 1989.
2. Benoist C., Mathis D. — *Demystification of the alloresponse*. Curr. Biol., 1: 143—144, 1991.
3. Bjorkman P. J., Parham P. — *Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules*. Annu. Rev. Biochem., 59: 253—288, 1990.
4. Boehmer H. von, Kisielow P. — *Jak układ immunologiczny poznaje sam siebie*. Świat Nauki, grudzień: 48—56, 1991.
5. Braciale T. J., Braciale V. L. — *Antigen presentation: structural themes and functional variations*. Immunol. Today, 12: 124—129, 1991.
6. Davis M. M.: *T cell receptor gene diversity and selection*. Ann. Rev. Biochem., 59: 475—496, 1990.

7. Falk K., Rotzschke O., Rammensee H. G. — *Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 348: 248–251, 1990.
8. Falk K., Rotzschke O., Stefanović S., Jung G., Rammensee H.-G. — *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. Nature, 351: 290–296, 1991.
9. Flajnik M. F., Canel C., Kramer J., Kasahara M. — *Evolution of the major histocompatibility complex: Molecular cloning of major histocompatibility complex class I from the amphibian Xenopus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 537–541, 1991.
10. Harding C. V. — *Pathways of antigen processing*. Curr. Op. Immunol., 3: 3–9, 1991.
11. Ignatowicz L.: *Receptory dla antygeny na limfocytach T*. Post. Hig. Med. Dośw., 43: 1–12, 1989.
12. Kelly A., Powis S., Kerr L.-A., Mockridge I., Elliott T., Bastin J., Uchańska-Ziegler B., Ziegler A., Trowsdale J., Townsend A. — *Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex*. Nature, 355: 641–644, 1992.
13. Kisielow P. — *Obraz limfocytów T w „oczach” limfocytów B, czyli o wykorzystaniu przeciwciał w badaniach nad dojrzewaniem, różnorodnością, funkcją i swoistością komórek różniących się pod wpływem grasicy*. Post. Hig. Med. Dośw., 38: 577–599, 1984.
14. Klein J. — *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. J. Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1986.
15. Lawlor D. A., Zemmour J., Ennis P. D., Parham P. — *Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection*. Annu. Rev. Immunol., 8: 23–63, 1990.
16. Lechler R., Lombardi G. — *Structural aspects of allorecognition*. Curr. Op. Immunol., 3: 715–721, 1991.
17. Matej H. — *Główny kompleks zgodności tkankowej*. [W:] Immunologia. red. S. Mackiewicz, PZWŁ, Warszawa 1991, s. 164–183.
18. Mengl-Gaw L., McDevitt H. O. — *Genetics and expression of mouse Ia antigens*. Annu. Rev. Immunol., 3: 367–396, 1985.
19. Parham P. — *Transporters of delight*. Nature, 348: 674–675, 1990.
20. Rask L., Jonsson A.-K., Svensson A.-C., Gustafsson K., Andersson L. — *The structure of human MHC class II genes*. Autoimmunity, 8: 237–244, 1991.
21. Robertson M. — *Proteasomes in the pathway*. Nature, 353: 300–301, 1991.
22. Trowsdale J., Ragoussis J., Campbell R. D. — *Map of the human MHC*. Immunol. Today, 12: 443–446, 1991.

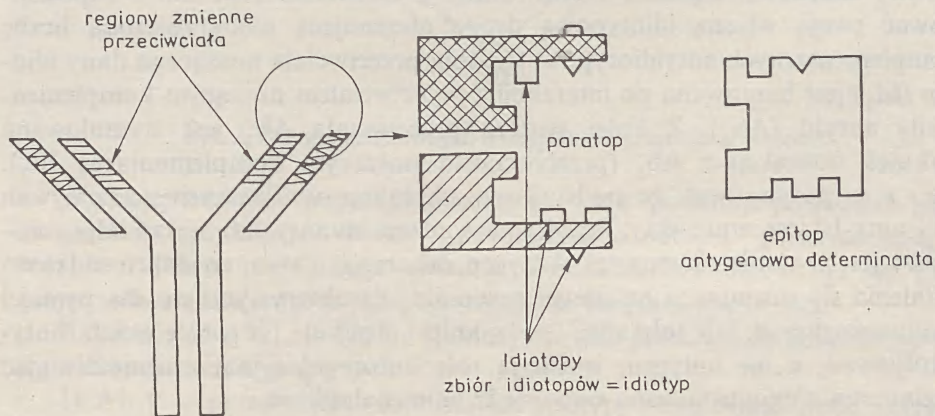
JAN SALWA

Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda
Zakład Immunologii Nowotworów
Wrocław

REGULACJA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ PRZEZ PRZECIWCIAŁA ANTYIDIOTYPOWE

Teorię sieci oddziaływań idiotypowych – antyidiotypowych, według której reakcje immunologiczne sterowane są idiotypem, zaproponował *J e r n e* w 1974 r.

Termin „idiotop” czy „determinant idiotypowy” był zaproponowany przez *O u d i n a* i *M i c h l e*’a [19] *K u n k e l a* i wsp. [13] do oznaczenia szczególnych antygenowych determinant dla małego zbioru cząsteczek przeciwciał. Idiotop definiuje zmienny region cząsteczki przeciwciała i często służy jako



Rys. 1. Schematyczne zobrazowanie umiejscowienia idiotopów, paratopu na cząsteczce immunoglobuliny

fenotypowy marker tego regionu immunoglobuliny (rys. 1). Takie same idiotopy mogą występować na cząsteczkach immunoglobulin otrzymanych od organizmów z różnych gatunków w odpowiedzi na ten sam czy różne epitopy. Takie idiotopy są określane jako idiotopy reagujące krzyżowo. Idiotopy reagujące krzyżowo uważa się za produkty genów konserwatywnych. Zmienny region cząsteczki przeciwciała zawiera też miejsce wiążące antygen, czyli

obszar, który kontaktuje się z antygenem, i ten obszar został określony jako paratop. Częsteczka przeciwciała ma dwoisty charakter, ponieważ rozpoznaje ona dany antygen i sama jest immunogenna z powodu obecności jej determinant idiotopowych. Ta dwoistość cząsteczki immunoglobuliny doprowadziła *Jernego* [8, 9, 10] do opisanie układu odpornościowego jako sieci zmiennych domen tworzących sieć oddziaływań idiotop—antyidiotop. Zgodnie z tą teorią antygen (Ag) indukuje produkcję przeciwciała Ab_1 , które charakteryzowane jest przez występujący na nim idiotop Id_1 i stymulujący syntezę przeciwciała antyidiotypowego Ab_2 noszącego idiotop Id_2 . To przeciwciała antyidiotypowe indukuje produkcję kolejnego przeciwciała anty-antyidiotypowego Ab_3 itd.

Obok przeciwciał, elementami sieci oddziaływań Id —anty- Id są również limfocyty, które za pośrednictwem swoich receptorów włączają się w sieć oddziaływań. Częsteczka receptora na limfocytach ma szczególną konformację, która nie tylko swoiście wiąże antygen, lecz sama jest antygenem. Taki antygen, podobnie jak część zmienna immunoglobuliny, złożony jest z determinantów zwanych idiotopami, których zbiór tworzy idyotyp. W ten sposób receptory limfocytów mogą zachowywać się jak antygeny charakterystyczne dla danego klonu

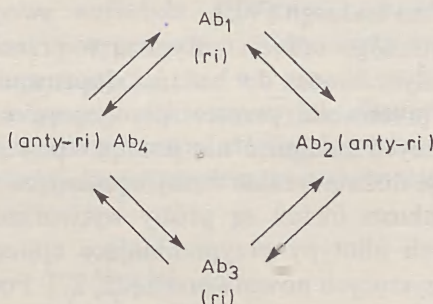
Jednym z postulatów teorii sieci oddziaływań Id —anty- Id jest ich wektorowy charakter. Zgodnie z tym, każde przeciwciała Ab_1 może zapoczątkować swoją własną idiotypową drogę obejmującą nieograniczoną liczbę komplementarnych antyidiotypów. Synteza przeciwciała noszącego dany idyotyp (Id_1) jest hamowana po interakcji z przeciwciałem noszącym komplementarny antyid (Ab_2). Z kolei synteza przeciwciała Ab_2 jest stymulowana wskutek interakcji z Ab_1 (przeciwciałem noszącym komplementarny Id_1). *Jerne* proponował, że podstawowy charakter wzajemnych oddziaływań Id —anty- Id jest supresyjny. Przed wprowadzeniem antygeny układ odpornościowy jest w stanie równowagi. Antygen zaburza ten stan, co doprowadza do ustalenia się równowagi na innym poziomie charakterystycznym dla pamięci immunologicznej lub tolerancji, co z kolei implikuje, że przeciwciała antyidiotypowe, a nie antygen, spełniają rolę autoregulacyjną, uniemożliwiając nadmierną niekontrolowaną odpowiedź immunologiczną.

Późniejsze badania wskazują na cykliczny charakter oddziaływań ograniczonych zbiorów Id i anty Id [21].

Wykonana przez *Bona* i wsp. [2, 3, 20] analiza immunochemiczna czterech kolejnych przeciwciał szlaku idiotypowego otrzymanych u szczurów i myszy wykazała, że Ab_1 i Ab_3 noszą wspólne idiotypy, a Ab_2 i Ab_4 wiążą się do Ab_1 . W celu wyjaśnienia tych wyników *Bona* i wsp. przyjęli założenie, że przeciwciała Ab_1 ma, oprócz konwencjonalnych idiotypów, specjalny zbiór idiotypów, które określili jako idiotypy regulatorowe (ri). Głównym wynikiem immunizacji przeciwciałem Ab_1 jest produkcja przeciwciał anty-ri. Autorzy sugerują, że tylko regulatorowe idiotypy są immunogenne w systemach syn-

genicznych i autologicznych. Przeciwciała Ab_2 nie mają regulatorowych idiotypów, lecz są zdolne do indukcji przeciwciał Ab_3 . Te z kolei przeciwciała mają ri wspólne z Ab_1 i tylko mała część zbioru przeciwciał Ab_3 reprezentuje rzeczywiste przeciwciała antyidiotypowe. Przeciwciała Ab_4 otrzymane przez immunizację Ab_4 są głównie przeciwciałami anty-ri. W i k l e r [28] wykazał, że Ab_4 wiąże się z Ab_3 i Ab_1 (rys. 2). B o n a i wsp. [2, 3] scharakteryzowali regulatorowe idiotypy następująco:

- 1) funkcjonują one jako autoimmunogeny;
- 2) są wspólne dla różnych przeciwciał czy komórkowych oddziaływań idiotypowych, które mogą indukować przeciwciała o różnych swoistościach;
- 3) mogą być rozpoznawane przez regulatorowe limfocyty T, które kontrolują ekspansję klonów noszących idiotypy regulatorowe.



Rys. 2. Obieg regulatorowych idiotypów. Objasnienia w tekście

W swojej teorii sieci immunologicznej J e r n e postuluje posiadanie przez przeciwciała antyidiotypowe tzw. „wewnętrznego odbicia” (Internal Images) antygeny. Przez immunizację zwierząt przeciwciałami otrzymuje się zbiór antyprzeciwciał heterogennych pod względem funkcji i swoistości.

B o n a i K ö h l e r [2, 3, 12] sklasyfikowali przeciwciała antyidiotypowe wg następujących 4 grup:

- 1) $Ab_{2\gamma}$ — przeciwciała rozpoznające idiotypy i hamowane przez antygen;
- 2) $Ab_{2\alpha}$ — przeciwciała rozpoznające idiotypy i nie hamowane przez antygen;
- 3) $Ab_{2\epsilon}$ — przeciwciała swoiste dla idiotypów i epitopów;
- 4) $Ab_{2\beta}$ — przeciwciała noszące wewnętrzne odbicie antygeny.

Przeciwciała naśladujące antygen (noszące wewnętrzne odbicie antygeny) powinny oddziaływać wzajemnie z receptorem immunoglobulinowym innych klonów. W badaniach nad regulacją odpowiedzi immunologicznej na polifruktozan autorzy stwierdzili, że monoklonalne antyidiotypowe przeciwciała o symbolu 1738 wykazywało stymulujące własności antygeny (bakteryjny lewan).

Urban i wsp. [25, 26] opisali przeciwciała anty- Ab_2 otrzymane u królików szczepionych przeciwciałem przeciw TMV (Tumor Mammary Virus). Te przeciwciała anty- Ab_2 reagowały, zgodnie z oczekiwaniem, z antygenem oraz z przeciwciałami anty-TMV otrzymanymi u innych gatunków zwierząt, jak myszy, świnki, konie i kurczęta. Wstrzyknięte myszom powodowały syntezę przeciwciał anty-TMV w nieobecności tego antygenu. Świadczy to, że zachowują się one jak antygen (TMV), a więc mają wewnętrzne odbicie antygenu.

Innym przykładem przeciwciał z wewnętrznym odbiciem antygenu jest przeciwciało antyidiotypowe otrzymane przez Brucke i wsp. [6]. Autorzy ci wykazali podobieństwo sekwencji aminokwasowych pomiędzy przeciwciałem monoklonalnym antyId i antygenem (hemaglutynina retrowirusa 3), gdzie blisko połowa aminokwasów wykazuje homologię ze zrębem segmentu części zmiennej łańcucha ciężkiego (VH), a reszta jest homologiczna do segmentu części zmiennej łańcucha lekkiego (VL).

Koncepcja wewnętrznego odbicia antygenu w przeciwciale antyidiotypowym przez wiele lat stymulowała do badań i doprowadziła do oryginalnych metod wytwarzania przeciwciał przeciw patogenom i receptorom komórkowym. Mimo wyraźnych osiągnięć nie jest ona powszechnie akceptowana [18] i pewne implikacje doświadczone z niej wynikające są nadal weryfikowane. Ciekawym kierunkiem badań są próby wytworzenia przeciwciał antyidiotypowych mających idiotypy przypominające epitopy wirusów, bakterii czy antygenów towarzyszących nowotworom [22, 27]. Podanie takich przeciwciał innym zwierzętom tego samego gatunku, w jakim zostały wytworzone, prowadzić winno do ich uodpornienia na zastosowany antygen. W ten sposób można by otrzymywać własnogatunkowe surowice odpornościowe bez niebezpieczeństwa związanego z wprowadzeniem patogennych drobnoustrojów do organizmu.

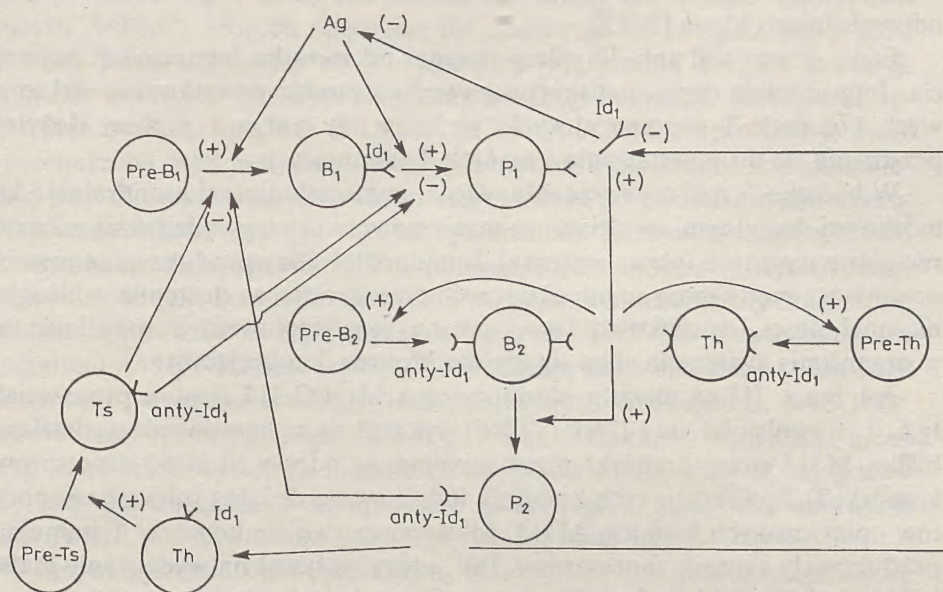
PRZECIWCIAŁA AUTOANTYIDIOTYPOWE

Obserwowano obecność naturalnie występujących autoantyidiotypowych przeciwciał. Połączone surowice ludzkie od zdrowych dawców miały zdolność reagowania z autoprzeciwciałami od pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi, jak również z ludzką immunoglobuliną M produkowaną *in vitro* przez normalne lub stransformowane wirusem EBV komórki B [23]. Autoantyidiotypowe przeciwciała wykrywano w przypadku odpowiedzi immunologicznej na dany antygen. I tak, metodami immunochemicznymi u myszy zainfekowanych wirusem grypy wykryto w śledzience komórki produkujące przeciwciała autoantyidiotypowe o swoistości dla idiotypu PY206 [5]. Również w odpowiedzi na fosforylocholinę, bakteryjny lewan, dekstran B czy TNP-fikoll stwierdzono obecność autoidiotypowych przeciwciał [3].

EFEKT PRZECIWCIAŁ ANTYIDIOTYPOWYCH PODCZAS ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Produkcja przeciwciał antyidiotypowych w organizmie świadczy o immunogennych właściwościach cząsteczki immunologicznej, lecz nie ujawnia ich roli w odpowiedzi immunologicznej. Efektywny wpływ na odpowiedź immunologiczną na określony antygen przez przeciwciało antyidiotypowe może być dokonany, jeśli ma ono swoiste miejsca dla idiotypów klonów komórek zaangażowanych w tę odpowiedź, a także kiedy antyidiotypowe przeciwciało rozpoznaje idiotyp na dominującym klonie lub rozpoznaje wspólny idiotyp, który mają komórki różnych klonów biorących udział w odpowiedzi na dany antygen.

W cytowanych powyżej badaniach nad obecnością autoantyidiotypowych przeciwciał obserwowano, że liczba antygenowo swoistych komórek produkujących przeciwciała malała, podczas gdy liczba komórek produkujących przeciwciała antyidiotypowe wzrastała. Obserwacje te wskazują na hamujący wpływ przeciwciał antyidiotypowych na odpowiedź immunologiczną [3, 11]. Wyniki te są zgodne z propozycją J e r n e g o , że podstawowym oddziaływaniem antyidiotyp idiotyp jest efekt supresyjny. Oznacza to, że stężenie immunoglobuliny mającej dany idiotyp obniża się pod wpływem oddziaływania z przeciwciałem posiadającym komplementarny paratop (przeciwciało anty-



Rys. 3. Interakcje doprowadzające do produkcji autoantyidiotypowych (anty Id_1) przeciwciał, które tłumią proliferację klonów Id_1^+ oraz powstawanie supresorowych komórek T idiotypowo swoistych. Objasnienie w tekście

idiotypowe) i to oddziaływanie jest supresyjne dla komórek noszących dany idiotyp na swoich receptorach.

Rysunek 3 obrazuje prosty schemat regulatorowy według H i e r n a u x [7]. Przedstawiony jest tu wpływ przeciwciał antyidiotypowych w przebiegu odpowiedzi immunologicznej na niezależne od komórek T antygeny (Ag). W pierwszym etapie prekursorowe komórki pre-B różnicują się do dojrzałych limfocytów B, które z kolei proliferują i różnicują się do komórek (P) produkujących przeciwciało. Przeciwciało (Ab_1) jest scharakteryzowane przez idiotyp Id1. Przeciwciało Ab_1 rozpoznaje antygen Ag i eliminuje go. Idiotyp przeciwciała Ab_1 Id1 stymuluje proliferację komórek B_2 , które różnicują się z prekursorowych komórek pre- B_2 . Etap ten jest zależny od limfocytów T. Komórki B_2 różnicują się do komórek (P_2) produkujących przeciwciała swoiste dla Id1. Przeciwciała te mogą tłumić proliferację i różnicowanie komórek B_1 swoistych dla tych przeciwciał, tym samym mogą hamować produkcję przeciwciał Ab_1 . Efekt działania przeciwciał antyidiotypowych na odpowiedź immunologiczną może się jednak różnić w zależności od warunków doświadczenia.

Immunizacja zwierzęcia wysokimi dawkami (powyżej 100 μ g) przeciwciała anty-Id paraliżuje odpowiedź immunologiczną zarówno u noworodków, jak i dorosłych zwierząt. Zahamowanie odpowiedzi u dorosłych zwierząt trwa krócej w porównaniu do supresji obserwowanej u noworodków. Supresja u noworodków często bywa trwała, prawdopodobnie z powodu eliminacji odpowiedniego klonu [3, 12].

Efekt przeciwciał anty-Id zależy również od sposobu immunizacji zwierzęcia. Immunizacja drogą podskórną powoduje zwykle powstawanie efektorowych komórek T-wspomagających, podczas gdy antygen podany dożylnie przyczynia się do powstawania komórek T-hamujących.

W badaniach nad regulacją odpowiedzi immunologicznej humoralnej i komórkowej dogodnymi modelami są mysie nowotwory wywodzące się z komórek plazmatycznych (plasmocytoma). Immunoglobuliny produkowane przez te nowotwory często mają znaną aktywność przeciwciała, są dostępne w nieograniczonej ilości, stosunkowo łatwo można je wyizolować, a rozwijając się w organizmie zwierzęcia stają się szybko klonem dominującym.

A b b a s [1] na modelu plasmocytoma MOPC-315 (izotyp przeciwciała IgA, λ_2 o swoistości anty-DNP i -TNP) wykazał, że za hamowanie wydzielania białka M315 przez komórki plasmocytoma są odpowiedzialne supresorowe komórki T. Proliferację tych komórek indukowano dożylną iniekcją splenocytów opłaszczonych białkiem M315. Idiotypowo swoiste komórki T hamujące produkowały czynnik supresorowy TsF, który wpływał na wydzielanie białka M315 w obecności komórek Ia^+ i czynnik ten był idiotypowo swoisty.

Na tym samym modelu plasmocytoma MOPC-315 L y n c h i wsp. [15], również badali efekt przeciwciał anty-Id. Układ doświadczalny był odmienny. Mianowicie, na myszy BALB/c uodpornione oczyszczonym białkiem M315,

a więc uodpornione swoiście idiotypowo, można było przeszczepić nowotwór MOPC-315 stosując odpowiednio dużą dawkę komórek tego nowotworu. Nowotwory rosnące u tych myszy nie produkują monoklonalnego białka M315. Natomiast kiedy komórki od takich myszy przeszczepiono do nieuodpornionych biorców, komórki przyjętych nowotworów odzyskiwały zdolność produkowania białka M315. Zahamowanie wydzielania białka M315 przez komórki plasmocytoma MOPC-315 rosnących u odpornionych zwierząt było idiotypowo swoiste i odwracalne. Proces ten odbywał się za pośrednictwem komórek T, które działały bezpośrednio na komórki MOPC-315. Idiotypowo swoiste zahamowanie wydzielania białka M315 mogło być przeniesione do normalnych myszy przez komórki śledzionowe pobrane od zwierząt immunizowanych tym białkiem. Aktywność hamująca mogła być zniesiona przez surowicę anti-Thy-1 z dopełniaczem, co świadczy o udziale limfocytów T. W badaniach *in vitro* również otrzymali podobne wyniki, a badania powierzchni komórek hamujących wykazały, że komórki te mają powierzchniowe receptory rozpoznające i wiążące białko M315. Inne białko szpiczakowe M460 tej samej klasy i takiej samej swoistości, lecz mające inny idiotyp, nie było przez te komórki wiązane.

Obok wpływu hamującego na układ odpornościowy przeciwciał anty-idiotypowych doświadczalnie wykazano, że mogą one stymulować odpowiedź immunologiczną. Iniekcja małych ilości (0,01 – 1,0 μ g) przeciwciał antyidiotypowych noworodkom mysim, a następnie immunizacja tych myszy antygenem, powoduje aktywację i następnie dominację klonów komórek idiotypowo swoistych A48Id⁺, których obecności nie obserwuje się podczas odpowiedzi wywołanej przez bakteryjny lewan (antygen). Aktywacja klonów komórek idiotypowo swoistych jest wynikiem bezpośredniej interakcji przeciwciał anti-Id z prekursorami komórek B noszących idiotyp A48Id. Odpowiedź ta może być przenoszona przez oczyszczone klony komórek B do letalnie napromienionych myszy. Zniesienie tej odpowiedzi następowało po potraktowaniu komórek T przeciwciałami anti-Ly1⁺, 2 i komplemtem. Ekspansja klonów A48Id jest związana z indukcją komórek T wspomagających A48Id-swoistych. Idiotypowa swoistość tych komórek udowodniono przez ich iniekcję myszom nu/nu i badanie odpowiedzi u tych myszy na hapten TNP po immunizacji ich koniugatami A48-TNP i M384-TNP. Podwyższoną odpowiedź na hapten TNP obserwowano w grupie zwierząt immunizowanych koniugatem A48-TNP. Z doświadczeń opisanych przez B o n a i wsp. wynika, że stymulacja przez idiotyp komórek B występuje niezależnie od genów MHC klasy II czy genów IghC, lecz jest związana z kompleksem genów IghV, ponieważ aktywację klonów A48Id⁺ obserwowano tylko u myszy z genem IgV^a.

W innym systemie doświadczalnym, mianowicie po immunizacji myszy BALB/c dekstranem 1335, obserwowano obecność komórek T wspomagających, które rozpoznawały idiotyp obecny na białku szpiczakowym M104E (IgM. λ ₁). Odpowiedź proliferacyjna tych komórek T wymagała obecności makrofagów jako komórek prezentujących antygen, co implikuje, że

opisane komórki są komórkami T wspomagającymi, a rozpoznanie idiotypów zachodzi z udziałem antygenów MHC klasy II [16]. Indukcja idiotypowo swoistych komórek T wspomagających jest dobrze udokumentowana [16, 17, 24]. Są opisywane dwa rodzaje komórek Th idiotypowo swoistych. Pierwszy z nich to komórki Th, które rozpoznają przetworzony idiotyp w kontekście antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC [16, 17, 24], a drugi rodzaj to komórki Th, które reagują bezpośrednio z idiotypami na komórkach czy w surowicy bez pośrednictwa MHC [4].

Teoria J e r n e g o wywarła wpływ na badaczy zainteresowanych regulacją układu odpornościowego. Stymulowała wiele badań i dyskusji, wywołała również wiele kontrowersji. Niektóre aspekty tej teorii są niezgodne z obecnym rozumieniem odpowiedzi immunologicznej i wymaga to pewnych rozszerzeń. J e r n e oddziaływania Id-anty-Id ograniczył do przeciwciał i komórek B. Teraz wiadomo, że również limfocyty T biorą udział w tych oddziaływaniach. Również pogląd, że oddziaływania Id-anty-Id mają charakter wertykalny został zmieniony, gdyż stwierdzono, że działaniem przeciwciałem antyidiotypowym można raz stymulować, jak również tłumić odpowiedź ustroju do późniejszej ekspresji Id w odpowiedzi na antygen.

Teoria J e r n e g o spotyka się również z krytyką. L o n g m a n i C o h n [14] twierdzą, że założenia dla idiotypowych oddziaływań są absurdalne. Z kolei N i s o n o f f [18] nie zgadza się z założeniem, że idiotypowe interakcje grają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej, twierdząc, że obecne dane doświadczalne nie potwierdzają tego założenia. Również postulat odbicia wewnętrznego antygeny wg N i s o n o f f nie jest dostatecznie poparty wynikami doświadczeń przeprowadzonych na poziomie molekularnym.

Chociaż w pewnych układach doświadczalnych stwierdzono idiotypową regulację odpowiedzi immunologicznej, to nie wydaje się, że ma ona ogólne znaczenie. Obecnie hipoteza regulacji odpowiedzi immunologicznej pod wpływem antygeny dominuje i jest możliwe, że idiotypowe oddziaływania mogą dostarczać dodatkowych wzmocnień czy zahamowań.

Rolą układu odpornościowego, obok skutecznej obrony przed obcym antygenem, jest także niedopuszczenie do odpowiedzi przeciwko własnym antygenom. Reakcje układu odpornościowego stymulujące i hamujące są wynikiem złożonych procesów regulatorowych. Odpowiedź immunologiczna indukuje powstanie odpowiedzi o kierunku przeciwnym i w ten sposób każda immunokompetentna komórka jest kontrolowana przez inne antagonistyczne działania. Ponadto, regulacja odpowiedzi immunologicznej jest określona przez mechanizmy genetyczne układu neuroendokrynologicznego i idiotypowego.

Słownik

- Idiotop** — antygenowy determinant zlokalizowany w lub obok miejsca wiązania antygeny w części zmiennej przeciwciała. Gdy liczba cząsteczek przeciwciał, które mają dany idiotyp jest mała, to określa się go jako idiotop prywatny lub indywidualny IdI; gdy idiotopy występują często, są określane jako publiczne lub krzyżowo reagujące.
- Idiotyp** — zbiór idiotopów na cząsteczce przeciwciała.
- Paratop** — miejsce wiązania antygeny na cząsteczce przeciwciała.
- Epitop** — antygenowy determinant na konwencjonalnym antygenie (Ag) nie będącym immunoglobuliną.
- Wewnętrzne odbicie antygeny** — (internal image of antigen) idiotop, który naśladuje epitop obcego białka.
- Idiotypy regulatorowe** — idiotypy na cząsteczkach immunoglobuliny czy limfocytów, które są zdolne działać jako miejsca dla receptorowo swoistego systemu.
- Ab₁** — przeciwciało powstałe w wyniku immunizacji epitopem obecnym na antygenie.
- Ab₂** — przeciwciało powstałe w odpowiedzi na Ab₁.
- Ab₃** — przeciwciało indukowane przez immunizację gospodarza przeciwciałem Ab₂. Podzbiór tych przeciwciał może reagować z antygenem jak przeciwciało Ab₁. Zbiór tych przeciwciał jest podzielony na podzbiory:
- 1) przeciwciała Id⁻ Ag⁻ reagujące tylko z Ab₂
 - 2) Id⁺ Ag⁻ mających wspólne idiotypy z Ab₁ lecz nie wiążących antygeny
 - 3) Id⁺ Ag⁺ mające idiotypy wspólne z Ab₁ i wiążących się z antygenem, który naśladuje Ab₁.

JAN SALWA

REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE BY ANTIIDiotypic ANTIBODIES

Summary

One of possible mechanisms regulating the immune response is the idiotypic network proposed by Jerne. Idiotypes represent individual antigenicity of the immunoglobulin variable region. Such antibodies may be immunogenic and may elicit endogeneous synthesis of antiidiotypic antibodies. Also, lymphocytes possess idiotypic and antiidiotypic receptors on their surface and can recognize the idiootype on other lymphocytes. They create a network of interactions between T and B cells. Through these idiotypes regulation of the immune system may be created. In this paper, the idiotypic network and regulation of the immune response by antiidiotypic antibodies are discussed.

LITERATURA

1. Abbas A. K. — *Antigen on T lymphocyte mediated suppression of myeloma cells. Model systems for regulation of lymphocyte function.* Immunol. Rev. 48: 245—262, 1979.
2. Bona C. A., Heber-Katz., Paul E. — *Idiotypic — anti-idiotypic regulation. I. Immunization with a levan — binding myeloma protein leads to the appearance of auto-anti- (anti-idiotypic) antibodies and to the activation of silent clones.* J. Exp. Med. 153: 951—967, 1981.
3. Bona C. A., Victor-Kobrin C., Manheimer A. J., Bellon B., Rubinstein L. J. — *Regulatory arms of the immune network.* Immunol. Rev. 79. 25—44, 1984.

4. Bottomly K., Mosier D. E. — *Antigen specific helper T cells required for dominant idiotype expression are not H-2 restricted.* J. Exp. Med. 154: 411–417, 1981.
5. Brown A. R. — *In situ detection of autoanti-idiotype antibody-forming cells induced by Influenza Virus infection.* Cell Immunol. 139: 162–175, 1992.
6. Brucke C. M., Slaoui M. S., Gaulton G. N., Smith T., Fields B. N., Mullins J. I., Greene M. I. — *Nucleic acid sequence of an internal image-bearing monoclonal antiidiotype and its comparison to that of the external antigen.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6578–6584, 1986.
7. Hiernaux J. — *Antiidiotypic networks.* Federation Proc. 40: 1484–1488, 1981.
8. Jerne N. K. — *Towards a network theory of the immune system.* Ann. Immunol. (Paris). 125c: 373–389, 1974.
9. Jerne N. K. — *Idiotypic networks and other preconceived ideas.* Immunol. Rev. 79: 5–24, 1984.
10. Jerne N. K. — *The generative grammar of the immune system.* Science 229: 1057–1059, 1985.
11. Kim Y. T., Deblasio T., Thorbecke G. J., Weksler M. E., Sjskind G. W. — *Production of auto-antiidiotype antibody during the normal immune response. XIV. Evidence for the antigen-independent operation of the idiotype network.* Immunology 67: 191–196, 1989.
12. Köhler H. — *The immune network revisited.* [W:] *Idiotypy in Biology and Medicine.*, Academic Press. INC. (red. Köhler H., Urbain J.), Cazenave P. A. 3–4, 1984.
13. Kunkel M. G., Mannik H., Williams R. G. — *Individual antigenic specificity of isolated antibodies.* Science 140: 1218–1219, 1963.
14. Langman R. E., Cohn M. — *The complete idiotype network is an absurd immune system.* Immunology Today 7: 100–101, 1986.
15. Lynch R. G. — *Immunoglobulin — specific supressor T cells.* Advances in Immunology 40: 135–151, 1987.
16. Musaki H., Shirakawa Ch., Matsuda H., Morita S., Koyama A., Horiucki F., Hamazaki H., Fujimoto T., Maeda Y., Irimajiri K., Horiucki A. — *Induction of anti-idiotypic T cells through a network mechanism.* Immunol 30: 107–112, 1991.
17. Namara M. C., Köhler H. — *Idiotype-specific T helper cells.* [W:] *Idiotypy in Biology and Medicine.* Academic Press Inc. (reds. Köhler H., Urbain J.), Cazenawe P-A. 89–99, 1984.
18. Nisonoff A. — *Idiotypes: Concepts and applications.* J. Immunol. 147: 2429–2438, 1991.
19. Oudin J., Michel M. — *Une nouvelle forme d'allotypic des globulines du serum de lapin, apparemment liee a la fonction et a la specificite anticorps.* C. R. Seances Acad. 257: 805–808, 1963.
20. Paul W. E., Bona C. — *Regulatory idiotypes and immune networks a hypothesis.* Today 3: 230–232, 1982.
21. Perelson A. S. — *Immune network theory.* Immunol. Rev. 110: 5–36, 1989.
22. Raychaudhuri S., Saeki Y., Chen J. J., Köhler H. — *Tumor-specific idiotypes vaccines. III. Induction of T helper cells by anti-idiotype and Tumor Cells.* J. Immunol. 139: 2096–2102, 1987.
23. Rossi F., Guilbert B., Tonnelle C., Ternynck T., Fumoux F., Avrameas G., Kazatehkine M. D. — *Idiotypic interactions between normal human polyspecific IgG and natural IgM antibodies.* Eur. J. Immunol. 20: 2089–2094, 1990.
24. Rubinstein J. L., Bona C. A. — *Idiotype — antyidiotype network. II. Activation of silent clones by treatment at birth with idiotypes is associated with the expansion of idiotype specific helper T cells.* J. Exp. Med. 156: 506–511, 1983.

25. Urbain J., Wikler M., Fransses J. W., Collignon C. — *Idiotypic regulation of the immune system by the induction of antibodies against antiidiotypic antibodies*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5126–5130, 1977.
26. Urbain J., Wuilmart C., Cazenave P. A. — *Idiotypic regulation in immune networks*. Contemp. Topic Mol. Immunol 8: 113–117, 1981.
27. Uytelen Haag F. G. L. H., Bunschoten H., Weifer K., Osterhaus A. D. M. E. — *From Jenner to Jerne: Towards Idiotypic Vaccines*. Immunol. Rev. 90: 93–113, 1986.
28. Wikler H., Franssen J. W., Collignon C., Leo O., Mariame B., Walle P., Groote W., Urbain J. — *Idiotypic regulation of the immune system. Common idiotypic specificities between idiotypes and antibodies raised against anti-idiotypic antibodies in rabbits*. J. Exp. Med. 159: 184–187, 1979.

MARIA JANUSZ

Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda
Zakład Immunochemii
Wrocław

STRUKTURALNE I FUNKCJONALNE ZRÓŻNICOWANIE IMMUNOGLOBULIN

Bardzo istotnym elementem systemu immunologicznego żywych organizmów jest zdolność rozpoznania co jest „własne”, a co „obce”. Rozpoznanie obcej substancji — antygeny jest bodźcem do uruchomienia mechanizmów obronnych, tj. odpowiedzi humoralnej i komórkowej.

Cząsteczkami efektorowymi odpowiedzi humoralnej są immunoglobuliny. Do grupy tej należą białka mające aktywność przeciwciałową oraz białka podobne do przeciwciał pod względem struktury chemicznej i swoistości antygenowej.

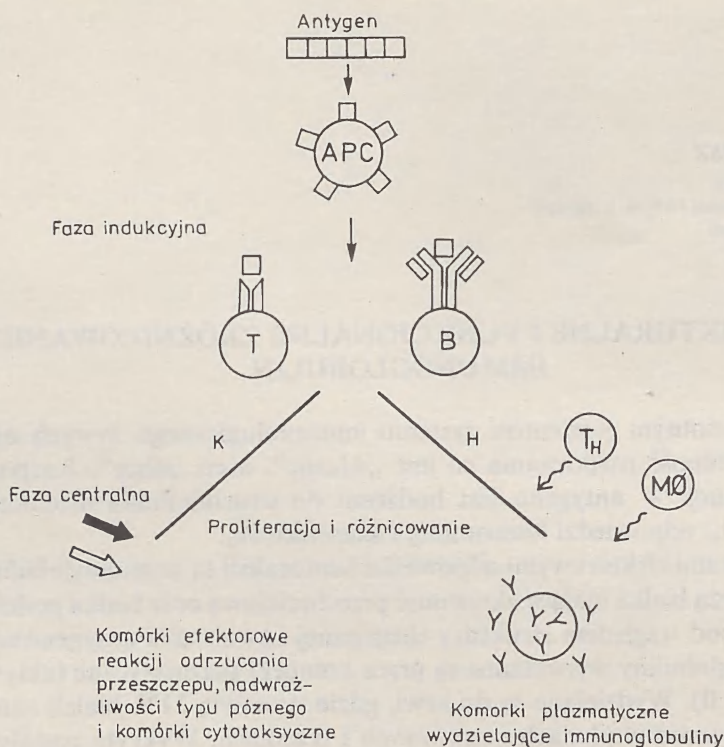
Immunoglobuliny wytwarzane są przez komórki plazmatyczne (aktywowane limfocyty B). Wydzielane są do krwi, gdzie stanowią 11% białek surowicy, obecne są również w płynach ustrojowych i tkankach. Wykryte zostały przez Emila von Behringa i Shibasaburo Kitsabato w 1890 roku. Od tego czasu stały się przedmiotem intensywnych badań, które doprowadziły do tego, że obecnie zaliczane są do grupy najlepiej scharakteryzowanych białek. Rozwój i znaczenie badań nad immunoglobulinami wymierzyć można przyznanymi nagrodami Nobla:

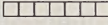
- 1901 r.: E. von Behring — wykrycie immunoglobulin,
- 1972 r.: G. M. Edelman i R. R. Porter — poznanie molekularnych i biochemicznych właściwości,
- 1984 r.: G. Kohler i C. Milstein — podstawy izolacji i produkcji przeciwciał monoklonalnych,
- 1987 r.: S. Tonegawa — molekularne podstawy zróżnicowania przeciwciał.

Poznanie struktury i właściwości immunoglobulin, genetycznych podstaw ich biosyntezy i zróżnicowania ma fundamentalne znaczenie dla wyjaśnienia molekularnych podstaw procesów odpornościowych, a opracowanie technologii produkcji przeciwciał monoklonalnych otwiera nowe możliwości w diagnostyce i terapii.

STRUKTURA IMMUNOGLOBULIN

Prototypowa cząsteczka immunoglobuliny zbudowana jest z dwu identycznych łańcuchów ciężkich (H) i dwu identycznych łańcuchów lekkich (L),

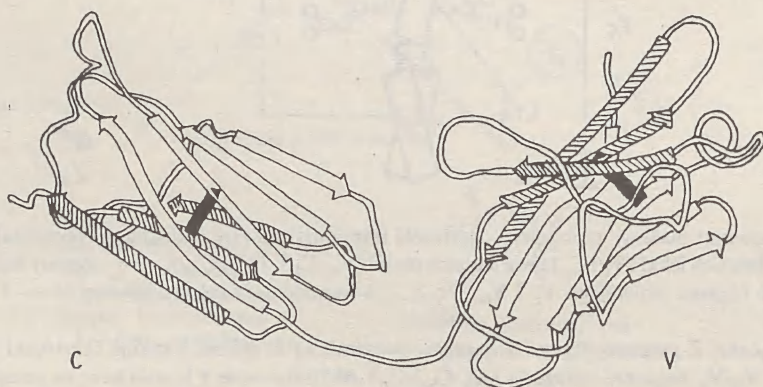


Rys. 1. Schemat odpowiedzi immunologicznej. Antygen w formie natywnej  lub po przetworzeniu  przez komórkę prezentującą antygen (APC) rozpoznawany jest przez swoiste receptory limfocytów T i B (faza indukcyjna). W centralnej fazie odpowiedzi humoralnej (H) na skutek współdziałania pomocniczych limfocytów (T_H) i makrofagów (MØ) poprzez bezpośredni kontakt komórka-komórka lub wydzielane przez nie mediatory $\rightsquigarrow$ limfocyty B podlegają proliferacji i różnicowaniu do komórek funkcjonalnych wydzielających przeciwciała. W procesie odpowiedzi komórkowej (K) pod wpływem antygenowo swoistych $\Rightarrow$ i antygenowo nieswoistych $\rightarrow$ czynników, limfocyty T proliferują i różnicują się do komórek efektorowych

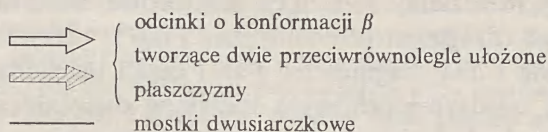
połączonych za pomocą mostków dwusiarczkowych w makromolekularny kompleks. Liczba mostków może być różna w zależności od klasy i podklasy oraz źródła pochodzenia. Immunoglobulina obserwowana w mikroskopie elektronowym ma kształt litery Y, kąt rozwarcia jej ramion może być różny dla różnych cząsteczek. Na końcach każdego z dwu ramion zlokalizowane jest miejsce wiążące. Cząsteczki immunoglobulin mogą występować w postaci monomerów lub mogą tworzyć trójkątne trimery, kwadratowe tetramery bądź pentagonalne pentamery.

Pod wpływem enzymów proteolitycznych, rozszczepiających cząsteczkę immunoglobuliny w specyficznych miejscach, dzielona jest ona na dwa podstawowe obszary funkcjonalne: Fab (antigen binding) i Fc (easily crystallized). Fragment Fab składa się z fragmentu łańcucha ciężkiego i łańcucha lekkiego,

Z poszczególnymi domenami związane są określone właściwości biologiczne. W obrębie regionu zmiennego łańcucha lekkiego i ciężkiego wyróżnia się jedną domenę V_L i jedną V_H , w regionie stałym łańcucha lekkiego jedną domenę C_L , w łańcuchu ciężkim 3–4 obszary globularne C_H . Z badań krystalograficznych i dyfrakcji rentgenowskiej wiadomo, że domeny V i C utworzone są z 7 przeciwrównolegle ułożonych odcinków o konformacji β tworzących dwie płaszczyzny utrzymywane za pomocą oddziaływań hydrofobowych i mostków dwusiarczkowych. W domenie regionu zmiennego łańcuch polipeptydowy zwinięty jest w dodatkową pętlę — region hiperzmienny wchodzący w skład miejsca wiążącego antygen [3, 14].

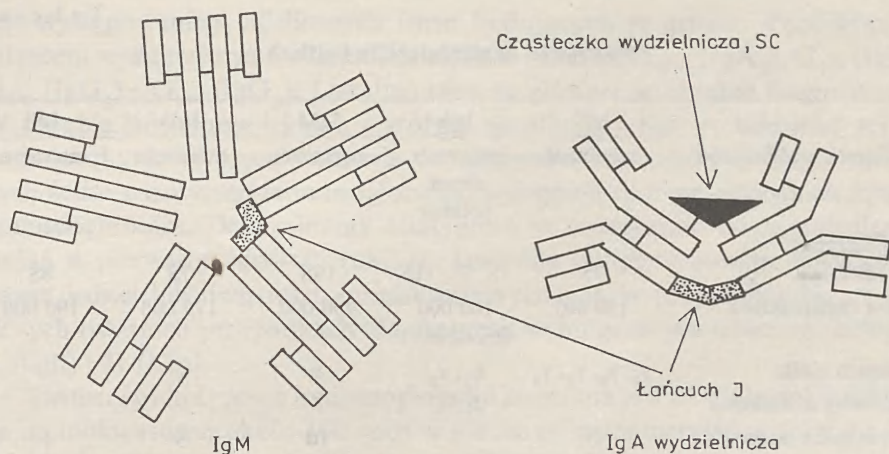


Rys. 3. Schemat budowy stałej i zmiennej domeny immunoglobulinowej



Pomiędzy domenami $C_{H1} - C_L$ a C_{H2} występuje region zawiasowy (hinge region). Pełni on między innymi rolę elastycznego łącznika pomiędzy fragmentem Fab a pozostałą częścią cząsteczki. Jego obecność zwiększa stopień swobody orientacji przestrzennej fragmentu Fab.

Cząsteczki immunoglobulin są glikoproteinami. Ilość reszt aminokwasowych będących akceptorami komponenty węglowodanowej (Asn-X-Ser) jest różna w różnych immunoglobulinach, zlokalizowane są głównie w obrębie regionu zawiasowego i domeny C_{H2} . Funkcjonalna rola komponenty węglowodanowej immunoglobulin nie jest dokładnie poznana. Uważa się jednak, że cukry odgrywają rolę w utrzymaniu struktury cząsteczki, syntezie i sekrecji, warunkują oporność na proteolizę, zwiększają rozpuszczalność w środowisku wodnym i modulują usuwanie z surowicy.



Rys. 4. Schemat budowy polimerycznych immunoglobulin

Oprócz form monomerycznych immunoglobuliny występują też w postaci dimerów (czasami trimerów lub polymerów), np. IgA lub pentamerów, np. IgM. Cząsteczką odpowiedzialną za polimeryzację jest łańcuch J. Sekwencja łańcucha J jest w nieznacznym stopniu spokrewniona z sekwencją domeny immunoglobulinowej, ma jednak zbliżoną strukturę drugorzędową. Nie jest dokładnie poznany mechanizm udziału łańcucha J w polimeryzacji IgA czy IgM, wiadomo jednak, że w procesie tym bierze udział jedna jego cząsteczka. W wydzielniczych IgA występuje dodatkowa glikoproteina – cząsteczka wydzielnicza (SC, secretory component). Początkowo rola SC wiązana była z ochronnym działaniem przed enzymatycznym trawieniem IgA w czasie przechodzenia z miejsca syntezy – warstwy podśluzówkowej gruczołu. Obecnie cząsteczka SC określana jest jako transmembranowa domena receptora poliimmunoglobulinowego [9].

RÓŻNORODNOŚĆ IMMUNOGLOBULIN (IZOTYPY, ALLOTYPY, IDIOTYPY)

Na podstawie struktury regionu stałego łańcucha ciężkiego immunoglobuliny zostały podzielone na główne grupy zwane klasami, które dalej dzielone są na podklasy. Immunoglobuliny poszczególnych klas różnią się właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. Przynależność do danej klasy czy podklasy determinowana jest więc rodzajem łańcucha H, jego stały region, powtarzający się u wszystkich osobników danego gatunku, określa izotyp immunoglobulin. Homologia sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi klasami ludzkich immunoglobulin wynosi około 30%. Obserwuje się również znaczne zróżnicowanie w zawartości reszt cukrowych. W obrębie danego gatunku immunoglobuliny poszczególnych klas mogą mieć tę samą

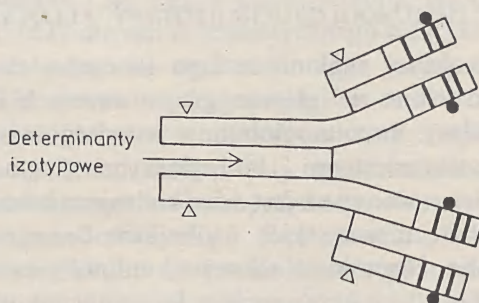
Tabela 1

Właściwości immunoglobulin ludzkich

Forma molekularna	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
	monomer	monomer dimer polimer	pentamer	monomer	monomer
Współczynnik sedymentacji	7S	7S, 9S, 11S	19S	7S	8S
Masa cząsteczkowa	150 000	160 000 (monomer)	950 000	175 000	190 000
Łańcuch ciężki	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_2, α_2	μ	δ	ϵ
Łańcuchy dodatkowe	—	J, SC	J	—	—
Zawartość cukrów (%)	3	7	10	9	13
Poziom w surowicy (mg/100 ml)	1250 ± 300	210 ± 50	125 ± 50	4	0.03
Wartościowość	2	2, 4	5, 10	2	2
Aktywacja dopełniacza:					
klasyczna	+	—	+	—	—
alternatywna	—	+	—	+	—
Wiązanie do komórek	makrofagi neutrofile trofoblasty łożyska	—	—	?	komórki tuczne

zdolność wiązania antygeny, różnią się jednak funkcjami efektorowymi. Łańcuchy ciężkie wszystkich izotypów immunoglobulin łączą się z tymi samymi łańcuchami lekkimi występującymi w formie κ lub λ . W formie natywnej cząsteczki immunoglobuliny zachowana jest zawsze jednorodność formy łańcucha lekkiego (κ_2 lub λ_2).

Zróznicowanie allotypowe immunoglobulin odzwierciedla swoistość antygenową immunoglobulin pewnych, ale nie wszystkich osobników danego gatunku. Dotyczy zarówno łańcuchów lekkich, jak i ciężkich, uwarunkowane



Rys. 5. Lokalizacja determinant izotypowych, allotypowych i idiotypowych na cząsteczce immunoglobuliny. ▽ determinanty allotypowe, ● determinanty idiotypowe, — regiony hiperzmiennie

jest występowaniem allelicznych form kodujących je genów. Typowymi alлотypami występującymi w łańcuchu ciężkim ludzi są: A_{2m} (IgA_2), G_{1m} (IgG_1), G_{2m} (IgG_2) i G_{3m} (IgG_3). Lokalizowane są głównie w obrębie fragmentu Fc. W obrębie łańcuchów lekkich wyróżnia się alлотypy Km — łańcuchy κ i Lm — łańcuchy λ . W przeciwieństwie do alлотypów łańcuchów ciężkich, związanych ściśle z izotypem immunoglobulin, występują one we wszystkich klasach immunoglobulin. Determinanty alлотypowe są przeważnie odzwierciedleniem zmian w pierwszorzędowej strukturze łańcucha polipeptydowego dotyczących nawet jednej lub dwu reszt aminokwasowych, jak w przypadku G_{1m} i G_{1m} . W tych ostatnich przypadkach dla ekspresji wymagana jest obecność łańcucha L (Gm) i H (Km).

Swoistość idiotypowa immunoglobulin związana jest z różnicami w sekwencji aminokwasowej około 100 reszt w obszarze zmiennym łańcuchów ciężkich i lekkich, głównie w obrębie regionu hiperzmiennego tworzącego miejsce wiążące antygen. Zmienność ta daje możliwość rozróżnienia ogromnej liczby cząsteczek różniących się sekwencją regionu V i jest podstawą różnorodności przeciwciał. Ekspresja większości determinant idiotypowych wymaga obecności obu łańcuchów — H i L. Idiotyp jest więc niepowtarzalną cechą danej cząsteczki przeciwciała pojedynczego osobnika. Jest produktem pojedynczego genu lub grupy genów ściśle spokrewnionych. Może być uważany za marker specyficznego klonu komórek produkujących przeciwciała [13, 14, 15].

BIOSYNTeza I ZRÓŻNICOWANIE IMMUNOGLOBULIN

Lokalizacja syntezy przeciwciał zależy od drogi wprowadzenia antygeny i jego właściwości. Miejscem biosyntezy większości przeciwciał są szpik kostny, śledziona, węzły limfatyczne, wyrostek robaczkowy, płuca. Do organów najbardziej aktywnych należą śledziona i węzły limfatyczne. W tych narządach na ogół wzrasta synteza γ -globulin nie będących przeciwciałami.

Komórkami produkującymi przeciwciała są limfocyty B. Pierwotnym organem ich neogenezy jest szpik kostny. Małe limfocyty stanowią 20–30% jądrzastych komórek szpiku. Są niedzielącymi się komórkami spoczynkowymi (G_0). Około 3 dni po powstaniu przenoszone są z krwiobiegu do śledziony i węzłów chłonnych. Cechą charakterystyczną odpowiedzi immunologicznej jest przekształcanie się komórek prekursorowych w komórki produkujące przeciwciała, rozprzestrzenianie się ich w organizmie i nabieranie przez nie pewnej specjalizacji w kierunku produkcji przeciwciał o określonej swoistości. Prekursorowe komórki B powstające w szpiku podlegają procesom dojrzewania, pojawiają się na ich powierzchni specyficzne markery, takie jak: IgM, FcR, MHC klasy II, receptory dla mitogenów. Najwcześniej pojawiającym się markerem jest IgM. Kontakt z antygenem aktywuje grupę komórek o określonej specyficzności do przejścia w cykl komórkowy i do podziałów. Prowadzi to do powstania efektorowych komórek wydzielających immunoglobuliny

i populacji komórek spoczynkowych, krążących w organach limfoidalnych, przygotowanych na ponowny kontakt z tym samym antygenem. Proces końcowego różnicowania się komórek kontrolowany jest przez wiele czynników uwalnianych przez komórki T lub monocyty, jak np. interleukiny. Specjalizacja komórek do produkcji przeciwciał o określonej swoistości nabywana jest podczas różnicowania komórek B z niepobudzonych prekursorów poprzez rearanżację segmentów genów V_H i V_L powierzchniowych IgM. Źródłem dodatkowego zróżnicowania są zmiany w obrębie genów łańcucha H. Rearanżacja w obrębie genów i somatyczne mutacje prowadzą do powstania około 10^{10} różnych specyficzności w obrębie jednego osobnika. Stwarza to praktycznie możliwość powstania przeciwciał przeciwko wszystkim istniejącym lub sztucznie utworzonym antygenom [6]. Specyficzność wiązania antygeny, będąca wynikiem identyfikacji regionów zmiennych łańcuchów lekkich i ciężkich IgM, jest sygnałem pobudzającym powstanie klonu komórek produkujących przeciwciała o określonej swoistości. Obowiązuje więc zasada zaprogramowania limfocytów jednego klonu do produkowania przeciwciał o jednej specyficzności. Wydzielane przeciwciała są kopią immunoglobuliny na powierzchni limfocytu.

Cytoplazma komórek produkujących przeciwciała obfituje w RNA i rybosomy, co świadczy o przystosowaniu ich do syntezy dużej ilości białka „na eksport”. Synteza łańcuchów ciężkich i lekkich cząsteczki immunoglobuliny zachodzi na oddzielnych polirybosomach. Łańcuch lekki ma zdolność autonomicznego uwalniania się z polirybosomów. Uwalnianie łańcucha ciężkiego zależy od obecności łańcucha lekkiego. Po zakończeniu syntezy łańcuchy przechodzą do siateczki endoplazmatycznej, gdzie odłączany jest peptyd sygnałowy i na drodze reakcji enzymatycznej dołączana komponenta węglowodanowa. Po przejściu przez aparat Golgiego, gdzie mogą zachodzić modyfikacje reszt cukrowych, wydzielane są na zewnątrz [3]. W siateczce endoplazmatycznej stwierdzono obecność BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) i jego kompleksów z niekompletnymi łańcuchami ciężkimi. Białko to reguluje posttranslacyjne losy łańcuchów ciężkich. Przyłączenie BiP do łańcucha H zapobiega jego wydzielaniu. BiP i łańcuch lekki współzawodniczą więc o wiązanie łańcucha ciężkiego [4].

Różnice w strukturze pierwszorzędowej znajdują swoje odzwierciedlenie w strukturze czwartorzędowej — podjednostkowej budowie cząsteczki immunoglobuliny. Sprowadza się to do różnicy w liczbie i rozmieszczeniu reszt cysteiny biorących udział w tworzeniu międzyłańcuchowych, a też wewnątrzdomenowych mostków dwusiarczkowych. Zachowany jest konserwatyzm liczby i lokalizacji mostków w obrębie klasy i podklasy oraz gatunku, nieco większą zmienność obserwuje się pomiędzy mostkami łączącymi łańcuchy ciężkie [3].

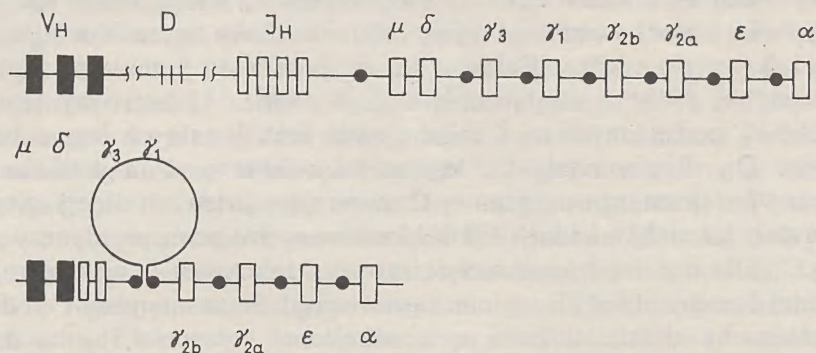
Jak już wcześniej wspomniano, system immunologiczny odznacza się zdolnością wytwarzania przeciwciał o bardzo zróżnicowanej specyficzności, skierowanych przeciwko prawie nieskończonej liczbie antygenów. Różnorodność ta jest wynikiem zmiennej sekwencji aminokwasowej regionów V. Dla

wytłumaczenia tak ogromnego zróżnicowania przyjmuje się dwa alternatywne modele: mutacji somatycznych i linii zarodkowych. W myśl teorii mutacji somatycznych poszczególne komórki mają ograniczony zasób informacji do produkcji przeciwciał, zróżnicowanie w obrębie regionu V jest wynikiem mutacji zachodzących podczas ontogenezy. Zgodnie z założeniami teorii linii zarodkowych przyjmuje się, że każdy limfocyt ma informację genetyczną do produkcji przeciwciał, zróżnicowanie regionów V w genomie zarodkowym jest wynikiem duplikacji i mutacji genowych podczas filogenezy. Fakt, że zmienność dotyczy regionu V, a nie C można wytłumaczyć tym, że regiony stałe i zmienne kodowane są przez niezależne geny.

W czasie rozwoju komórek produkujących przeciwciała jedna z wielu sekwencji regionu V łączy się z sekwencją regionu C, co prowadzi do powstania kompletnego genu kodującego immunoglobulinę. Poznanie struktury tego genu pozwoliło na wyjaśnienie molekularnych podstaw zróżnicowania immunoglobulin. Każdy region zmienny kodowany jest przez dwa lub trzy segmenty genowe, w przypadku łańcuchów κ i λ — V i J, w przypadku łańcuchów ciężkich — V, D i J. W poszczególnych segmentach znajdują się regiony = egzony (exons) kodujące określone odcinki łańcucha polipeptydowego, w tym regiony hiperzmiennne. Liczba segmentów genowych jest różna dla różnych łańcuchów (κ , λ i H) immunoglobulin różnych gatunków. Na przykład u myszy występuje kilkaset V_{κ} , cztery funkcjonalne J_{κ} , u ludzi około 80 V_{κ} i 5 J_{κ} . W przypadku łańcucha ciężkiego myszy całkowitą liczbę segmentów V_H określa się na kilkaset do tysiąca. Dzielone są na podstawie homologii sekwencji nukleotydowej (>80% identyczności) na 9 rodzin. U ludzi wyróżnia się 100–200 V_H podzielonych na 6 rodzin, sześć funkcjonalnych segmentów J_H i dziesięć D_H . Region stały każdego z łańcuchów immunoglobulinowych kodowany jest przez segment genowy C zawierający jeden lub więcej egzonów. Region stały łańcuchów lekkich κ lub λ kodowany jest przez pojedynczy egzon C_{κ} lub C_{λ} . Dla regionu łańcucha ciężkiego wyróżnia się 3–7 egzonów: jeden dla każdej domeny i 1–4 dla regionu zawiasowego. Segmenty genu C kodujące różne łańcuchy ciężkie ułożone są w określonej kolejności, np. u myszy: C_{μ} – C_{δ} – C_{γ_3} – C_{γ_1} – $C_{\gamma_{2b}}$ – $C_{\gamma_{2a}}$ – C_{ϵ} – C_{α} . W klonie komórek produkujących przeciwciała dany region zmienny łańcucha ciężkiego (kodowany przez egzon V–D–J) może być połączony z jednym z segmentów C_H . Ogromna różnorodność specyficzności przeciwciał jest rezultatem wykorzystania różnych segmentów genowych kodujących regiony zmienne, zróżnicowanie izotypowe — wynikiem wykorzystania różnych segmentów kodujących regiony stałe. Zastanawiając się nad mechanizmem zróżnicowania można wyróżnić następujące zjawiska: różnorodność segmentów genowych V, D i J w liniach zarodkowych, różne ich połączenia, mutacje somatyczne, czyli zamiana zasad w segmencie genowym pociągająca za sobą zmianę w sekwencji aminokwasowej przeciwciała, dołączenie dodatkowych nukleotydów, kombinację połączeń regionów zmiennych łańcucha ciężkiego i lekkiego tworzących miejsce wiążące antygen.

Podstawą molekularną zróżnicowania immunoglobulin jest rearanżacja kodujących je genów. Wyróżnić można dwa typy: rearanżację zachodzącą w prekursorowych lub nie pobudzonych komórkach B obejmującą segmenty genów kodujące zmienne regiony łańcuchów ciężkich i lekkich oraz rearanżację zachodzącą w aktywowanych komórkach B, obejmującą tylko geny łańcucha ciężkiego. W procesie dojrzewania, w pierwszej kolejności zachodzi rearanżacja segmentów regionu zmiennego łańcucha H. Jest to proces dwuetapowy, najpierw ma miejsce połączenie J_H-D , następnie dołączany jest segment V_H . W procesie rearanżacji segmentów genowych łańcuchów L, w pierwszej kolejności dochodzi do połączenia V_L-J_L , następnie V_L-J_L . Podczas łączenia segmentów genowych regionu zmiennego może następować dalsze różnicowanie w wyniku przecięcia rekombinujących segmentów w różnych miejscach bądź dołączenia dodatkowych nukleotydów.

Drugi typ rearanżacji odpowiedzialny jest za zjawisko „class switching” – wybór segmentu genowego regionu stałego. Proces ten zachodzi po stymulacji komórek B. Kompleks segmentów genowych $V_H-D_H-J_H$ przemieszczany jest do jednego z regionów C_H . Wybór regionu C_H odpowiedniego dla danego izotypu immunoglobulin – „isotypic exclusion” – może zachodzić na skutek delekcji segmentu genowego, np. C_{μ} , C_{δ} , C_{γ_1} , C_{γ_3} w przypadku syntezy γ_{2b} u myszy.

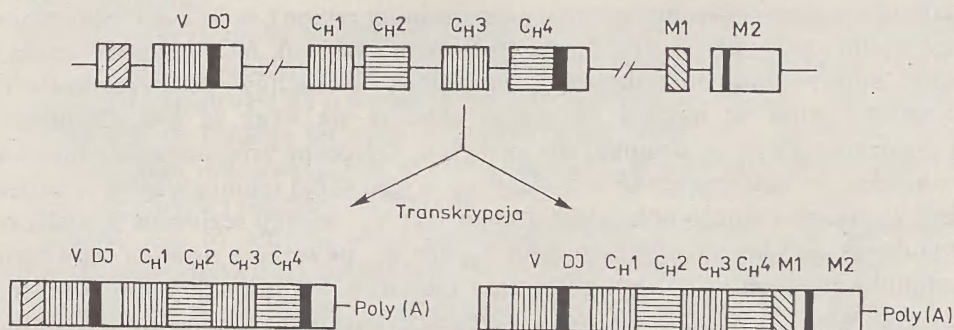


Rys. 6. Schemat rearanżacji w obrębie locus łańcucha ciężkiego. Wybór regionu C_H w przypadku syntezy γ_{2b} u myszy zachodzi na skutek delekcji segmentu genowego C_{μ} , C_{δ} , C_{γ_1} , C_{γ_3} , kompleks VDJ przemieszczony jest do regionu $C_{\gamma_{2b}}$

Na pojedynczej komórce wyrażany jest tylko jeden z dwu homologicznych chromosomalnych loci – „allelic exclusion”.

Końcowy etap różnicowania immunoglobulin to wybór jednej z dwu alternatywnych form ich występowania – sekrecyjnej lub membranowej. Immunoglobuliny membranowe (głównie monomeryczne IgM i IgD) różnią się od formy wydzielniczej C końcowym fragmentem łańcucha ciężkiego, który odpowiedzialny jest za zakotwiczenie w membranie komórkowej. Składa się on

z 41–72 reszt aminokwasowych, dzielony jest na trzy regiony: łączący się z końcową domeną C_H , hydrofobowy segment transmembranowy łączący się z lipidami membranowymi i C-końcowy fragment cytoplazmatyczny odpowiedzialny za przenoszenie sygnału do struktur wewnątrzkomórkowych. W procesie syntezy łańcucha ciężkiego immunoglobulin wydzielniczych i membranowych biorą udział różne formy mRNA pochodzące z tego samego genomu. C-końcowy segment formy membranowej ma jeden lub dwa dodatkowe egzony. Wybór formy wydzielniczej czy membranowej, determinowany jest w momencie transkrypcji. Ma miejsce kompetycja pomiędzy poliadenilacją a przyłączeniem egzonów kodujących formę membranową [5, 10, 12, 16, 19].



Rys. 7. Schemat syntezy wydzielniczej i membranowej formy IgM. M1 M2 – egzony specyficzne dla formy membranowej. Wybór formy, wydzielniczej czy membranowej, determinowany jest w momencie transkrypcji, zachodzi kompetycja pomiędzy poliadenilacją (polyA) a przyłączeniem egzonów M1 M2

Poznanie struktury immunoglobulin i genetycznych podstaw ich biosyntezy i różnicowania upoważniło do uznania domeny immunoglobulinowej za podstawową jednostkę strukturalną całej grupy białek warunkujących sprawność funkcjonowania układu immunologicznego (immunoglobulin superfamily). Na skutek duplikacji segmentu genu pierwotnego i kombinacji połączeń powstały struktury powierzchniowe komórek odpowiedzialne za rozpoznanie antygeny (receptory limfocytów T i B), elementy restrykcyjne (MHC klasy I i klasy II), markery powierzchniowe limfocytów (CD4 i CD8), cząsteczki adhezyjne (CD2, LFA-3), receptory dla immunoglobulin (poly IgR, FcγR [13].

BIOLOGICZNE FUNKCJE IMMUNOGLOBULIN

Podstawową funkcją systemu immunologicznego jest rozpoznanie i uniczywienie „obcego agenta”. Cząsteczkami efektorowymi obu etapów tego procesu są immunoglobuliny. Dwoistość funkcji przez nie pełnionych związana jest z przedstawionym powyżej zróżnicowaniem strukturalnym cząsteczki. Regiony zmienne odpowiedzialne są za rozpoznanie i wiązanie antygeny,

regiony stale oddziaływując z innymi cząsteczkami i/lub komórkami pełnią funkcje efektorowe, takie jak: aktywacja komplementu, interakcje z komórkowymi receptorami dla fragmentu Fc (FcR), kontrola katabolizmu. Poszczególne funkcje związane są z określonymi domenami.

WIĄZANIE ANTYGENU

Jak przedstawiono przy omawianiu domenowej budowy immunoglobulin, miejsce wiążące utworzone jest na skutek przestrzennego uformowania pętli peptydowych zawierających regiony hiperzmiennie łańcuchów ciężkich i lekkich. Struktura określana jest przez reszty tworzące region determinujący komplementarność (complementary determining region), w jej tworzeniu biorą też udział reszty regionu ramowego (framework region), reszty glicyny warunkują odpowiednie pofałdowanie fragmentów łańcuchów polipeptydowych. Kształt i wielkość miejsca wiążącego zmienia się wraz ze specyficznością i powinowactwem w stosunku do antygeny. Ogromne zróżnicowanie miejsca wiążącego — heterogenność wchodzących w jego skład aminokwasów — może być wynikiem różnego połączenia domen V_H i V_L , selekcji regionów V podczas tworzenia aktywnego segmentu genu V_H lub V_L , powstania nowych sekwencji aminokwasowych na skutek połączenia regionów V i mutacji somatycznych. Miejsce wiążące, w zależności od wiązanych determinant antygenowych, może mieć kształt kieszonki hydrofobowej (w przypadku małych antygenów w niej zagłębia się cząsteczka haptenu) lub nieregularnej, płaskiej płaszczyzny w przypadku antygenów białkowych. W momencie przyłączania antygeny następuje „dopasowanie” płaszczyzny miejsca wiążącego z powierzchnią antygeny (model „lock-and-key” lub „face-to-face”) [3, 13].

FUNKCJE EFEKTOROWE

Immunoglobuliny poszczególnych klas mogą wykazywać jednakową zdolność oddziaływania z przeciwciałem, różnią się funkcjami efektorowymi.

Głównymi przeciwciałami syntezowanymi podczas wtórnej odpowiedzi immunologicznej są IgG. Posiadają one zdolność oddziaływania ze swoistym receptorem na powierzchni komórek. Oddziaływanie z FcγR na makrofagach, komórkach tucznych i limfocytach odpowiedzialne jest za takie procesy jak: fagocytoza, cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC), uwalnianie mediatorów, specyficzna regulacja funkcji limfocytów. Na skutek przyłączania do swoistego receptora na trofoblastach, jako jedyna klasa immunoglobulin, transportowane są przez łożysko, co stanowi drogę przekazywania odporności z matki do płodu. Oddziałują również z receptorami na śluzówce jelita. IgG mają zdolność neutralizacji toksyn bakteryjnych, wiązania się do mikroorganizmów (wzmaganie ich fagocytozy) i aktywacji układu komplementu (droga klasyczna). Najszybciej, w porównaniu z innymi klasami immunoglobulin,

dyfundują do przestrzeni pozanaczyniowej, gdzie są najliczniej reprezentowane. Katabolizm regulowany jest całkowitym poziomem IgG w płynach ustrojowych. Nasilenie syntezy zależy od stymulacji antygenem.

Główną klasą immunoglobulin płynów wydzielniczych, takich jak: łzy, ślina, mleko, sok jelitowy są IgA. Oddziałują z receptorem polimimmunoglobulinowym na komórkach nabłonkowych organów wydzielniczych. Hamując proces adhezji mikroorganizmów do powierzchni śluzówki, pełnią rolę w obronie organizmu przed infekcjami bakteryjnymi. IgA obecne w dużej ilości w sianie i mleku związane są z przekazywaniem biernej odporności z matki do noworodka. Agregaty IgA biorą udział w alternatywnym szlaku aktywacji komplementu.

IgE wykrywane są w krążeniu w nieznacznych ilościach. Głównie występują na powierzchni komórek tucznych i bazofili mających na swojej powierzchni swoisty receptor ($Fc_\epsilon R$) o wysokim powinowactwie. Zasadnicza rola przypisywana IgE to funkcja łącznika pomiędzy komórkami oraz mediatora alergii i odporności przeciwapalnej przez pobudzanie wydzielania mediatorów stanów zapalnych i chemoatraktantów.

IgM jest to główna klasa immunoglobulin pojawiających się podczas pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała klasy IgM często obserwowane są w chorobach o podłożu autoimmunologicznym (np. czynnik reumatoidalny). IgM występują w dwu formach: monomeryczne, związane z membraną komórek i pentameryczne, w płynach ustrojowych. Pentameryczne, wydzielnicze IgM mają zdolność wiązania wielowartościowych antygenów bakteryjnych i wirusowych, biorą udział w pierwszym etapie obrony przeciwko infekcjom mikroorganizmów. Kompleksy IgM aktywują układ dopełniacza (droga klasyczna).

IgD występują w bardzo małej ilości w surowicy, obecne są na powierzchni dojrzałych limfocytów B. Stosunek ekspresji $\mu:\delta$ uważany jest za marker dojrzałości komórek B. Występujące równocześnie na powierzchni dojrzałych komórek B IgM i IgD mają taki sam region zmienny – taką samą zdolność wiązania antygeny. Powierzchniowe IgD mogą być uważane za receptor współdziałający w kontroli aktywacji i supresji limfocytów B [3, 13].

IMMUNOGLOBULINY JAKO ANTYGENY

Glikoproteinowe cząsteczki immunoglobulin podane innemu osobnikowi tego samego lub innego gatunku rozpoznawane są jako „obce” i stają się sygnałem do zapoczątkowania procesu odpowiedzi immunologicznej. Często utrudnia to stosowanie przeciwciał w terapii. Jak wynika ze struktury immunoglobulin, mają one wiele determinant antygenowych (epitopów) będących odzwierciedleniem sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (determinanty sekwencyjne) i konformacji cząsteczki (determinanty konformacyjne).

Antygenami mogą być immunoglobuliny wszystkich klas. Mają one swoiste determinanty dla danego izotypu łańcucha ciężkiego i lekkiego — determinanty izotypowe. Podając zwierzętom immunoglobuliny danej klasy obcego gatunku otrzymuje się poliwalentne surowice zawierające przeciwciała skierowane przeciwko epitopom swoistym dla danego izotypu łańcucha ciężkiego i łańcucha lekkiego kappa lub lambda, który jest wspólny dla różnych klas immunoglobulin. Na drodze absorpcji przeciwciał antyizotypowych za pomocą odpowiednich surowic można uzyskać reagenty specyficznie reagujące z łańcuchami lekkimi. Pomiędzy izotypami poszczególnych gatunków obserwuje się częściowe pokrewieństwo antygenowe.

Determinantami charakterystycznymi dla danego osobnika są determinanty allotypowe. Przeważnie są one odzwierciedleniem różnic w strukturze pierwszorzędowej łańcucha ciężkiego lub lekkiego. Częsteczka immunoglobuliny osobnika o określonych determinantach allotypowych może być immunogenem dla innego osobnika tego samego gatunku, u którego nie obserwuje się ich ekspresji.

Determinantami charakteryzującymi region zmienny cząsteczki immunoglobuliny są determinanty idiotypowe. Są one markerem cząsteczki immunoglobuliny danego osobnika. Lokalizowane są głównie w obrębie miejsca wiążącego antygen, dla ich ekspresji przeważnie wymagana jest obecność zarówno łańcucha ciężkiego, jak i lekkiego. Przeciwciała skierowane przeciwko determinantom idiotypowym można otrzymać przez immunizację innego osobnika tego samego gatunku. Specyficzny antygen lub hapten, wiążąc się do cząsteczki przeciwciała antyidiotypowego, może blokować reakcję pomiędzy determinantami idiotypowymi a skierowanymi przeciwko nim przeciwciałami. Przeciwciała antyidiotypowe mogą modulować ekspresję określonego typu immunoglobulin, odgrywają rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej (network theory) [3].

RECEPTOR ANTYPGENOWY LIMFOCYTÓW B

Istnienie przeciwciał na powierzchni komórek — nazwanych łańcuchami bocznymi — zaproponował Ehrlich już w roku 1900, co oparte było bardziej na znakomitej, jak się okazało, intuicji tego badacza, niż na materiale doświadczalnym. „Teoria łańcuchów bocznych” Ehrlicha, uważana potem przez wiele lat za naiwną, odżyła w nowoczesnej formie w świetle wyników badań prowadzonych w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych.

Cząsteczki immunoglobulin na powierzchni limfocytów jako struktury rozpoznające antygeny postulowane są w teorii klonalnej selekcji. W myśl jej założeń każdy limfocyt ma genetyczną informację do wyprodukowania jednego rodzaju przeciwciał. Cząsteczki takie wbudowywane są w błonę komórkową jako receptory. Na różnych limfocytach są różnego rodzaju receptory, tak że pula limfocytów organizmu reprezentuje szerokie spektrum swoistości. Antygen może łączyć się ze swoistym dla siebie przeciwciałem na powierzchni

komórki prekursorowej, co prowadzi do różnicowania i podziałów. W wyniku tego powstaje klon komórek syntezujących przeciwciała o takiej swoistości jaką miały przeciwciała rozpoznające antygen.

Jak już wcześniej wspomniano, podstawową funkcją układu immunologicznego jest rozpoznanie obcej struktury i pobudzenie reakcji mogących prowadzić do jej wyeliminowania. Za rozpoznanie odpowiedzialne są receptory antygenowe limfocytów T i B — TCR i immunoglobuliny, głównie IgM i IgD. Są to białka wykazujące pewne podobieństwa strukturalne — oba należą do rodziny białek immunoglobulinowych, zbudowane są z łańcuchów mających regiony stałe i zmienne, odcinki zewnątrzkomórkowe, transmembranowe i wewnątrzcytoplazmatyczne.

Antygen swoiście rozpoznawany przez receptor immunoglobulinowy limfocytów B przedostaje się do wnętrza komórki (ulega endocytozie w połączeniu z cząsteczką immunoglobuliny) gdzie poddawany jest procesom przetwarzania i ponownie transportowany jest na powierzchnię komórki B w formie typowej dla komórek prezentujących antygen, czyli związany z cząsteczką MHC klasy II. Zdolność prezentowania antygeny przez limfocyty B znacznie przewyższa antygenowo niespecyficzne komórki prezentujące np. makrofagi. Receptory immunoglobulinowe, swoiście reagując z antygenem, mają zdolność koncentrowania go na powierzchni komórki, dla zapoczątkowania procesu odpowiedzi wystarczające są tysiąc, a nawet dziesięć tysięcy razy mniejsze dawki antygeny. Siciowanie receptorów immunoglobulinowych przez antygen jest źródłem sygnału aktywującego przekazywanego do wnętrza komórki.

Funkcja receptora immunoglobulinowego związana jest ściśle z jego budową. Za rozpoznanie i wiązanie antygeny odpowiedzialny jest zewnątrzkomórkowy fragment utworzony z dwu łańcuchów lekkich i dwu transmembranowych łańcuchów μ lub δ . W jego obrębie zlokalizowane jest miejsce wiążące. Transmembranowy fragment, połączony niekowalencyjnie z kompleksem przypominającym CD3 receptora limfocytów T, odgrywa rolę w przesyłaniu sygnału. W kompleksie membranowym ludzkich i mysich immunoglobulin wykazano obecność dwu łańcuchów α i β , połączonych w heterodimer za pomocą mostków dwusiarczkowych. Tworzą one otoczkę okalającą transmembranowy odcinek łańcucha ciężkiego, wchodzące w jego skład aminokwasy hydrofobowe odpowiedzialne są za zakotwiczenie na powierzchni komórki. Wykazano, że membranowe IgM pozbawione łańcucha α ulegają wewnątrzkomórkowej degradacji. Heterodimer $\alpha\beta$ może być uważany za rdzeniowe białko proreceptora immunoglobulinowego. Strukturalne różnice pomiędzy powierzchniowymi IgM, IgD, IgG i IgA mogą sugerować, że połączone one są z różnymi systemami przesyłającymi sygnały. Przypuszcza się, że dla każdej klasy immunoglobulin może być izotypowo specyficzna podjednostka α i wspólny łańcuch β . Jednak są też dane przemawiające za tym, że heterodimer $\alpha\beta$ jest wspólny, a różnicowanie izotypowe jest wynikiem różnego stopnia glikozylacji łańcucha α [2, 8, 18].

Ilość oraz rodzaj poszczególnych klas immunoglobulin na powierzchni limfocytów B zależy od stanu rozwojowego komórki, immunoglobuliny powierzchniowe mogą więc być uważane za markery różnicowania. Komórki prekursorowe w pierwszym okresie życia zarodkowego myszy (pre-B cells) mają na swojej powierzchni tylko łańcuch μ , około dziewiątego tygodnia pojawiają się kompletne cząsteczki IgM, następnie wykrywane są limfocyty IgM^+IgD^+ oraz w niewielkiej ilości IgM^+IgG^+ , IgM^+IgA^+ lub IgM^+IgE^+ (10–12 tyg.). 3–6 dni po urodzeniu 90% limfocytów B myszy ma na swojej powierzchni IgM. Przyjmuje się, że na limfocycie B może być 10^5 cząsteczek immunoglobulin. Na poszczególnych etapach różnicowania limfocytów B obok immunoglobulin powierzchniowych pojawiają się receptory dla czynników pochodzących z limfocytów T, aktywujących spoczynkowe komórki B, wzrost komórek aktywowanych, różnicowanie się do komórek wydzielających przeciwciała i pobudzających sekrecję immunoglobulin (BSF-1/IL-4, BCGFII/IL-5, BCDF/BSF-2/LL-6). Ponad 80% IgM-pozytywnych limfocytów B jest równocześnie IgD^+ . Występujące równocześnie IgM i IgD mają jednakowy idiotyp, a więc przez ten sam klon mogą być produkowane przeciwciała o takiej samej swoistości, ale należące do różnych klas. Obecność określonych izotypów immunoglobulin na powierzchni limfocytów B jest odzwierciedleniem ich stanu funkcjonalnego. Na komórkach spoczynkowych obecne są równocześnie IgM i IgD. Stymulacja tych komórek antygenem powoduje zmianę fenotypu, główną formą membranową stają się IgM. Na powierzchni komórek pamięciowych występują IgG o takich właściwościach jak syntezowane i wydzielane, co ma ważne znaczenie dla zachowania informacji o swoistości na dany antygen — pamięć immunologiczna [1, 6, 7].

Chociaż immunoglobuliny należą do najlepiej poznanych białek i wciąż są przedmiotem intensywnych badań, to te podstawowe regulatory układu immunologicznego wciąż pozostawiają badaczom wiele tajemnic do odkrycia.

MARIA JANUSZ

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF IMMUNOGLOBULINS

S u m m a r y

Immunoglobulins are built up of two identical heavy and two identical light polypeptide chains. Each chain is made up of one variable and a few constant regions. These proteins, members of the immunoglobulin superfamily, share the so-called immunoglobulin domain. Pepsin splits the molecule into the F(ab')_2 fragment with an antigen binding function and the Fc fragment with effector functions such as complement binding and binding to cell surface receptors.

Isotypes of immunoglobulins generally define constant region determinants; allotypes refer to determinants encoded by one allele of a given immunoglobulin gene; idiotypic determinants are confined to the variable portion of the molecule.

One of the most interesting questions about immunoglobulins is the source of immense variation expressed in antibody binding specificity. The molecular basis of immunoglobulin diversity is rearrangement of immunoglobulin genes encoding heavy and light chains.

Immunoglobulins with a unique specificity are synthesized and secreted by B lymphocytes. This specificity is determined by the presence of immunoglobulin receptors on the cell surface.

The current view on the structure of immunoglobulins and on the genetic basis of their differentiation are presented. Biological and effector functions of immunoglobulins are also discussed.

LITERATURA

1. Burrows P. D., Cooper M. D. — *Regulated expression of cell surface antigens during B cell development*. Seminars in Immunology 2: 189–195, 1990.
2. Cambier J. C., Campbell K. S. — *Signal transduction by B lymphocyte receptors: structure-function relationships of membrane immunoglobulins and associated molecules*. Seminars in Immunology 2: 139–149, 1990.
3. Hasemann Ch. A., Capra J. D. — *Immunoglobulins: structure and function*. [W:] *Fundamental Immunology*, wyd. 2, s. 209–233, (Paul W. E. red.), Raven Press, N. York, 1989.
4. Hendershot L., Bole D., Kearney J. F. — *The role of immunoglobulin heavy chain binding protein in immunoglobulin transport*. Immunol. Today 8: 111–114, 1987.
5. Honjo T. — *Immunoglobulin genes*. Ann. Rev. Immunol. 1: 499–528, 1983.
6. Janusz M. — *Immunoglobuliny powierzchniowe*. Post. Hig. Med. Dośw. 36: 317–344, 1982.
7. Kishimoto T., Hirano T. — *B-lymphocyte activation, proliferation, and immunoglobulin secretion*. [W:] *Fundamental Immunology* wyd. 2, s. 385–411, (Paul W. E. red.) Raven Press, N. York 1989.
8. Koning F. — *Lymphocyte antigen receptors: a common design?* Immunol. Today 12: 100–101, 1991.
9. Kühn L. C., Kraehenbuhe J.-P. — *The membrane receptor for polymeric immunoglobulin is structurally related to secretory component*. J. Biol. Chem. 256: 12490–12495, 1981.
10. Max E. E. — *Immunoglobulins: molecular genetics*. [W:] *Fundamental Immunology*, wyd. 2, s. 235–290, (Paul W. E. red.) Raven Press, N. York 1989.
11. Osmond D. G. — *B cell development in the bone marrow*. Seminars in Immunology 2: 173–180, 1990.
12. Pascual V., Capra J. D. — *Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism and expression*. Adv. Immunol. 49: 1–64, 1991.
13. Roitt I. M. — *Essential Immunology*, wyd. 6, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1988.
14. Rosen F. S., Steiner L. A., Unanue E. R. — *MacMillan Dictionary of Immunology*, The Macmillan Press Ltd., 1989.
15. Śłopek S. — *Immunoglobuliny*. [W:] *Immunologia*. s. 45–65, (Mackiewicz S. red.) PZWL, Warszawa, 1986.
16. Wall R., Kuehl M. — *Biosynthesis and regulation of immunoglobulins*. Ann. Rev. Immunol. 1: 393–422, 1983.
17. Williams A. F., Barclay A. N. — *The immunoglobulin superfamily — domains for cell surface recognition*. Ann. Rev. Immunol. 6: 381–405, 1988.
18. Venkitaraman A. R., Williams G. T., Dariavach P., Neuberger M. S. — *The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes*. Nature 352: 777–781, 1991.
19. Yancopoulos G. D., Alt F. W. — *Regulation of the assembly and expression of variable-region genes*. Ann. Rev. Immunol. 4: 339–368, 1986.

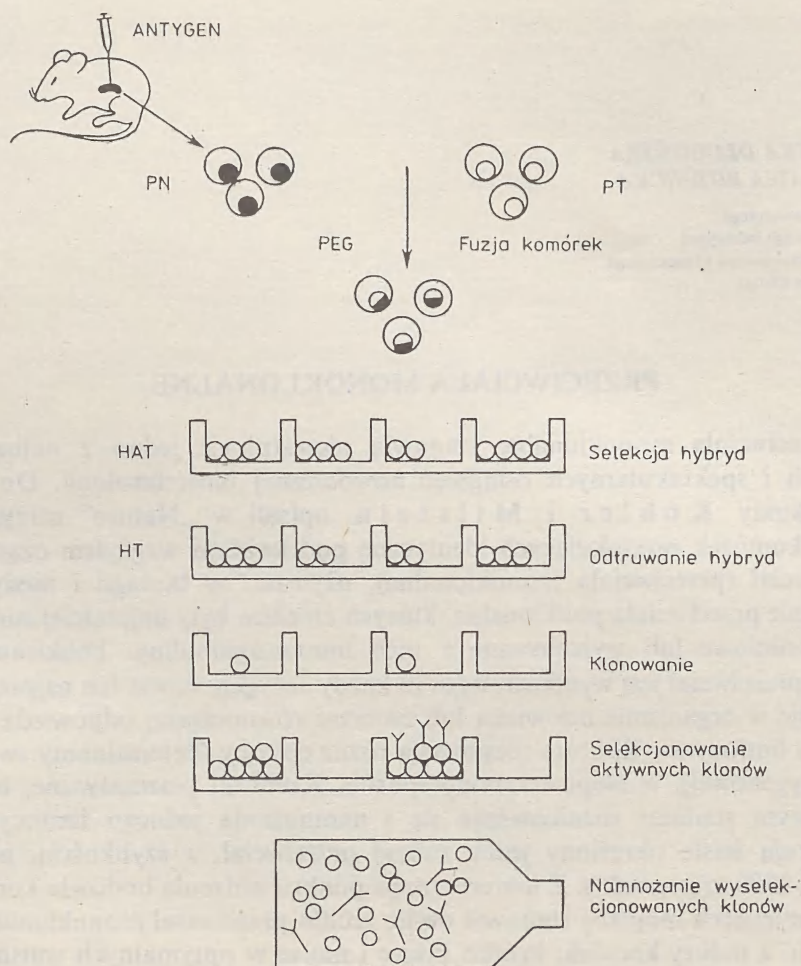
HENRYKA DŁUGOŃSKA
WIESŁAWA RUDNICKA

Katedra Immunologii
Zakład Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Przeciwciała monoklonalne stanowią niewątpliwie jedno z najbardziej cennych i spektakularnych osiągnięć nowoczesnej biotechnologii. Do roku 1975, kiedy Köhler i Milstein opisali w „Nature” otrzymanie klonu komórek produkujących identyczne pod każdym względem cząsteczki przeciwciał (przeciwciała monoklonalne), używano w biologii i medycynie wyłącznie przeciwciała poliklonalne, których źródłem były najczęściej surowice odpornościowe lub wyizolowane z nich immunoglobuliny. Poliklonalność takich przeciwciał jest wynikiem tego, że każdy antygen, nawet ten najprostszy, indukuje w organizmie człowieka lub zwierząt równoczesną odpowiedź wielu klonów limfocytów B, które rozpoznają różne epitopy (determinanty swoistości antygenowej), w niepowtarzalny sposób. Komórki plazmatyczne, będące końcowym stadium różnicowania się i namnażania jednego limfocyta B, produkują ściśle określony jeden rodzaj przeciwciał, z szybkością, jak się ocenia, 2000 cząsteczek/s. Z teoretycznego punktu widzenia hodowla komórek plazmatycznych mogłaby stanowić obfite źródło przeciwciał monoklonalnych, ale są to z natury komórki krótko żyjące i nawet w optymalnych warunkach hodowli przeżywają nie dłużej niż 6 tygodni. Köhler i Milstein przełamali to ograniczenie, poddając fuzji naturalne komórki plazmatyczne, pobrane od uodpornionych myszy, z komórkami plazmatycznymi nowotworowymi (myeloma, plasmocytoma). W ten sposób otrzymali komórki hybrydowe (hybrydoma) — mieszańce, które zespoliły dwie najważniejsze cechy obu komórek wyjściowych, tj. zdolność produkowania przeciwciał swoście reagujących z antygenem, który był użyty do uodporniania (immunizacji) myszy, oraz właściwość namnażania się w sposób nieograniczony w warunkach *in vivo* lub *in vitro*. Od czasu epokowej pracy Köhlera i Milsteina obserwuje się lawinowy rozwój badań nad opracowaniem jak najdoskonalszych technik otrzymywania przeciwciał monoklonalnych — mAb (mAb — monoclonal antibody czyli monoklonalne przeciwciało). Jednak idea pierwotnej metody powyższych autorów oraz schemat pracy pozostały do dziś takie same.

Biotechnologia przeciwciał monoklonalnych obejmuje następujące etapy, które zilustrowano na rys. 1:



Rys. 1. Schemat otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. PN — komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała (Y), PT — komórki plazmatyczne nowotworowe, PEG — glikol polietylenowy, HAT — podłoże z dodatkiem hipoksantyny, aminopteryny i tymidyny, HT — podłoże z dodatkiem hipoksantyny i tymidyny

1. Przygotowanie komórek do fuzji.

a) Uodpornienie zwierząt określonym antygenem w celu wytworzenia komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała o pożądanej swoistości w stosunku do antygeny.

b) Dobór linii rakowej plasmocytoma, reklonowanie jej i namnożenie aktywnego klonu.

2. Fuzja komórek *in vitro*.

3. Selekcja hybryd w podłożu HAT (podłoże z dodatkiem hipoksantyny, aminopteryny i tymidyny).

4. Badanie płynów z hodowli na obecność przeciwciał o oczekiwanej swoistości.

5. Odtruwanie hybryd w podłożu HT (podłoże z dodatkiem tylko hipoksantyny i tymidyny).

6. Klonowanie pozytywnych kultur.

7. Namnażanie aktywnych klonów.

8. Zabezpieczanie uzyskanych klonów przez zamrażanie w ciekłym azocie.

9. Produkcja dużych ilości mAb, *in vitro* lub *in vivo*.

10. Precyzyjne określenie swoistości otrzymanych przeciwciał monoklonalnych.

Proces fuzji poprzedza uodpornienie zwierząt, najczęściej myszy lub szczurów, określonym antygenem. Od osobników, które wyjątkowo dobrze odpowiedziały na dany antygen, czego wskaźnikiem jest wysoki poziom swoistych przeciwciał w pobranej od nich surowicy, izoluje się śledzoną. Jest ona źródłem naturalnych komórek plazmatycznych (PN). W zależności od gatunku i szczepu uodpornianych zwierząt dobiera się odpowiednią linię komórek nowotworowych plazmatycznych PT (T — tumor). Linia ta powinna charakteryzować się następującymi właściwościami:

1) wywodzić się z tego samego lub blisko spokrewnionego szczepu i gatunku zwierząt, od którego izoluje się śledzoną,

2) rosnąć w postaci zawiesiny (komórki nieadherentne),

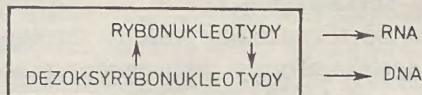
3) mieć krótki okres duplikacji i małe wymagania odżywcze,

4) nie mieć zdolności syntezy nukleotydów na drodze alternatywnej z powodu braku odpowiednich enzymów — HGPRT (fosforybozylotransferaza hipoksantyno-guaninowa) i (lub) TK (kinaza tymidynowa). Mutacje w zakresie tych enzymów uniemożliwiają komórkom wzrost w podłożu z aminopteryną, która blokuje główny szlak syntezy nukleotydów w komórce (rys. 2).

Alternatywna droga biosyntezy

HIPOKSANTYNA + PRDP $\xrightarrow{\text{HGPRT}}$

TYMIDYNA + ATP $\xrightarrow{\text{TK}}$



Blokowanie przez

AMINOPTERYNĘ

puryny

pirymidyny

Główna droga biosyntezy

Rys. 2. Dwie drogi syntezy rybonukleotydów i dezoksyrybonukleotydów. PRDP — fosforybozylodwufosforan, ATP — adenozynotrójfosforan, HGPRT — fosforybozylotransferaza hipoksantynowa, TK — kinaza tymidynowa

Fuzję komórek plazmatycznych prawidłowych i nowotworowych przeprowadza się *in vitro* w środowisku czynników zwiększających częstotliwość spontanicznych fuzji komórkowych, najczęściej w środowisku glikolu polietylenowego (PEG) o masie cząsteczkowej 1000–10 000 Da, często z dodatkiem dwumetylosulfotlenku (DMSO). Czynnikiem indukującym zlewanie się komórek może także być pole elektryczne o określonych parametrach.

Wynikiem fuzji komórek są hybrydy homokariotyczne PN/PN i PT/PT, ale również te pożądane hybrydy heterokariotyczne PN/PT. Komórki po fuzji przenosi się do mikropłytek zawierających podłoże HAT w celu selekcji otrzymanych hybryd. Czynnikiem selekcyjnym jest aminopteryna, która jako antagonistka kwasu foliowego hamuje w komórkach główną drogę syntezy kwasów nukleinowych z nukleotydów (rys. 2). Komórki plazmatyczne nowotworowe, jako defektywne mutanty w zakresie HPGR^T i (lub) TK, nie mogą wykorzystać obecnych w podłożu hodowlanym hipoksantyny i tymidyny do syntezy kwasów nukleinowych na drodze alternatywnej. Komórki takie po krótkim czasie obumierają. Powolnemu obumieraniu ulegają również komórki śledziony, jako komórki krótko żyjące lub komórki wymagające do rozwoju specjalnych stymulatorów (antygen, interleukiny). Namnażają się natomiast hybrydy heterokariotyczne PN/PT, u których doszło do komplementacji genomów i które po komórkach PT odziedziczyły zdolność nieograniczonego namnażania się, zaś od komórek śledziony uzyskały zdolność syntezy HPGR^T i TK. Mikrohodowle komórek poddawanych fuzji ogląda się w mikroskopie inwersyjnym. Wybiera się takie mikrohodowle, w których stwierdza się wzrost hybryd w postaci komórek dużych rozmiarów (7–15 μm), charakterystycznych dla komórek plasmocytoma. Podłoże z wybranych hodowli sprawdza się na obecność przeciwciał reagujących z interesującym, użytym do uodporniania zwierząt antygenem. Hybrydy z pozytywnych mikrohodowli przenosi się do podłoża HT, w którym następuje ich „odtruwanie”, tj. pozbywanie się resztek aminopteryny wewnątrzkomórkowej.

Do sprawdzania obecności przeciwciał w podłożach z hodowli hybryd stosuje się różnorodne metody serologiczne, począwszy od immunodyfuzji, immunoelektroforezy, immunoenzymatycznej sorpcji (ELISA), poprzez test rozetowy aż do metod radioimmunologicznych (RIA).

Dalszy etap w biotechnologii przeciwciał monoklonalnych, to klonowanie otrzymanych hybryd, czyli wyprowadzanie klonów wywodzących się z jednej macierzystej komórki hybrydowej. Stosuje się tu metodę ograniczających rozcieńczeń (cloning by limiting dilution), technikę izolowania kolonii hybryd rozwijających się w miękkim agarze lub metodę izolowania pojedynczych komórek pod mikroskopem z zastosowaniem mikromanipulatorów. Namnażanie hybryd, zwłaszcza na początku, wspomaga się dodatkiem do hodowli komórek „odżywiających” (feeder cells), które produkują czynniki wzrostowe dla hybryd. Dla bezpieczeństwa komórki „odżywiające” napromienia się, aby zapobiec ich proliferacji.

Otrzymywane klony komórkowe różnią się zarówno pod względem stabilności, jak i wydajności w produkcji przeciwciał. W czasie pierwszych podziałów heterokarionów (zwykle między 5 a 20 generacją) następuje często utrata chromosomów, w tym i tych noszących geny kodujące syntezę immunoglobulin. Niektóre klony, mimo reklonowania, nie osiągają nigdy pożądaney stabilności, inne produkują przeciwciała mało wydajnie. Ani jedno ani drugie nie mogą być technologicznie wykorzystane. Natomiast wyselekcjonowane klony poddaje się intensywnemu namnażaniu i zabezpiecza się je przed utratą (np. w skutek zakażenia) przez zamrażanie w ciekłym azocie.

Duże ilości przeciwciał monoklonalnych można otrzymać dwiema metodami:

1. *In vivo*.

Zwierzętom (zwykle myszom lub szczurom) dootrzewnowo wstrzykuje się Pristane (2, 6, 10, 14-tetra-metylo-pentadekan) lub niekompletny adiuwant Freund'a, a następnie również dootrzewnowo wprowadza się $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ komórek hybrydowych. Powoduje to powstanie nowotworu wysiękowego. Zbierany sukcesywnie otrzewnowy płyn wysiękowy (ascites fluid) stanowi obfite źródło mAb.

2. *In vitro*.

Hybrydy hoduje się w tankach o różnej pojemności (nawet do kilku tysięcy litrów) w podłożach odżywczych, zwykle bez dodatku surowic. Podłoże pohodowlane stanowi materiał do otrzymywania surowego, a następnie oczyszczonego preparatu mAb.

Metoda *in vivo* jest obarczona kilkoma zasadniczymi wadami. Otrzymany płyn wysiękowy, mimo że zawiera dużo monoklonalnych immunoglobulin (nawet do 20 mg w 1 ml), jest zanieczyszczony innymi immunoglobulinami, białkami surowicy, często zainfekowany, sama zaś metoda jest kłopotliwa, mało powtarzalna, a co najistotniejsze — nie można jej stosować u ludzi do produkcji ludzkich mAb. Stężenie przeciwciał w podłożu pohodowlanym w metodzie *in vitro* jest co prawda niższe (do 200 μg w 1 ml), ale wyprodukowane monoklonalne immunoglobuliny można łatwo wyizolować, a surowy produkt odznacza się dużą czystością. Biorąc pod uwagę, że koncentracja mAb w płynie wysiękowym wynosi średnio 5 mg/ml, od jednej myszy można otrzymać średnio 10 ml płynu wysiękowego, a straty podczas oczyszczania wynoszą około 50%, to przygotowanie 1 kg mAb metodą *in vivo* wymaga użycia około 40 000 myszy. Taką samą ilość preparatu można otrzymać z 5000 l hodowli hybryd w podłożach (metoda *in vitro*).

Najtrudniejsze i najbardziej pracochłonne jest precyzyjne określenie swoistości posiadanych mAb, tzn. poznanie epitopów antygenowych, z którymi one reagują. Zazwyczaj mAb o wąskim zakresie swoistości są wyżej cenione niż mAb reagujące z epitopami występującymi w różnych, często zupełnie niepokrewnych substancjach lub organizmach. Charakterystyka mAb wymaga użycia precyzyjnych metod badawczych. Wzór swoistości mAb skierowanych

przeciwko antygenom powierzchniowym komórek często określa się metodą immunofluorescencji, wykorzystując do tego celu cytofluorometrię przepływową. Do ustalenia swoistości mAb przeciwko antygenom rozpuszczalnym wykorzystuje się powszechnie metodę „western-blotting”, w której reakcji z mAb poddaje się dokładnie rozfrakcjonowane antygeny, zaś o obecności powstających swoistych kompleksów antygen–przeciwciała wnioskuje się na podstawie wyników bardzo czułych metod, w których stosuje się przeciwciała znakowane enzymami (metody immunoenzymatyczne).

ZASTOSOWANIE mAb W BADANIACH PODSTAWOWYCH

Trudno przecenić znaczenie monoklonalnych przeciwciał. Stały się one bowiem niezwykle cennym narzędziem badawczym w wielu dziedzinach nauki, nie tylko immunologii czy naukach biologicznych lub medycznych, ale wszędzie tam, gdzie interesująca nas substancja, albo w formie natywnej, albo po jej spreparowaniu, wykazuje właściwości antygenowe.

Przeciwciała monoklonalne pozwalają bardzo precyzyjnie badać znane oraz odkrywać nowe struktury drobnoustrojów (bakterie, wirusy, pasożyty zwierzęce) i poznawać ich rolę czy to w patologii chorób zakaźnych, czy też w procesach życiowych drobnoustrojów wykorzystywanych w praktyce. Precyzję reakcji mAb ze swoistymi epitopami wykorzystuje się do śledzenia zmian antygenowych, jakim ulegają drobnoustroje, zwłaszcza wirusy, np. wirusy grypy. Możliwość uchwycenia tych, często tylko śladowych zmian we właściwościach antygenowych wirusów, jest niezwykle przydatna w badaniach epidemiologicznych. Pozwala bowiem szybko identyfikować wirusy pojawiające się na danym terenie i podejmować odpowiednią akcję profilaktyczną, łącznie z szybką produkcją szczepionki, która byłaby skuteczna przeciwko nowej formie antygenowej wirusa. Jest to konieczne, gdyż często szczepionka przygotowana przeciwko wirusowi np. grypy, który był powodem wcześniejszej epidemii, nie chroni przed zachorowaniem wywołanym wirusami będącymi przyczyną świeżo obserwowanej epidemii, ze względu na zmienione właściwości antygenowe wirusów.

Wprowadzenie techniki mAb, pozwoliło wykryć charakterystyczne antygeny różnorodnych komórek, co stało się podstawą wyróżnienia subpopulacji wielu komórek różnorodnych organizmów wyższych. Szczególny postęp osiągnięto w poznaniu komórek immunologicznie czynnych, zwłaszcza limfocytów. Morfologicznie nierozróżnialne limfocyty okazały się zbiorem wielu subpopulacji, o często przeciwstawnych funkcjach (np. limfocyty grasiczozależne pomocnicze — CD4, reagujące ze zbiorem mAb rozpoznających epitopy antygenu T4, lub limfocyty grasiczozależne supresorowe — CD8, wiążące inny zbiór mAb rozpoznających epitopy antygenu T8). Dało to nie dającą się przecenić szansę badania i lepszego zrozumienia skomplikowanych procesów odpornoś-

ciowych. Bliższa znajomość antygenów komórek prawidłowych pozwala z kolei odróżniać antygeny komórek nowotworowych.

Przeciwciała monoklonalne okazały się również bardzo cennym narzędziem do badania czynnych biologicznie substancji, nieodzownych dla utrzymania równowagi wewnątrzustrojowej, a występujących tylko w śladowych ilościach, takich jak limfokiny (interleukiny, interferony, czynnik martwicy nowotworów (TNF) czy hormony. Uzyskuje się również różnorodne mAb przeciwko receptorom wiążącym biologicznie czynne substancje, co pozwala nie tylko poznać mechanizm ich działania, ale również śledzić dynamikę mediowanych przez nie reakcji.

Wreszcie mAb w ważki sposób przyczyniły się do lepszego poznania różnorodności przeciwciał, jako białek immunoglobulinowych, genetycznego podłoża tej różnorodności oraz pełniejszego zrozumienia istoty reakcji antygen – przeciwciało.

ZASTOSOWANIE mAb W DIAGNOSTYCE

Lawinowa i ciągle rosnąca produkcja mAb spowodowana jest głównie zapotrzebowaniem na nie w diagnostyce laboratoryjnej. Dają one szansę szybkiego określania przynależności gatunkowej, a nawet szczepowej drobnoustrojów izolowanych od chorych lub z różnego rodzaju produktów, np. z żywności. Ustalenia takie są bardzo ważne z punktu widzenia epidemiologii i konieczne do kontroli źródeł zakażenia drobnoustrojami, zasięgu patogenów i dróg szerzenia się zakażeń, a także oceny podatności populacji na danym terenie epidemiologicznym. Precyzyjne i szybkie ustalanie przynależności gatunkowej drobnoustrojów jest również ważne dla wyboru właściwego sposobu leczenia. Pewne drobnoustroje, należące do odległych grup taksonomicznych, mają wspólne determinanty antygenowe, co uniemożliwia lub utrudnia ich identyfikację z użyciem przeciwciał poliklonalnych. Jednak zastosowanie mAb o wąskiej swoistości pozwala odróżnić od siebie takie drobnoustroje. Przykładem mogą być zakażenia układu moczopłciowego wywoływane przez dwinki rzeżączki (*Neisseria gonorrhoeae*) lub *Chlamydia trachomatis*. Objawy choroby w obu przypadkach są podobne. Choroba przenosi się głównie przez kontakt seksualny. Wymienione bakterie mają wspólne determinanty antygenowe i wobec tego reagują krzyżowo z przeciwciałami poliklonalnymi przeciwko *Chlamydia trachomatis* lub przeciwko *Neisseria gonorrhoeae*. Jednak leczenie tych dwóch różnych zakażeń wymaga użycia odmiennych antybiotyków. Należy jednak zaznaczyć, iż otrzymanie dobrych mAb do szybkiej diagnostyki chorób zakaźnych nie jest łatwe. Przeciwciała takie muszą być swoiste gatunkowo lub szczepowo, jednak w objębie gatunku lub szczepu drobnoustroju powinny one reagować z maksymalną częstotliwością.

Inne zastosowanie diagnostyczne mAb, to możliwość rozpoznawania i klasyfikowania niedoborów odpornościowych w zakresie różnorodnych

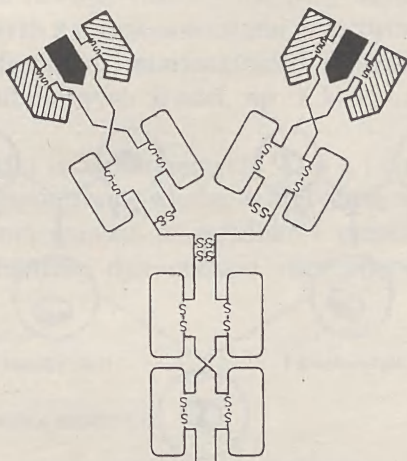
subpopulacji komórkowych, np. wykazywanie przewagi liczebnej limfocytów grasiczozależnych supresorowych nad limfocytami grasiczozależnymi pomocniczymi u chorych na AIDS. Przeciwciała monoklonalne są również nie dającym się zastąpić narzędziem w wykrywaniu nieprawidłowości w produkcji, uwalnianiu lub stabilności regulatorów procesów fizjologicznych, np. limfokin, hormonów czy różnorodnych pośredników w procesach fizjologicznych. Warto tutaj zaznaczyć, iż dopiero wprowadzenie do badań rutynowych przeciwciał monoklonalnych pozwoliło uniknąć reakcji nieswoistych i zwiększyć wiarygodność oznaczeń takich substancji. Podobnie zastosowanie mAb w typowaniu tkankowym, tzn. oznaczaniu antygenów zgodności tkankowej, umożliwia lepsze przewidywanie i unikanie reakcji biorców na obce dla nich antygeny zawarte w przeszczepionych komórkach, tkankach czy organach i tym samym stwarza lepsze perspektywy w transplantologii. Coraz częściej sięga się również po mAb przeciwko antygenom grupowym krwinek czerwonych, np. antygenom układu ABO podczas ustalania grup krwi, szczególnie u wielokrotnych biorców preparatów krwiopochodnych. Wreszcie ogromne znaczenie i duża nadzieja, to możliwość wczesnego diagnozowania komórek nowotworowych przy użyciu mAb przeciwko antygenom nowotworowym lub antygenom, których stężenie wzrasta podczas procesu nowotworzenia.

ZASTOSOWANIE mAb W TERAPII

Zastosowanie mAb w leczeniu ludzi lub zwierząt może polegać na podawaniu natywnych lub zmodyfikowanych cząsteczek immunoglobulin w celu niszczenia komórek nowotworowych lub czynników infekcyjnych lub na wykorzystaniu mAb, jako nośników substancji aktywnych terapeutycznie.

Na podstawie badań zwierząt eksperymentalnie zakażanych można sądzić, iż mAb w bardziej precyzyjny i bardziej skuteczny sposób niż przeciwciała poliklonalne mogą unieczynniać drobnoustroje rozwijające się w organizmie. Czynniki warunkującymi protekcyjne działanie mAb będzie ich swoistość ukierunkowana na struktury decydujące o patogenności drobnoustroju lub jego możliwości namnażania się w żywym organizmie, a także klasa lub podklasa przeciwciał, determinująca ich właściwości biologiczne. Przeciwciała monoklonalne o odpowiednich parametrach będą niszczyć drobnoustroje bezpośrednio, neutralizować produkowane przez nie toksyny lub wiążąc się z antygenami powierzchniowymi drobnoustrojów, czynić je bardziej podatne na pochłanianie i niszczenie przez fagocyty lub na lityczne działanie dopełniacza. Ponadto komórki, zakażone przez drobnoustroje, w których dochodzi do ekspresji antygenów takich drobnoustrojów (dotyczy szczególnie niektórych wirusów), mogą być niszczone w bezpośrednich reakcjach cytotoksycznych przez wyspecjalizowane komórki cytotoksyczne.

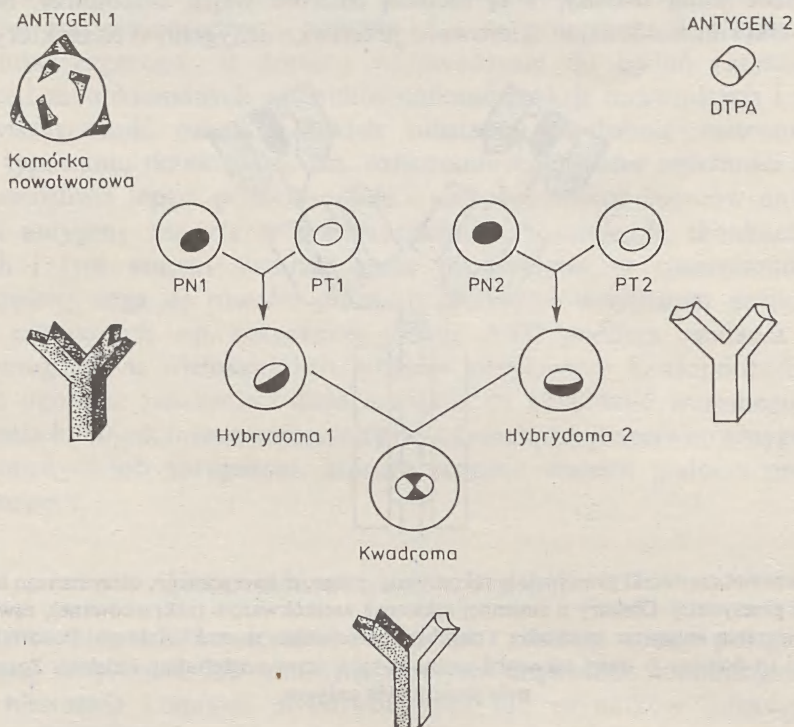
Duże nadzieje pokładane są w możliwości wykorzystania mAb, jako nośników leków. Dzięki wysokiej swoistości przeciwciał monoklonalnych, lek może docierać wyłącznie do komórek objętych procesem chorobowym, np. komórek nowotworowych lub zmienionych w procesach autoimmunologicznych. Szczególną nadzieję z tą metodą leczenia wiązą onkolodzy. Swoiste przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi charakterystycz-



Rys. 3. Schemat cząsteczki przeciwciała rekombinacyjnego, chimerycznego, otrzymanego techniką inżynierii genetycznej. Obszary o zmiennej sekwencji aminokwasów (zakreskowane), zawierające miejsca wiązania antygeny, pochodzą z mysiego przeciwciała monoklonalnego. Pozostała część cząsteczki to domeny o stałej sekwencji aminokwasów immunoglobuliny ludzkiej. Zaczernione pole przedstawia antygen

nemu dla danego nowotworu, sprzężone z cytostatykiem (np. methotrexat), toksyną roślinną (rycyna A) lub izotopem promieniotwórczym, wiążą się z komórkami nowotworowymi, a wprowadzony lek wybiórczo je niszczy. Wysoka masa cząsteczkowa (150 kDa) immunoglobulin powoduje jednak, że tylko niewielka porcja wprowadzanych dożylnie przeciwciał, tj. średnio 0,1%–0,6%, łączy się z antygenami nowotworu. Ponadto, ze względu na trudności w otrzymywaniu ludzkich mAb, stosuje się najczęściej przeciwciała mysie lub szczurze. Wprowadzanie ich ludziom wzbudza odpowiedź immunologiczną na obce białko, a produkowane podczas tej odpowiedzi przeciwciała przeciwko immunoglobulinom mysim lub szczurzym powodują szybką eliminację leku z organizmu, uniemożliwiając jego dłuższe stosowanie. Dlatego zainteresowanie budzi możliwość użycia w terapii przeciwciał rekombinacyjnych (rys. 3). Przeciwciała takie są immunoglobulinami ludzkimi, do których technikami DNA wprowadzono obszary zmienne np. mysich przeciwciał monoklonalnych. Takie chimeryczne (humanizowane) przeciwciała reaguje z takimi samymi determinantami antygenowymi, jak wyjściowe przeciwciała

monoklonalne mysie, ale sama cząsteczka, w przeważającej części, jest białkiem ludzkim. Zabieg taki pozwala zredukować immunogenność nośnika i powstawanie przeciwciał przeciwko nośnikowi, jakkolwiek nie eliminuje całkowicie tego niekorzystnego zjawiska.



Rys. 4. Schemat przedstawiający otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych o podwójnej swoistości metodą fuzji dwu linii hybrydowych

Bardzo obiecujące są też wyniki badań przeciwciał monoklonalnych o podwójnej swoistości, które można otrzymać techniką somatycznej fuzji dwóch linii hybrydowych, z których każda produkuje immunoglobuliny monoklonalne o innej swoistości np. w stosunku do antygeny charakterystycznego dla danych komórek nowotworowych oraz dla jakiegoś niskocząsteczkowego związku, np. DTPA (kwas 2-etyleno-3-amino-5-octowy) (rys. 4). Wyselekcjonowane przeciwciała dwuswoiste, po wprowadzeniu do organizmu, łączą się jednym miejscem wiązania antygeny ze strukturami obecnymi na komórkach nowotworowych. Nie związane z komórkami przeciwciała są usuwane z organizmu w ciągu kilku dni. Wówczas wstrzykuje się do organizmu DTPA związany z radioaktywnym itrem (^{90}I -DTPA). Związek ten łączy się z drugim miejscem wiążącym antygen w cząsteczkach przeciwciał obecnych na powierzchni komórek nowotworowych. Promieniowanie emitowane przez radioaktywny itr niszczy komórkę nowotworową, z którą związane jest dwuswoiste

przeciwciało, a także sąsiadujące komórki guza. Nadmiar ^{90}I -DTPA usuwany jest z organizmu w ciągu kilku minut. Opisana technika, którą można określić jako immunoterapię dwustopniową (faza lokalizacji i faza toksyczna), stanie się być może podstawą nowoczesnego leczenia nowotworów, jakkolwiek trudność w jej stosowaniu stanowi ciągle słabo poznana natura antygenów nowotworowych.

Zapotrzebowanie współczesnej medycyny na oczyszczone preparaty czynne biologicznie mogą być również realizowane przy użyciu mAb. Zastosowanie adsorbentów sprzężonych z wysokoswoistymi przeciwciałami monoklonalnymi (np. przeciwko interferonom, interleukinom) umożliwia izolowanie takich substancji z wieloskładnikowych źródeł, np. z krwi czy homogenatów tkankowych.

Technika przeciwciał monoklonalnych Köhlera i Milsteina zrewolucjonizowała współczesną wiedzę teoretyczną i praktyczną, a szeroki zakres ich zastosowania sprawił, że produkcja przeciwciał monoklonalnych stanowi jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi biotechnologii.

HENRYKA DŁUGOŃSKA, WIESŁAWA RUDNICKA

MONOCLONAL ANTIBODIES

Summary

The development of methods for generation of monoclonal antibodies by Köhler and Milstein made it possible to produce large quantities of homogenous populations of antibody molecules with the same precise specificity for a given antigenic determinant. The principles of biotechnology for the monoclonal antibody production including the generation and selection of hybridomas are presented. The second part of the paper concerns the application of monoclonal antibodies in science and in medical diagnosing. The perspective of monoclonal antibodies in immunotherapy is also discussed.

LITERATURA

1. Beverley P. C. L., Riethmüller G. — *Immunological intervention with monoclonal antibodies*. Immunology today. 8: 101–102, 1987.
2. Bręborowicz I., Gan J. — *Reaction of monoclonal antibodies with human AFP in affinity electrophoresis*. Immunologia Polska XI: 11–21, 1986.
3. Brüggemann M., Williams G. T., Cashey H. M., Teale C., Spicer C., Surrant M. A., Neuberger M. S. — Construction, function and immunogenicity of recombinant monoclonal antibodies. Behring Inst. Mitt. 87: 21–24, 1990.
4. Długońska H. — *Technika otrzymywania przeciwciał monoklonalnych*. Wiad. Parazytol. XXX: 649–658, 1984.
5. Götze D. — *Somatische Zell-Hybridisierung-Methoden und Anwendungen*. Immunforschung in Klinik und Labor. Sonderheft. 5–36, 1979.

6. Knapp W., Rieber B., Dörken B., Schmidt R. E., Stein H., v.d Borne A. E. G. Kr. — *Towards a better definition of human leucocyte surface antigens*. Immunology today. 10: 235–261, 1989.
7. Köhler G., Milstein C. — *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature. 256: 495–497, 1975.
8. Mach J.-P., Pelegrin A., Buchegger F. — *Imaging and therapy with monoclonal antibodies in non-hematopoietic tumors*. Curr. Opinion in Immunol. 3: 685–693, 1991.
9. Male D., Champion B., Cooke A. — *Advanced Immunology*. I. B. Lippincott Company. Philadelphia. 9.1–9–12, 1987.
10. McCulloch K. C., Spier R. E. — *Monoclonal antibodies in biology and biotechnology: theoretical and practical aspects*. Cambridge University Press. Cambridge. 265–315, 316–351, 1990.
11. McKear J. P., Hensom G. — *Mapping of novel B lymphocyte differentiation antigens*. Immunological Methods. Acad. Press. Inc. Orlando, 147–162, 1985.
12. Munro Neville A. — *Detection of tumor antigens with monoclonal antibodies: immunopathology and immunodiagnosis*. Curr. Opinion in Immunol. 3: 674–678, 1991.
13. Nicholson K. A., Iones B. M. — *Immunotyping by flow cytometry: its use in HIV infection*. Inter. Laboratory. April/May, 21–26, 1989.
14. Nowinski R. C., Tam M. R., Goldstein L. C., Stong L., Cho-Chou Kuo, Korey L., Stamm W. E., Handsfield H. H., Knapp I. S., Holmes K. K. — *Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans*. Science 219: 673–644, 1983.
15. Oi V. T., Herzenberg L. A. — *Immunoglobulin producing cell lines. Selected methods in cellular immunology*. (red. Mishell B. B., Shiigi S. M., Freeman W. H. and Co.). San Francisco. 351–372, 1980.
16. Olsnes S., Sandvig F., Petersen O. W., van Ders Bo. — *Immunotoxins — entry into cells and mechanisms of action*. Immunology today 10: 291–295, 1989.
17. Roitt I. — *Essential immunology*. Blackwell Scientific Publ. London 107–110, 114–115, 144–145, 228, 1988.
18. Rytwiński K. — *Cytotoksyczne działanie przeciwciała monoklonalnego 791/36 związanego z łańcuchem A rycyny na komórki linii ludzkiego osteosarcoma*. Immunologia Polska XII, 137–146, 1987.
19. Scheinberg D. A. — *Current applications of monoclonal antibodies for the therapy of hematopoietic cancers*. Curr. Opinion in Immunol. 3: 679–684, 1991.
20. Seemann G., Bosslet K., Sedlacek H.-H. — *Recombinant monoclonal antibodies in tumor therapy*. Behring Inst. Mitt. 87: 33–47, 1990.
21. Sikora I., Szczrzyca H., Żeromski J. — *Ocena reaktywności przeciwciał monoklonalnych przeciw wybranym markerom nowotworowym z komórkami nowotworowymi płocin chorych na raka płuca*. Immunologia Polska XII: 35–42, 1987.

WIESŁAWA RUDNICKA

Katedra Immunologii
 Zakład Biologii Infekcyjnej
 Instytut Mikrobiologii i Immunologii
 Uniwersytet Łódzki
 Łódź

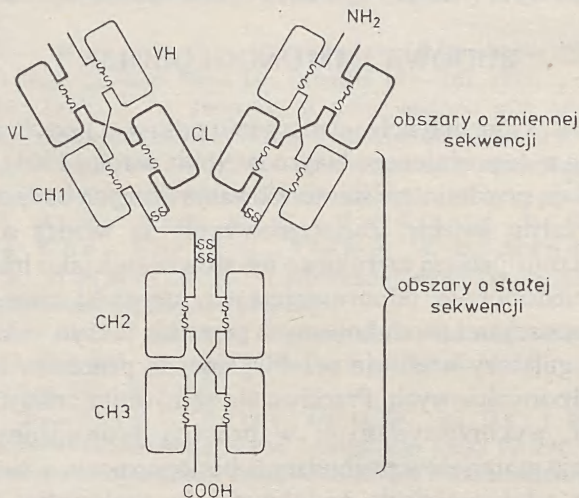
BUDOWA IMMUNOGLOBULIN

W ciągu 100 lat, które upłynęły od momentu odkrycia przeciwciał przez Emila von B e h r i n g a (wyróżnionego Nagrodą Nobla w roku 1901), immunoglobuliny ciągle pozostają przedmiotem zainteresowania licznych badaczy w ośrodkach naukowych na całym świecie. Zapotrzebowanie na wiedzę o tych białkach podykowane jest możliwością szerokiego ich stosowania jako leków: substytuty przeciwciał w niedoborach odpornościowych, czynniki znoszące szkodliwe działanie drobnoustrojów i produkowanych przez nie toksyn, inhibitory rozwoju nowotworów, regulatory wadliwie przebiegających procesów fizjologicznych, w tym reakcji odpornościowych. Przeciwciała są również cennymi preparatami diagnostycznymi, wykorzystywanymi w pracach prowadzonych z użyciem wszelkiego rodzaju materiałów pochodzenia biologicznego, a nawet produktów syntetycznych o właściwościach podobnych do materiałów biologicznych. W postępie wiedzy o immunoglobulinach, jaki dokonał się w ciągu 100 lat, szczególnie ważne okazały się: wyniki badań Geralda M. E d e l m a n a i Rodneya R. P o r t e r a (wyróżnionych Nagrodą Nobla w 1972 r.) wyjaśniające naturę molekularną przeciwciał, opracowanie przez Georga K ö h l e r a i Caesara M i l s t e i n a (wyróżnieni Nagrodą Nobla w 1984 r.) techniki otrzymywania przeciwciał monoklonalnych oraz ustalenie przez Susumu T o n e g a w a (Nagroda Nobla w 1987 r.) molekularnych podstaw zróżnicowania przeciwciał. Obecnie immunoglobuliny należą do grupy najlepiej poznanych białek. Znajomość struktury, funkcji i genetycznej kontroli ich syntezy pozwoliła na podjęcie, w pewnych przypadkach udanych, prób otrzymywania przeciwciał metodami inżynierii genetycznej. Stwarza to możliwość konstruowania przeciwciał o z góry zakładanych właściwościach, a nawet podejmowanie próby konstruowania „ulepszonych” przeciwciał w stosunku do tych, które występują w naturze.

STRUKTURA IMMUNOGLOBULIN

Przeciwciała, określane ogólną nazwą immunoglobulin, syntetyzowane są w odpowiedzi na stymulujące działanie antygenów i swoście reagują ze strukturami wyznaczającymi swoistość antygenów, tj. determinantami lub

epitopami antygenowymi. Przeciwciała są produkowane przez aktywowane limfocyty grasiczoniezależne (limfocyty B), których finalną komórką rozwojową jest komórka plazmatyczna, a następnie wydzielane do krwi i płynów ustrojowych. Dlatego zachodzący *in vivo* proces produkcji przeciwciał, uruchamiany w odpowiedzi na wnikające do organizmu antygeny infekcyjne (bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty zwierzęce) lub nieinfekcyjne (obce erytrocyty, obcogatunkowe surowice, obce białka zawarte w pokarmie, składniki leków), nosi nazwę odporności humoralnej.

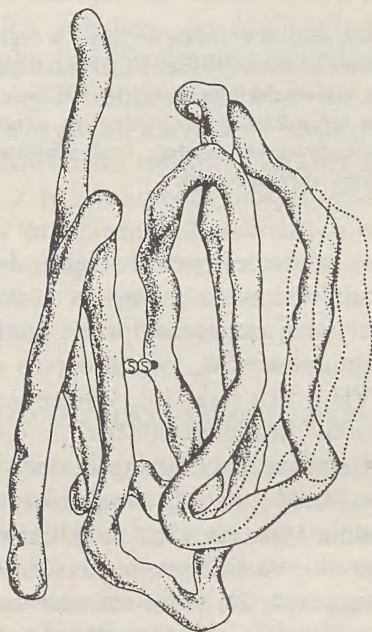


Rys. 1. Schemat budowy cząsteczki immunoglobuliny (IgG). Na rysunku przedstawiono łańcuchy ciężkie (H) oraz lekkie (L) (linia pogrubiona). Prostokąty obrazują obszary (domeny) łańcuchów polipeptydowych stabilizowane przez wiązania dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe. Obszary V charakteryzują się zmienną sekwencją aminokwasów, obszary C — wykazują relatywnie stałą sekwencję aminokwasów

Poza pokrewieństwem funkcjonalnym, wyrażającym się zdolnością swoistej reakcji z antygenami, immunoglobuliny wykazują wspólny plan budowy (rys. 1). Cząsteczka immunoglobuliny, w formie monomerycznej, zawiera dwa łańcuchy lekkie (L — light) o masie około 24 kDa i dwa łańcuchy ciężkie (H — heavy) o masie 55–70 kDa, związane między sobą mostkami dwusiarczkowymi, zewnątrzłańcuchowymi. Łańcuchy te, dzięki określonej pofałdowaniu, tworzą trójwymiarowe globularne struktury, zwane obszarami lub domenami, zawierające od 120 do 130 reszt aminokwasowych. W łańcuchach lekkich występują dwie domeny, zaś w ciężkich — 4 lub 5 obszarów. Sposób pofałdowania łańcucha polipeptydowego w domenach różnorodnych przeciwciał jest podobny. Występuje 7 pętli o strukturze β w dwóch płaszczyznach, 3 w jednej i 4 w drugiej płaszczyźnie (rys. 2). Struktura przestrzenna każdej domeny stabilizowana jest przez wiązanie dwusiarczkowe wewnątrz-

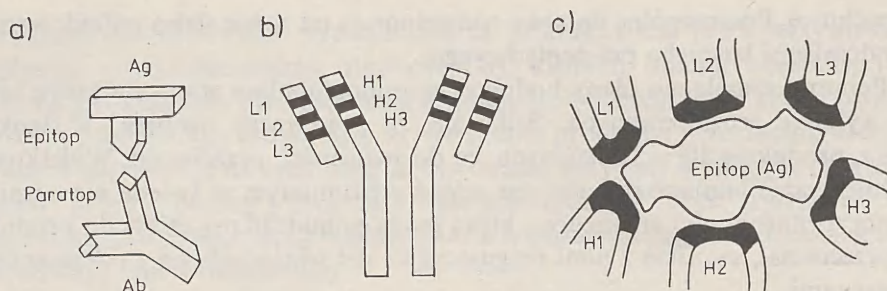
łańcuchowe. Poszczególne domeny oddzielone są od siebie słabo pofałdowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego.

Pomimo wspólnego planu budowy, immunoglobuliny stanowią grupę białek wybitnie zróżnicowanych. Sądzi się, że pojedynczy osobnik, w danym czasie, produkuje $10^6 - 10^8$ różnych, co do swoistości, przeciwciał. Wyjątkowe zróżnicowanie immunoglobulin jest czymś zrozumiałym w świetle nie ograniczonej różnorodności antygenów, które mogą pobudzać organizm do produkcji przeciwciał, swoiście z nimi reagujących i nie wiążących się z odmiennymi antygenami.



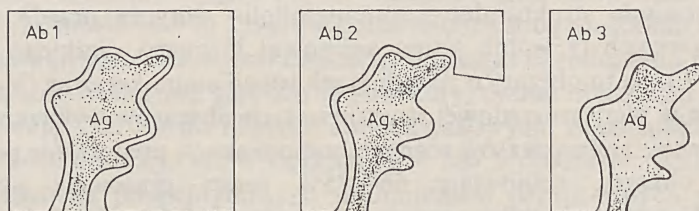
Rys. 2. Model przedstawiający sposób pofałdowania łańcucha polipeptydowego tworzącego pojedynczy obszar (domenę). Linia ciągła prezentuje układ złożeń łańcucha w obszarze o stałej sekwencji aminokwasów. Linia kropkowana obrazuje dodatkową pętlę, występującą w obszarach o zmiennej sekwencji aminokwasów. Układ złożeń stabilizowany jest przez wiązanie dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe [5].

Zróżnicowanie strukturalne immunoglobulin dotyczy przede wszystkim domen pierwszych (z wolną grupą aminową) łańcucha ciężkiego (VH) lub lekkiego (VL). Są to obszary o zmiennej sekwencji aminokwasów (V – variabile). Różnice w pierwszorzędowej strukturze tych obszarów wykazano, porównując sekwencję aminokwasów różnych homogennych preparatów przeciwciał. Pozostałe obszary, stanowiące 66–75% części cząsteczki przeciwciała (C-constant), wykazują tylko ograniczoną zmienność (rys. 1). Taka organizacja obszarów immunoglobulinowych pozostaje w związku z pełnioną przez nie funkcją. Domeny VH i VL są odpowiedzialne za komplementarność miejsca



Rys. 3. Schemat przedstawiający organizację miejsca wiązania antygeny w cząsteczce przeciwciała. 3a — komplementarność epitopu (determinantu) antygenowego (Ag) i paratopu immunoglobuliny. 3b — regiony nadzmienności w obszarze V łańcucha lekkiego (L1—L3) oraz łańcucha ciężkiego (H1—H3). 3c — przestrzenne ułożenie łańcuchów polipeptydowych zapewnia „sąsiedztwo” punktów nadzmienności obu łańcuchów tworzących paratop, czyli właściwe miejsce wiązania epitopu antygenowego

wiązania antygeny (paratopu w cząsteczce przeciwciała) do determinantu antygenowego (rys. 3a). Warunkują one zatem swoistość reakcji przeciwciała z określonymi antygenami. W natywnej cząsteczce przeciwciała, zagęszczenia punktów zmienności sekwencji aminokwasów, zwane często obszarami nadzmienności (po trzy w domenie VH i VL) (rys. 3b), występują w najbliższym sąsiedztwie, tworząc rodzaj „kieszeni” komplementarnej do epitopu antygeny (rys. 3c). To właśnie struktura obszarów nadzmienności decyduje o niezwykłym charakterze cząsteczek przeciwciała i o ich swoistości w stosunku do antygenów. Ogromne zróżnicowanie tych struktur znajduje odbicie w zróżnicowaniu immunoglobulin, które określa się terminem zróżnicowania idiotypowego. Należy jednocześnie zaznaczyć, że zróżnicowanie immunoglobulin, pozostające w związku z ich swoistością w stosunku do antygenów, ma charakter nie tylko jakościowy, ale również ilościowy. Określona cząsteczka przeciwciała może reagować z częściowo podobnymi determinantami, ale z różnym powinowactwem (affinity) w zależności od stopnia komplementarności jej paratopu do reagujących epitopów (rys. 4). Wynika to z tego, iż wiązanie antygen — przeciwciało jest reakcją odwracalną, w której siła wiązania jest



Rys. 4. Schemat ilustrujący powinowactwo różnych cząsteczek przeciwciała (Ab) do determinantu antygenowego (Ag). Powinowactwo $Ab1 > Ab2 > Ab3$

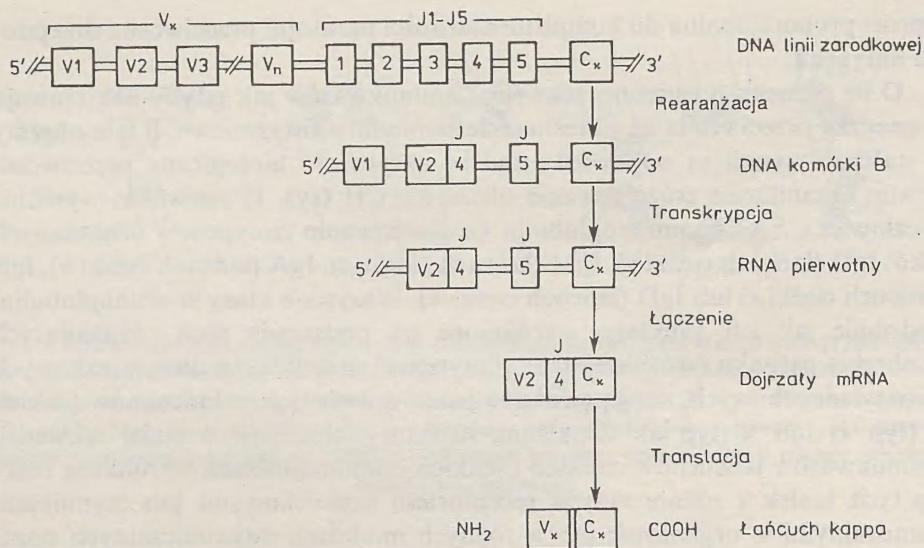
wprost proporcjonalna do komplementarności paratopu przeciwciała do epitopu antygenu.

O ile domeny o zmiennej sekwencji aminokwasów jak gdyby nakierowują cząsteczkę przeciwciała na określone determinanty antygenowe, o tyle obszary o stałej sekwencji są odpowiedzialne za aktywność biologiczną przeciwciała. Pewne ograniczone zróżnicowanie obszarów CH (rys. 1) pozwoliło wyróżnić u człowieka 5 klas immunoglobulin (zróżnicowanie izotypowe) oznaczanych jako: IgG (łańcuch ciężki γ), IgM (łańcuch ciężki μ), IgA (łańcuch ciężki α), IgE (łańcuch ciężki ϵ) lub IgD (łańcuch ciężki δ). Wszystkie klasy immunoglobulin, podobnie jak ich subklasy, wyróżnione na podstawie cech różnicujących w obrębie gatunku (zróżnicowanie allotypowe) oraz wiązań dwusiarczkowych międzyłańcuchowych, mogą zawierać jeden z dwu typów łańcuchów lekkich λ (typ λ) lub κ (typ κ). Określone struktury obszarów o stałej sekwencji aminokwasów łańcuchów ciężkich i lekkich immunoglobulin warunkują reakcję tych białek z różnorodnymi receptorami komórkowymi lub czynnikami humoralnymi w organizmie lub w różnych modelach doświadczalnych pozaustrojowych. Decydują one również o właściwościach serologicznych przeciwciał w reakcjach z korpuskularnymi lub rozpuszczalnymi antygenami wewnątrzustrojowymi lub infekcyjnymi.

GENETYCZNE PODSTAWY ZRÓŻNICOWANIA IMMUNOGLOBULIN

Udokumentowane ogromne zróżnicowanie immunoglobulin narzuciło konieczność szukania odpowiedzi na pytanie, ile potrzeba DNA dla zawarcia takiego ogromu informacji dla syntezy immunoglobulin i jak taka ilość DNA może pomieścić się w genomie jednej komórki. Dlatego też podstawowe znaczenie miało stwierdzenie, iż odrębne geny kodują obszary o zmiennej lub stałej sekwencji aminokwasów (rys. 1). Różne geny V dla obszarów zmiennych immunoglobulin mogą ulegać łączeniu z jednym genem C dla domeny stałej, tworząc w efekcie geny strukturalne dla łańcuchów polipeptydowych określonej klasy lub typu, różniące się fragmentem zmiennym. To w znacznym stopniu redukuje ilość informacji potrzebnej dla kodowania różnych cząsteczek immunoglobulin. Jak wykazał Susumu Tonegawa, łączenie się genów V z genami C jest możliwe dzięki reorganizacji, jakiej one podlegają podczas różnicowania się limfocytów B.

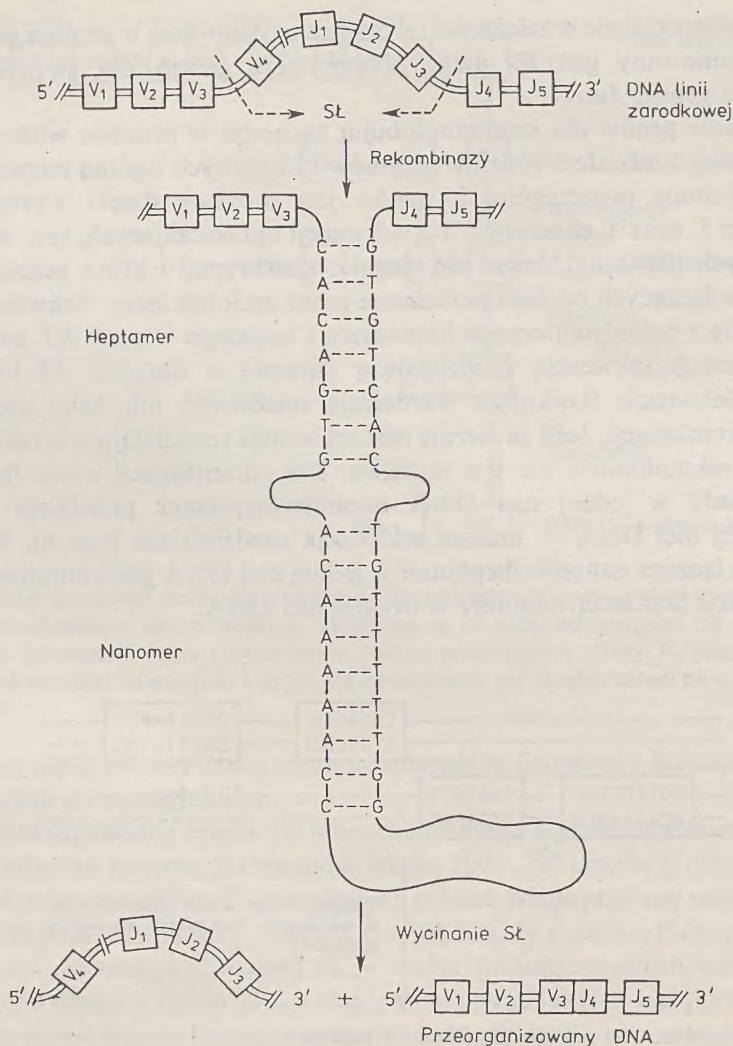
Organizacja genów dla immunoglobulin tylko w ogólnym zarysie przypomina strukturę genów dla nieimmunoglobulinowych białek receptorowych. Geny kodujące łańcuchy ciężkie oraz lekkie κ lub λ zlokalizowane są na różnych chromosomach, a zatem ich rearanżacja jest niezależna. U człowieka złożony locus dla łańcuchów ciężkich zlokalizowany jest na chromosomie 14, dla łańcuchów lekkich κ — na — chromosomie 2, zaś dla łańcuchów lekkich λ — na chromosomie 22. U myszy odpowiednie loci znajdują się na chromosomach 12, 6 i 16. Zawierają one grupy genów występujących w wielu



Rys. 5. Schemat organizacji genów dla syntezy łańcucha lekkiego κ . Sekwencje ulegające transkrypcji (eksony), przedstawione jako prostokąty, oddzielone są od siebie sekwencjami nie ulegającymi transkrypcji (intronami), które zaznaczono w postaci równoległych. Geny V_x poprzedzone są krótkimi sekwencjami liderowymi, których dla uproszczenia nie przedstawiono na schemacie [1]

różniących się kopiach i kodujących poszczególne fragmenty łańcuchów polipeptydowych immunoglobulin.

Schemat organizacji genów dla łańcucha lekkiego κ przedstawiono na rys. 5. Linia zarodkowa zawiera, jak się sądzi, około 100–200 genów V dla odcinków zmiennych łańcucha κ (geny V_x) kodujących łańcuch polipeptydowy odpowiadający około 95 resztom aminokwasowym (1–95). Każdy z genów V_x poprzedzony jest krótką 5' sekwencją liderową L (L – leader) kodującą hydrofobowy peptyd sygnałowy o długości około 20 reszt aminokwasowych, który jest potrzebny dla transportu powstającego łańcucha polipeptydowego do cystyny endoplazmatycznej. Pozostały, krótki odcinek fragmentu V_x , obejmujący około 13 reszt aminokwasowych (96–108), jest prawdopodobnie kodowany przez 5 genów J (join). Dopelnieniem jest pojedynczy gen C_x , kodujący obszar stały łańcucha κ (reszty aminokwasowe 109–214). Gen strukturalny dla łańcucha κ , podobnie jak dla innych łańcuchów immunoglobulinowych, jest genem rozczłonkowanym. Sekwencje ulegające transkrypcji na mRNA – eksony, oddzielone są od siebie sekwencjami nie ulegającymi transkrypcji – intronami. To, co jest szczególnie w organizacji genów dla immunoglobulin, to reorganizacja, której one podlegają. Aby powstał strukturalny gen dla łańcucha κ , w różnicującym się limfocycie B musi nastąpić wybór jednego z genów V_x . Jak przebiega proces selekcji, nie wiadomo. Sądzi się, że jest on niezależny od obecności antygeny, jakkolwiek prawdopodobne jest, że pewne geny V_x mają szansę być selekcjonowane z większą częstością niż



Rys. 7. Schemat ilustrujący reorganizację genów dla syntezy immunoglobulin podczas różnicowania się limfocyty B, zachodzącą pod wpływem rekombinaz. SŁ — sekwencje łączące. [1]

W wyniku reorganizacji, wycinaniu lub łączeniu genów dla immunoglobulin, określona zostaje swoistość receptorów immunoglobulinowych limfocyty B, a tym samym zdeterminowana jest swoistość immunoglobulin, które komórka taka może w przyszłości produkować. Warto zaznaczyć, iż swoistość immunoglobulin syntetyzowanych przez dany limfocyt B lub jego potomstwo nie ulega zmianie w ciągu całego okresu życia komórki.

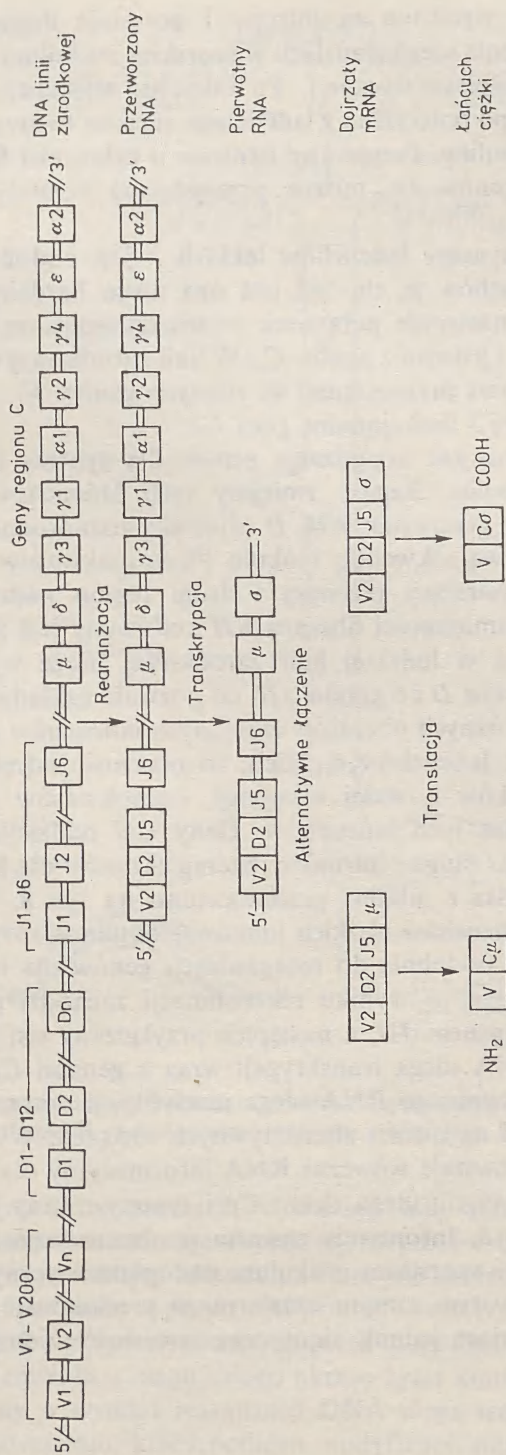
Złożony w wyniku rearanżacji DNA ulega transkrypcji z wytworzeniem RNA pierwotnego, który podlega modyfikacji potranskrypcyjnej. Z pierwo-

tnego transkryptu RNA wycinane są introny i powstaje dojrzały RNA informacyjny, który następnie ulega translacji w szerskim retikulum endoplazmatycznym (siateczce śródplazmatycznej). Po odcięciu sekwencji liderowej powstaje łańcuch κ , który po połączeniu z łańcuchem ciężkim tworzy kompletną cząsteczkę immunoglobuliny. Przyjmując istnienie u człowieka 80 różnych genów $V\kappa$ i 5 różnych genów $J\kappa$, można przewidywać hipotetycznie wystąpienia 400 różnych łańcuchów κ .

Struktura genów dla syntezy łańcuchów lekkich λ jest podobna do organizacji genów dla łańcuchów κ , chociaż jest ona nieco bardziej złożona. W procesie rekombinacji następuje połączenie wyselekcjonowanego genu V_λ z wybranym segmentem J_λ i jednym z genów C_λ . W linii zarodkowej człowieka, jak się ocenia, zawartych jest przynajmniej 40 różnych genów V_λ , 6 różnych genów J_λ oraz przynajmniej 3 funkcjonalne geny C_λ .

Jeszcze bardziej złożona jest organizacja genów dla syntezy łańcuchów ciężkich (H) immunoglobulin. Region zmienny tych łańcuchów podlega kontroli trzech segmentów genowych: VH , D (diversity-różnorodność) i JH . Geny VH kodują 5-liderową sekwencję i około 98-aminokwasowy odcinek domeny zmiennej V , zawierający pierwszy i drugi region nadzmienności (rys. 8). Trzeci region nadzmienności obszaru VH kodowany jest przez geny D i JH . Przyjmuje się, iż w ludzkiej linii zarodkowej może występować 75–250 genów VH , 12 genów D i 6 genów JH , co pozwala zakładać istnienie kilku – kilkunastu tysięcy różnych obszarów zmiennych łańcuchów ciężkich.

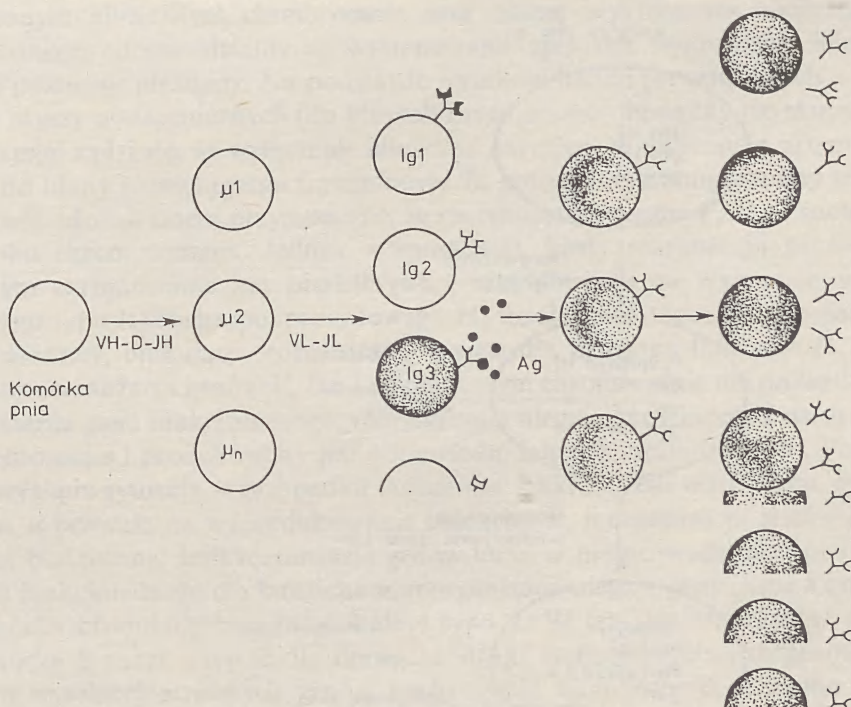
To, co wyróżnia locus łańcuchów ciężkich, to obecność odrębnych eksonów dla syntezy odcinków o stałej sekwencji aminokwasów (CH) poszczególnych klas i podklas tych łańcuchów. Geny CH oddzielone są od segmentów genowych $V/D/J$ długim intronem. Szereg eksonów dla łańcuchów ciężkich poszczególnych klas i subklas przedstawiono na rys. 8. Składanie strukturalnego genu dla łańcuchów ciężkich immunoglobulin w różnicującym się limfocycie B przebiega podobnie do reorganizacji genów dla łańcuchów lekkich. W pierwszym etapie, w wyniku rekombinacji zachodzi połączenie jednego genu D z jednym genem JH , a następnie przyłączany jest jeden gen JH . Przeorganizowany DNA ulega transkrypcji wraz z genami $C\mu$ lub $C\delta$. Powstający transkrypt pierwotnego RNA ulega modyfikacji potranskrypcyjnej, która może przebiegać na dwóch alternatywnych drogach. Wycinane są introny oraz ekson $C\delta$ i powstaje wówczas RNA informacyjny dla łańcucha μ lub wraz z intronami wycięciu ulega ekson $C\mu$ i syntetyzowany jest RNA informacyjny dla łańcucha δ . Informacja zawarta w obu rodzajach mRNA może ulegać transkrypcji w szorstkim retikulum endoplazmatycznym jednej komórki B, która zatem w tym samym czasie może produkować łańcuchy lekkie klasy μ i δ , wykazujące jednak identyczną swoistość w stosunku do antygeny.



Rys. 8. Schemat organizacji genów dla syntezy łańcuchów ciężkich immunoglobulin. Prostokąty przedstawiają sekwencje ulegające transkrypcji (eksony) oddzielone od siebie przez sekwencje nie ulegające transkrypcji (introny), które zaznaczono w postaci skośnych równoległych. Geny *V* poprzedzone są krótkimi sekwencjami liderowymi, których dla uproszczenia nie zaznaczono na rysunku [1]

EKSPRESJA GENÓW DLA IMMUNOGLOBULIN

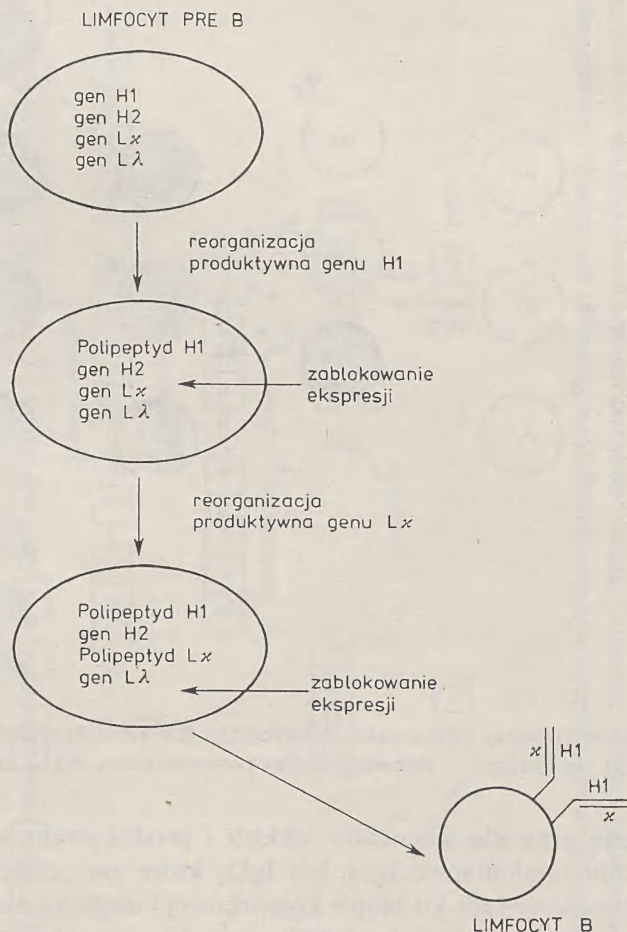
Limfocyty B ssaków powstają w płodowej wątrobie, ale już po urodzeniu funkcję limfopoetyczną przejmuje szpik kostny. W szpiku kostnym limfocyty B powstają z samoodtwarzających się komórek pnia. W nowo różnicujących się limfocytach B zachodzi reorganizacja genów dla łańcuchów ciężkich i synteza wewnątrzcytoplazmatycznych łańcuchów μ (rys. 9). W dalszej kolejności re-



Rys. 9. Schemat przedstawiający różnicowanie się limfocytów B w komórki produkujące immunoglobuliny (Ig). sIg (surface) — immunoglobuliny powierzchniowe, Ag — antygen. [2]

aranżacji ulegają geny dla łańcuchów lekkich i produkowane są kompletne cząsteczki immunoglobulinowe IgM lub IgD, które po odcięciu sekwencji liderowej są transportowane ku błonie komórkowej i ulegają powierzchniowej ekspresji. W porównaniu z immunoglobulinami sekrecyjnymi, immunoglobuliny powierzchniowe mają dodatkową sekwencję w końcu z wolną grupą karboksylową, umożliwiającą ich zakotwiczenie w błonie. Limfocyt B w tym stadium rozwoju określany jest mianem komórki B-dziewiczej (virgin) lub spoczynkowej. Cały dotychczasowy proces różnicowania limfocytu B jest niezależny od antygeny. W wyniku reorganizacji genów dla immunoglobulin, limfocyt B nabywa swoistość antygenową. Powierzchniowe immunoglobuliny (sIg) pełnią funkcję receptorów rozpoznających determinanty antygenowe.

Limfocyt B może rozpoznawać wyłącznie determinanty antygenowe komplementarne do swoich immunoglobulinowych receptorów. Związanie antygenu przez te receptory aktywuje komórkę B, pobudzając jej ekspansję (prolifrację) i różnicowanie się w komórki plazmatyczne produkujące i wydzielające przeciwciała. Swoistość przeciwciał produkowanych przez potomstwo pobudzonego limfocytu B jest identyczna ze swoistością jego receptorów immunoglobulinowych, które rozpoznały stymulujący antygen.

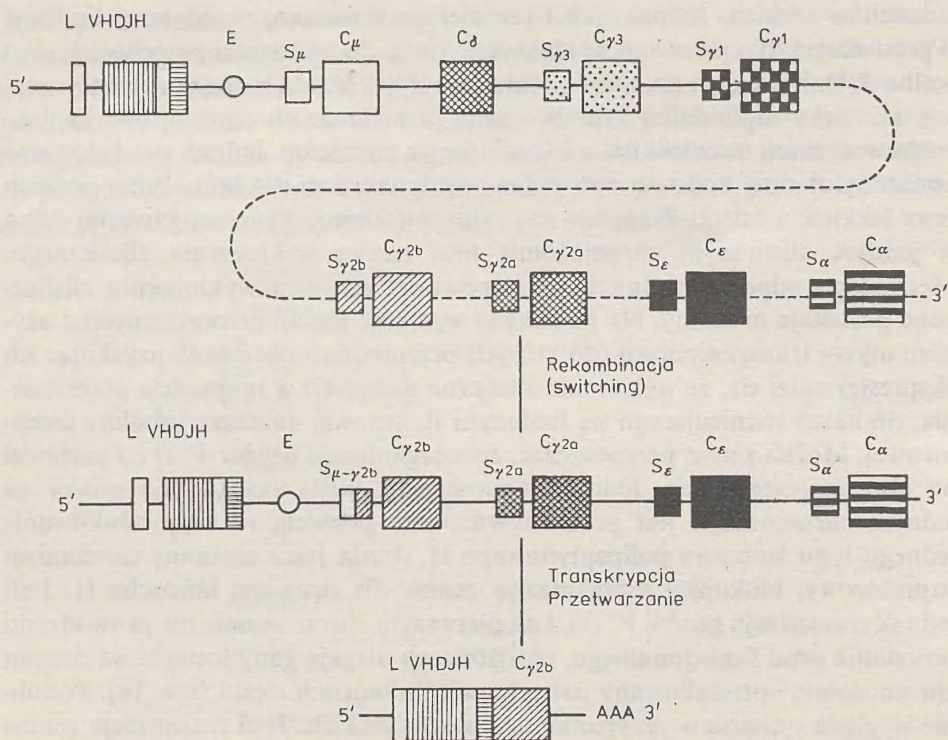


Rys. 10. Schemat przedstawiający zjawisko wykluczenia allelicznego. Geny łańcuchów ciężkich: *H1* i *H2*, oraz łańcuchów lekkich: α i λ

Teoretycznie, nowo różnicujący się limfocyt B ma możliwość wyboru licznych genów *V*, *D* i *J* dla odcinków zmiennych (rys. 10) łańcuchów immunoglobulinowych oraz możliwość wyboru genów α lub λ dla syntezy

łańcuchów lekkich. Jednak, jak wcześniej wspomniano, pojedynczy limfocyt B produkuje tylko jeden rodzaj identycznych co do swoistości przeciwciał, albo κ albo λ . Dzieje się tak pomimo, że limfocyt B, jak każda komórka somatyczna, jest komórką diploidalną z podwójnym garniturem chromosomów dla łańcuchów ciężkich oraz lekkich κ i λ , od obojga rodziców. Jednak produkowane immunoglobuliny kodowane są przez pojedyncze loci dla łańcuchów ciężkich oraz lekkich κ lub λ . Zjawisko używania informacji genowej zawartej tylko w jednym allelicznym chromosomie nosi nazwę wykluczenia allelicznego. Mechanizm odpowiedzialny za występowanie zjawiska wykluczenia allelicznego pozostaje nieznan. Na podstawie wyników badań prowadzonych z użyciem myszy transgeniczných (do których przeniesiono obce geny uzyskując ich ekspresję) sądzi się, że wyłączenie alleliczne następuje w momencie przeniesienia, do błony różnicującego się limfocyty B, gotowej immunoglobuliny receptorowej. Można zatem przypuszczać, że reorganizacja genów V , D i J zachodzi na obu chromosomach. Jednak w momencie, kiedy rearanżacja genów na jednym chromosomie jest produktywna, tzn. pozwala na wyprodukowanie jednego typu łańcucha polipeptydowego H, działa jakiś nieznan mechanizm supresorowy, blokujący reorganizację genów dla drugiego łańcucha H. Jeśli jednak rearanżacja genów V , D i J na pierwszym chromosomie nie prowadzi do powstania genu funkcjonalnego, reorganizacji ulegają geny locus H na drugim chromosomie i produkowany jest odpowiedni łańcuch ciężki (rys. 10). Podobnie wygląda sytuacja w przypadku łańcuchów lekkich. Jeśli rearanżacja genów locus κ pozwala na wyprodukowanie łańcucha κ , reorganizacja genów locus λ jest blokowana. Jeśli rearanżacja genów locus κ nie prowadzi do powstania genu funkcjonalnego dla łańcucha κ , reorganizacji ulegają geny locus λ i odtąd komórka produkuje immunoglobuliny typu λ . W ten sposób, chociaż jedna komórka B może używać dla danego rodzaju łańcuchów immunoglobulinowych wyselekcjonowanych genów pochodzenia albo ojcowskiego albo matczyne, to zbiór limfocytów B będzie wykorzystywał geny dziedziczone po obojgu rodzicach.

O ile pojedynczy limfocyt B może produkować przeciwciała tylko o jednej swoistości zdeterminowanej przez wybrane geny VL/JL i $VH/D/JH$, o tyle klasa produkowanych przeciwciał może ulegać zmianie. Podczas rozwoju komórek B, w pierwszym okresie produkowane są immunoglobuliny klasy IgM (łańcuchy μ) i IgD (łańcuchy δ). Później może następować zmiana klasy produkowanych przeciwciał, określana jako przełączenie (switching) klasy lub izotypu (rys. 11). Mechanizm tego zjawiska polega na rekombinacji delecyjnej, przebiegającej jednak inaczej niż w przypadku składania genów dla obszarów zmiennych przeciwciał. O ile rearanżacja genów VL/JL oraz $VH/D/JH$ jest antygenowo niezależna, o tyle przełączanie izotypu wymaga stymulacji antygenowej i podlega regulacyjnemu działaniu limfokin uwalnianych przez limfocyty T. Ponadto zjawisko to dotyczy wyłącznie reorganizacji genów dla łańcuchów ciężkich. W końcach 5' każdego eksonu regionu C, z wyjątkiem



Rys. 11. Schemat przedstawiający zmianę klasy (izotypu) immunoglobulin produkowanych przez pojedynczy limfocyt B. W pierwszym okresie komórka B produkuje przeciwciała klasy IgM (łańcuch μ). Następnie następuje przestawienie się tej komórki (switching) na produkcję przeciwciała klasy IgG (łańcuch $\gamma 2b$). Pomimo zmiany izotypu produkowanych przeciwciał, ich swoistość w stosunku do antygeny nie ulega zmianie, gdyż nie dochodzi do zmiany w genie *VH-D-JH* kodującym obszar zmienny przeciwciała. L — sekwencja liderowa, E — wzmacniacz (enhancer) regulujący transkrypcję, S — sekwencje przełączania klasy (switching), odrębne dla różnych genów C kodujących łańcuchy ciężkie: μ , δ , $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ , α [2]

eksonu $C\delta$, znajduje się układ powtarzających się sekwencji zwanych regionami przełączania klasy (S — switching). Regiony S zawarte w poszczególnych eksonach CH różnią się między sobą. Ich długość wynosi 2–10 kb. Rekombinacji delecyjnej, leżącej u podstaw zjawiska przełączania klasy, podlegają introny, a więc sekwencje nie ulegające transkrypcji. Zatem rekombinacja taka nie powoduje zmian w odczytywaniu sekwencji przepisywanych. Jak przedstawiono na rys. 11, limfocyt B, który produkuje przeciwciała pod kontrolą genów *VH/D/JH* połączonych z genami C_μ i C_δ , w obecności swego antygeny oraz pewnych limfokin wydzielanych przez limfocyty T (np. IL-4 lub $INF\gamma$) reorganizuje swój DNA, doprowadzając do połączenia nie zmienionego regionu *VH/D/JH* z innym genem CH (np. $C_{\gamma 2b}$), poprzedzonym odpowiednią

sekwencją S. Leżące pomiędzy miejscem nowego połączenia eksony i introny ulegają wycięciu, a więc komórka nigdy w przyszłości nie będzie mogła produkować klasy przeciwciał, dla których eksony zostały wyeliminowane (na rys. 11, IgM, IgD, IgG3, IgG1). Przeorganizowany DNA ulega transkrypcji. Następnie wycinane są introny i powstaje informacyjny RNA dla łańcuchów ciężkich, na rys. 11 klasy IgG2b. Zjawisko „switching” ma duże znaczenie fizjologiczne, gdyż zmianie izotypu przeciwciała towarzyszy zmiana właściwości biologicznych produkowanych immunoglobulin, a zatem rozszerzeniu ulega zakres procesów, w których przeciwciała mogą brać udział. Zwłaszcza że przełączenie izotypu nie musi być wydarzeniem jednostkowym. Komórka może powtórnie reorganizować DNA, przedstawiając się na produkcję następnej klasy immunoglobulin, jakkolwiek tylko w kierunku „downstream” (na rys. 11, na produkcję Ig2a, IgE lub IgA).

Występowanie w linii zarodkowej licznych genów dla regionów zmiennych immunoglobulin jest główną, ale nie jedyną przyczyną ogromnej heterogenności tych białek. Powodem dalszego ich zróżnicowania jest możliwość łączenia każdego łańcucha ciężkiego H z każdym łańcuchem lekkim, κ lub λ . Przyjmując istnienie 200 genów *VH*, 12 genów *D* i 6 genów *JH* (razem 218 genów), następnie 200 genów *V κ* i 5 genów *J κ* (razem 205 genów) oraz 40 genów *V λ* , 6 genów *J λ* i prawdopodobnie 6 genów *CL* (razem 52 genów), można przewidywać istnienie około 35×10^6 różnych cząsteczek immunoglobulin. Możliwość dalszego zróżnicowania immunoglobulin wynika z faktu pewnej niestałości pozycji łączenia segmentów *V* i *J* oraz *V*, *D* i *J*, co może powodować pewną zmienność pozycji aminokwasów w produkowanych immunoglobulinach (zmienność łączenia — junctional diversity). Ponadto w wyniku działania terminalnych transferaz deoksynukleotydowych, pewne układy nukleotydów mogą ulegać insercji w miejsca połączeń *V-D* lub *D-J* (zmienność insercyjna — insertional diversity). Zmienność taka dotyczy głównie regionów nadzmienności, decydujących o powinowactwie immunoglobulin do determinantów antygenowych. Wreszcie geny *V* poszczególnych limfocytów B mogą ulegać punktowej mutacji somatycznej. Sądzi się, że zjawisko to leży u podstaw obserwowanego wzrostu powinowactwa przeciwciał podczas przechodzenia odpowiedzi humoralnej pierwotnej w odpowiedź wtórną.

WIESŁAWA RUDNICKA

THE STRUCTURE OF IMMUNOGLOBULINS

S u m m a r y

A short definition of antibodies is followed by the essentials on the relation of antibody structure to antigenic specificity (idiotypes) and biological activity. On this ground the unique genetic mechanism responsible for enormous diversity of immunoglobulins is presented. Finally, the process of the regulation of immunoglobulin gene expression is discussed.

LITERATURA

1. Benjamini E., Leskowitz S. — *Immunology: a short course*, A. J. Willey and Sons Inc. Publ., 49–65, 83–95, 1991.
2. Blackwell T. K., Alt F. W. — Immunoglobulin genes. [W] *Molecular Immunology* (red. B. D. Hames i D. M. Glover) IRL Press, Oxford, 1–60, 1989.
3. Brüggemann M., Winter G., Waldmann H., Neuberger M. S. — *The immunogenicity of chimaeric antibodies*. J. Exp. Med. 170: 2153–2157, 1989.
4. Edelman G. M., Cunningham B. A., Gall W. E., Gottlieb P. D., Rutishauser U., Waxdal M. J. — *The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63: 78–85, 1969.
5. Feinstein A. — *The three dimensional structure of immunoglobulins*. [W] *The immune system; a course of the molecular and cellular basis of immunity* (red. M. J. Hobart i Ian McConnell) Blackwell Sci. Publ., Oxford, s. 30, 1976.
6. Güssow D. — *Cloning for expression of immunoglobulin variable region genes and generation of variable region gene repertoires*. Behring Inst. Res. Com. 87: 25–32, 1990.
7. Köhler G., Milstein C. — *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256: 495–497, 1975.
8. Korsmeyer S. J., Bakhshi A., Arnold A., Siminovitch K. A., Waldmann T. A. — *Genetic rearrangements of human immunoglobulin genes*. [W] *The biology of idiotypes* (red. Mark I. Greene i Alfred Nisonoff) Plenum Press. New York, 75–96, 1984.
9. Plückthun A., Glockshuber R., Skerra A., Stadlmüller J. — *Properties of Fv and Fab fragments of the antibody McPC603 expressed in E.coli*. Behring Inst. Res. Comm. 87: 48–55, 1990.
10. Poljak R. J., Amzel L. M., Avey H. P., Chen B. L., Phizackerley R. P., Saul F. — *Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3305–3310, 1973.
11. Ptak W. — *Podstawy immunologii*. PZWL, Warszawa, 18–24, 27–30, 34–41, 1987.
12. Roitt I. — *Essential Immunology*. Blackwell Sci. Publ., 7 wyd., Oxford, Chapter 3: 31–54, 1988.
13. Shimizu A., Honjo T. — *Immunoglobulin class switching*. Cell. 36: 801–803, 1984.
14. Ślopek S. — *Immunoglobuliny*. [W] *Immunologia* (red. S. Mackiewicz) PZWL, Warszawa, 71–78, 1991.
15. Tonegawa S. — *Somatic generation of antibody diversity*. Nature 302: 575–581, 1983.
16. Winter G. — *Gene technologies for antibody engineering*. Behring Inst. Res. Comm. 87: 10–20, 1990.

WIESŁAWA RUDNICKA
MAGDALENA CHMIELA

Katedra Immunologii
Zakład Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź

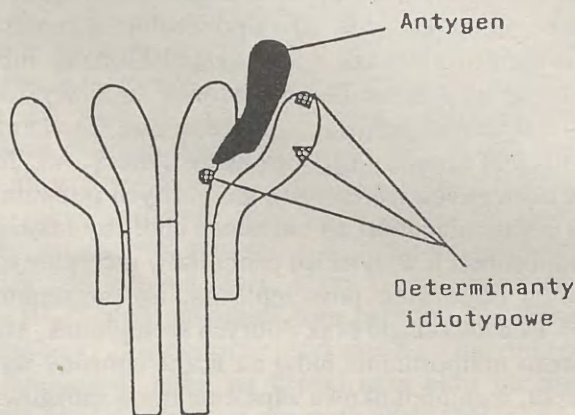
PERSPEKTYWY UŻYCIA SZCZEPIONEK IDIOTYPOWYCH W PROFILAKTYCE CHOROÓB ZAKAŻNYCH

Szczepienia profilaktyczne to najbardziej skuteczny sposób zapobiegania chorobom zakaźnym. Jednak efekt szczepień ochronnych zależy przede wszystkim od jakości posiadanej szczepionki. Spośród stosowanych dotąd u ludzi szczepionek tzw. klasycznych, zawierających: a) żywe, nieznajdliwe drobnoustroje, np. szczepionka BCG wzbudzająca odporność na gruźlicę, niektóre szczepionki wirusowe chroniące przed zachorowaniem na odrę, porażenie dziecięce, różyczkę, b) zabite drobnoustroje, np. szczepionka chroniąca przed zachorowaniem na krztusiec, cholera, tyfus, c) odpowiednio spreparowane produkty metabolizmu drobnoustrojów, takie jak toksoid błonicy lub tężcowy, tylko nieliczne okazały się w pełni skuteczne. Można tutaj wymienić szczepionkę chroniącą przed zachorowaniem na ospę naturalną, zawierającą żywy wirus krowianki, lub toksoid błonicy zapobiegający dyfterytowi. Jednak większość spośród obecnie dostępnych szczepionek klasycznych pozwala tylko w ograniczonym stopniu uodparniać ludzi na określone choroby zakaźne, nie wzbudzając skutecznej odporności u wszystkich osobników szczepionych lub indukując tylko krótkotrwałą odporność poszczepienną, np. szczepionka choleryczna (*Vibrio cholerae*). Ponadto ciągle brak dobrych szczepionek, które mogłyby być użyte do masowego uodporniania ludzi na liczne choroby wywoływane przez bakterie (rzeżączka, meningokokowe zapalenie opon mózgowych, pneumokokowe zapalenie płuc, chlamydiozy, infekcje jelitowe), wirusy (grypa, AIDS), pasożyty zwierzęce (trypanosomioza, schistosomioza) lub grzyby chorobotwórcze. Dlatego obecnie próbuje się opracować szczepionki nowej generacji: szczepionki rekombinacyjne, konstruowane metodami inżynierii genetycznej, szczepionki będące syntetycznymi peptydami lub szczepionki idiotypowe.

IDIOTYPY I ANTYIDIOTYPY

Cząsteczki przeciwciał wykazują dualizm czynnościowy polegający na tym, iż z jednej strony są to białka mające struktury komplementarne do deter-

minantów antygenowych (epitopów), umożliwiające im swoiste wiązanie się z nimi. Z drugiej strony, jako cząsteczki białkowe o wysokiej masie (przynajmniej 140 kDa), są one same w sobie silnymi antygenami, które mogą być rozpoznawane przez swoiste w stosunku do nich przeciwciała. Dzięki przypadkowej, antygenowo niezależnej, reorganizacji złożonego układu genów dla syntezy immunoglobulin, zachodzącej podczas różnicowania się limfocytów B, receptory immunoglobulinowe pojedynczego limfocyta B oraz jego komórek potomnych (klonu komórkowego), a także produkowane przez takie komórki cząsteczki przeciwciał mają szczególne struktury, odmienne w różnych klonach komórkowych. Znakomita większość takich struktur zlokalizowana jest w tzw. regionach nadmienności tworzących miejsca wiązania determinantów antygenowych (paratopy) w cząsteczkach przeciwciał. Takie struktury, poza tym, że wyznaczają swoistość przeciwciał w ich reakcjach z antygenami, same są motywem antygenowym rozpoznawanym przez receptory immunoglobulinowe limfocytów B, które w odpowiednich warunkach produkują przeciwciała swoiście skierowane przeciwko takim strukturom. Struktury cząsteczek przeciwciał, determinujące ich właściwości antygenowe, noszą nazwę idiotopów, a ich zbiór stanowi wzór idiotypowy (Id) cząsteczek immunoglobulin. Przeciwciała komplementarne w stosunku do idiotypów noszą nazwę przeciwciał antyidiotypowych albo antyidiotypów (anty Id) (rys. 1).

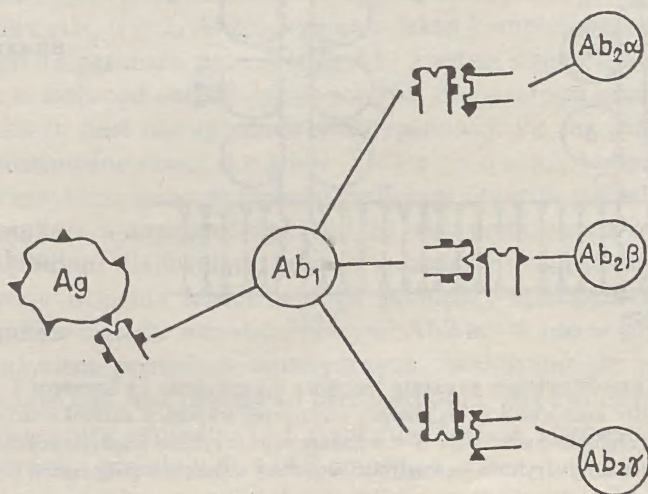


Rys. 1. Schemat cząsteczki immunoglobuliny

Na biologiczne znaczenie oddziaływań idiotyp – antyidiotyp po raz pierwszy zwrócił uwagę J e r n e (1973), przedstawiając hipotezę sieci idiotypowych oddziaływań międzykomórkowych (idiotypic network). Zgodnie z tą hipotezą, wnikający do organizmu antygen indukuje produkcję przeciwciał pierwszej generacji Ab_1 (Ab – antibody, czyli przeciwciało), mających idiotypy Id 1, identyczne w cząsteczkach monoklonalnych przeciwciał, ale różne w cząstecz-

kach immunoglobulin poliklonalnych, będących produktem różnych klonów komórek B. Idiotypy te są rozpoznawane przez limfocyty B, które podejmują produkcję przeciwciał antyidiotypowych (przeciwciała drugiej generacji) swoistych w stosunku do Id1. Z kolei idiotypy przeciwciał Ab_2 (Id_2) pobudzają produkcję przeciwciał anty-antyidiotypowych Ab_3 , które są już przeciwciałami 3 generacji.

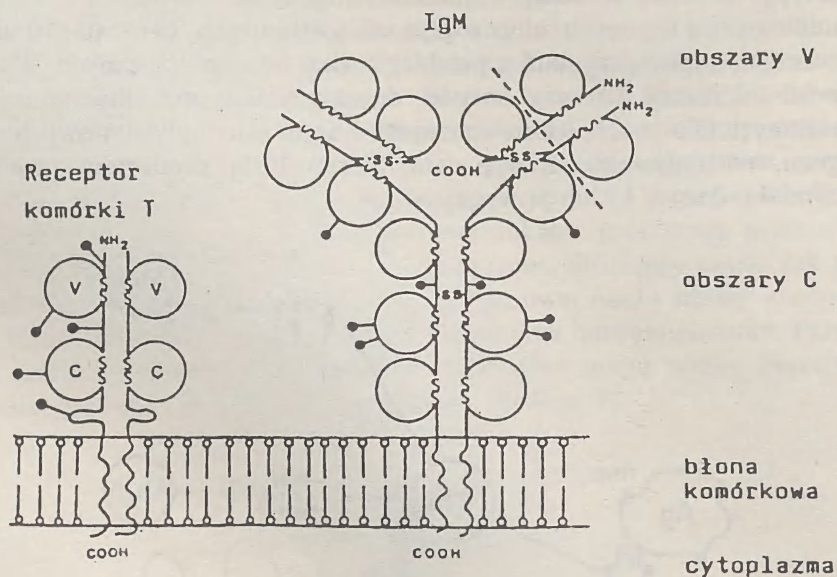
Powstające w organizmie idiotypy i swoiste w stosunku do nich anty-idiotypy wchodzi z sobą w interakcje, albo na powierzchni komórek immunologicznie czynnych, albo w płynach ustrojowych, tworząc sieć idiotypowo-antyidiotypową regulującą przebieg reakcji immunologicznych. W zależności od lokalizacji Id oraz anty-Id, intensywności produkcji przeciwciał o określonych idiotypach, ich powinowactwa do Id lub dopływu nowych porcji antygeny, oddziaływania idiotyp-antyidiotyp będą promować produkcję przeciwciał o danym Id lub ją wygaszać.



Rys. 2. Kaskada idiotypowa. Epitop obcego antygeny ($\blacktriangle$) indukuje odpowiedź immunologiczną wyrażającą się produkcją przeciwciał Ab_1 . Przeciwciała Ab_1 wywołują odpowiedź anty-idiotypową, której skutkiem jest wytworzenie różnych przeciwciał Ab_2 : $Ab_{2\alpha}$ – rozpoznających idiotyp przeciwciała Ab_1 związany ze szkieletem ($\blacksquare$) i w związku z tym nie mających zdolności hamowania reakcji zachodzącej pomiędzy takim przeciwciałem a antygenem; $Ab_{2\beta}$ – odwzorowujących epitop obcego antygeny; $Ab_{2\gamma}$ – rozpoznających idiotyp przeciwciała Ab_1 związany z miejscem wiążącym antygen, mogących hamować reakcję takiego przeciwciała z antygenem ($\bullet$) [13]

Pewne przeciwciała antyidiotypowe Ab_2 hamują reakcje epitopów antygenowych z paratopami cząsteczek przeciwciał. Zależy to przede wszystkim od położenia idiotopu w cząsteczce przeciwciała. Jeśli obszar idiotopu nakłada się na obszar miejsca wiązania antygeny (paratopu) w cząsteczce immunoglobuliny (rys.2, $Ab_{2\gamma}$), przeciwciała antyidiotypowe będą hamować reakcję

takich przeciwciał ze swoistym antygenem. Natomiast związanie się antyidiotypowych przeciwciał ze strukturą idiotypową leżącą poza obszarem paratopu nie będzie kolidować z funkcją wiązania antygeny przez cząsteczkę immunoglobuliny (rys.2, Ab_{2a}). Z kolei pewne przeciwciała Ab_2 (rys.2, Ab_β) będą odwzorowywać trójwymiarową strukturę epitopu antygeny, który indukował powstanie przeciwciał Ab_1 . Prezentują one wewnętrzny obraz determinantu antygenowego i z tego względu mogą być użyte jako szczepionki idiotypowe.



Rys. 3. Schemat przedstawiający strukturę receptora dla antygeny na komórce T oraz immunoglobulinowy receptor komórki B. V — obszary o zmiennej sekwencji aminokwasów; C — obszary o stałej sekwencji aminokwasów; —S—S— — wiązania sulphydrylowe międzyłańcuchowe; SS — wiązania sulphydrylowe wewnątrzłańcuchowe; — — miejsca glikozylacji [15]

Oddziaływania Id—anty-Id dotyczą nie tylko limfocytów B mających receptory immunoglobulinowe jako jednostki rozpoznające antygeny, ale regulują również reaktywność limfocytów T. Wynika to z tego, iż receptory dla antygeny obecne na limfocytach T, w pewnej części (właściwy receptor dla antygeny komórki T) wykazują strukturalne podobieństwo do immunoglobulinowego receptora limfocyty B (rys.3). Występowanie takiego podobieństwa świadczy o pokrewieństwie ewolucyjnym receptorów dla antygenów obecnych na komórkach T lub B oraz immunoglobulin. Jakkolwiek trzeba podkreślić, iż synteza receptorów komórek T i komórek B odbywa się pod kontrolą całkowicie niezależnych układów genów. Receptory dla antygeny stwierdzane na komórkach T, podobnie jak powierzchniowe immunoglobuliny limfocy-

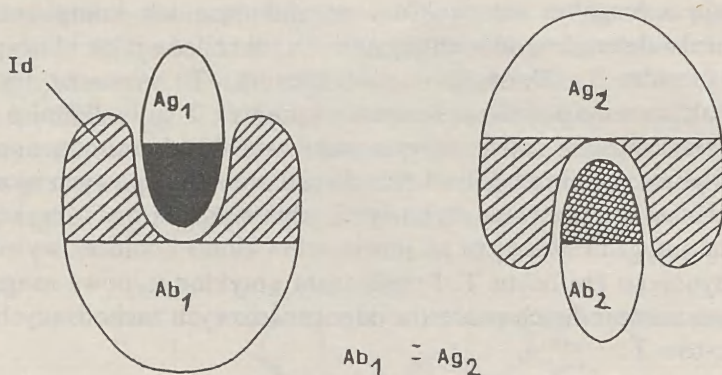
tów B, mają szczególne im struktury warunkujące ich komplementarność w stosunku do determinantów antygenowych, określane jako idiotypy receptorów limfocytów T. Zbiór idiotopów komórki T wyznacza jej idiotyp. Podobnie jak immunoglobuliny, receptory komórek T są białkami o wysokiej masie cząsteczkowej, a zatem są one same w sobie immunogenne i mogą indukować powstawanie swoistych przeciwciał antyidiotypowych nazywanych często przeciwciałami antyklonotypowymi, gdyż wchodzi one w reakcje z receptorami dla antygenów obecnymi na powierzchni klonu komórek wywodzących się z pojedynczego limfocyta T. Przeciwciała antyklonotypowe mogą regulować przebieg różnorodnych procesów odpornościowych zachodzących z udziałem limfocytów T.

SZCZEPIONKI IDIOTYPOWE

Odzworowywanie determinantów antygenowych przez pewne przeciwciała antyidiotypowe Ab₂ (rys.2, Ab2β) wynika z faktu komplementarności epitopu antygenowego do paratopu przeciwciała Ab₁ z jednej strony oraz z dopasowania pewnych przeciwciał antyidiotypowych Ab₂ do paratopu immunoglobuliny Ab₁. Zjawisko to nosi nazwę mimikry antygenowej. Po raz pierwszy zostało ono udokumentowane przez *Sege i Petersona*. Autorzy ci uzyskali przeciwciała antyidiotypowe przeciwko bydlęcym przeciwciałom skierowanym przeciwko insulinie, a następnie wykazali, że takie przeciwciała reagują z tkankowymi receptorami dla insuliny, pełniąc w rzeczywistości jej funkcję. Bezpośrednie dowody istnienia ścisłej analogii pomiędzy epitopem antygenowym i pewnymi przeciwciałami antyidiotypowymi Ab2 uzyskano w pracach prowadzonych z użyciem peptydów syntetycznych. Wykazano, że pewne monoklonalne przeciwciała Ab2 przeciwko przeciwciałom Ab1 swoistym w stosunku do immunodominatu peptydu GAT (Glu Ala Tyr), w segmencie D łańcucha ciężkiego wykazują podobny do GAT epitop.

Ideę wykorzystania przeciwciał antyidiotypowych Ab odwzorowujących determinanty antygenowe jako szczepionek przedstawili *Nisonoff i Lamoyi*. Możliwość taka nabiera szczególnego znaczenia w przypadku opracowania szczepionek wzbudzających odporność na drobnoustroje nie dające się namnażać w warunkach *in vitro* (np. prątki trądu, krętki blade kiły), na antygeny toksyczne lub trudne do wyizolowania w czystej, a zarazem biologicznie aktywnej postaci. Wykorzystanie przeciwciał antyidiotypowych stwarza również teoretyczne podstawy wzbudzania przeciwciał o lepszych parametrach biologicznych niż właściwości przeciwciał indukowanych przez syntetyczne peptydy, które często nie odzwierciedlają trzeciorzędowej struktury natywnego antygenu drobnoustroju i nie wzbudzają pożądanej odporności.

Ochronne działanie szczepionek idiotypowych może polegać na pobudzaniu w organizmie produkcji przeciwciał neutralizujących czynniki infekcyjne lub szkodliwe produkty metabolizmu drobnoustrojów albo na aktywacji



Rys. 4. Schemat obrazujący zjawisko mimikry antygenowej. Obcy antygen Ag_1 , wnikający do organizmu pobudza produkcję przeciwciał Ab_1 o określonym idiotypie (Id). Przeciwciała takie, same stanowiąc antygen (Ag_2), indukują odpowiedź antyidiotypową, w wyniku której produkowane są przeciwciała antyidiotypowe Ab_2 . Przeciwciała takie mogą być skierowane przeciwko części wiążącej antygen w przeciwciele Ab_1 . Idiotyp takich przeciwciał naśladuje wówczas trójwymiarową strukturę determinantu antygeny Ag_1 , wzbudzającego odpowiedź. Wynika z tego, iż przeciwciało odwzorowujące strukturę antygeny, może zastępować go w stymulacji odporności humoralnej

limfocytów T odpornościowych, które przyspieszają eliminację drobnoustrojów w reakcjach odporności komórkowej. Możliwe jest również jednoczesne pobudzanie przeciwwskazanej odporności humoralnej i komórkowej przez przeciwciała antyidiotypowe.

W doświadczeniach prowadzonych na modelach zwierzęcych udało się przygotować szczepionki idiotypowe dla takich wirusów, jak hepatitis typu B (wirusowego zapalenia wątroby), herpes simplex (opryszczki), rabies (wścieklizny), poliomyelitis typu II (porażenia dziecięcego), reowirusów typu III (wirusowego zapalenia mózgu).

Wyselekcjonowane przeciwciała antyidiotypowe Ab_2 pobudzały produkcję przeciwciał swoiście reagujących z antygenami wymienionych wirusów u zwierząt, które nigdy przedtem nie były zakażane lub uodporniane takimi wirusami. Przykładowo opisano królicze przeciwciało Ab_2 , które nie tylko, że indukowało u myszy produkcję przeciwciał neutralizujących wirus hepatitis typu B i wchodziło w reakcję z przeciwciałami Ab_1 produkowanymi przez różne gatunki zwierząt w odpowiedzi na antygen powierzchniowy wirusa, ale wykazywało również działanie protekcyjne u szympanсів, zwierząt, które podobnie jak ludzie są naturalnie podatne na zakażenie wirusem hepatitis typu B. Natomiast właściwości protekcyjnych nie obserwowano u zwierząt otrzymujących antyidiotypowe przeciwciała Ab_2 , skierowane przeciwko przeciwciałom swoistym w stosunku do antygenów wirusa polio lub wirusa wścieklizny, jakkolwiek u takich zwierząt dochodziło do produkcji przeciwciał neutralizujących wymienione wirusy *in vitro*.

W świetle wykorzystania przeciwciał antyidiotypowych Ab_2 jako szczepionek interesujące okazało się pewne monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko idiotypom monoklonalnego przeciwciała swoistego w stosunku do hemaglutyniny reowirusów typu III. Hemaglutynina ta jest antygenem wirusa odpowiedzialnym za jego tropizm i wiązanie się do receptorów wrażliwych na działanie wirusa komórek. Ponadto hemaglutynina ta jest antygenem protekcyjnym, wzbudzającym u zakażonych wirusem osobników rozwój swoistej odporności adaptacyjnej, komórkowej i humoralnej. Wykazano istnienie pewnej homologii sekwencji aminokwasów określonego regionu hemaglutyniny reowirusów typu III i fragmentu omawianego przeciwciała antyidiotypowego Ab_2 . Przeciwciało to, w warunkach *in vitro*, wiąże się z receptorem komórkowym dla wirusa, hamując jego wiązanie się do wrażliwych komórek. W warunkach *in vivo* pobudza ono produkcję przeciwciał Ab_1 podobnych, reagujących z hemaglutyniną reowirusa i indukuje rozwój przeciwwirusowej odporności komórkowej u myszy.

Próby użycia szczepionek idiotypowych podejmuje się również w celu wzbudzania odporności humoralnej na zakażenia bakteriami, których zjadliwość zależy od powierzchniowych antygenów polisacharydowych, np. stanowiących materiał otoczek pneumokoków (*Streptococcus pneumoniae*) lub meningokoków (*Neisseria meningitidis*) czy antygenów pokrywowych pałeczek jelitowych. Odporność na zakażenia takimi bakteriami uzależniona jest od produkcji swoistych przeciwciał przeciwko polisacharydom. Jednak wyodrębnione polisacharydy bakteryjne są często słabymi induktorami odpowiedzi humoralnej. W wielu przypadkach są to antygeny grasicznie niezależne, indukujące tylko słabą pamięć immunologiczną, której wytworzenie jest podstawowym celem szczepień profilaktycznych. Użycie przeciwciał antyidiotypowych Ab_2 , odwzorowujących przestrzenną strukturę determinantów antygenów polisacharydowych bakterii, pozwoliłoby wzbudzać silną odpowiedź humoralną grasiczozależną. Następowaloby w tym przypadku imitowanie polisacharydowego antygeny grasicznie niezależnego przez przeciwciało antyidiotypowe Ab_2 będące białkiem, a więc antygenem grasiczozależnym. Postępowanie takie wydaje się o tyle uzasadnione, iż niemożliwe jest zastosowanie technik rekombinacyjnych w przygotowywaniu szczepionek polisacharydowych.

Jakkolwiek idea odwzorowywania determinantów antygenów polisacharydowych przez przeciwciała antyidiotypowe Ab_2 może wydać się zaskakująca, praktyka wykazała możliwość realizacji takiego zamysłu. Opisano przeciwciała antyidiotypowe Ab_2 , które indukują powstawanie przeciwciał Ab_1 -podobnych, swoistych w stosunku do polisacharydów powierzchniowych paciorkowców ropotwórczych (*Streptococcus pyogenes* grupy A). Otrzymano antyidiotypowe przeciwciała Ab_2 stymulujące produkcję przeciwpolisacharydowych przeciwciał bakteriologicznych dla dwoinek zapalenia opon mózgowych (*N. meningitidis*). Z kolei antyidiotypowe przeciwciało przeciwko przeciwciału skierowanemu przeciwko polisacharydowi pokrywowemu pałeczek okrężnicy

(*Escherichia coli* K-13) chroniło myszy przed namnażaniem się w nich tych bakterii.

Użycie przeciwciał antyidiotypowych rozpatrywane jest również jako metoda wzbudzania odporności przeciwzakaźnej przeciwko bakteriom należącym do grupy wewnątrzkomórkowych patogenów (prątki gruźlicy, prątki trądu, pałeczki *Listeria* lub *Brucella*, *Chlamydia*). Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom takich bakterii nie działają lub działają bardzo słabo protekcyjnie, gdyż nie mogą one uszkadzać bakterii rozwijających się wewnątrz komórek. W przypadku zakażeń takimi drobnoustrojami rolę ochronną pełnią mechanizmy odporności komórkowej. Ten rodzaj odporności zakaźnej jest skutecznie pobudzany raczej przez żywe niż przez zabite bakterie. Jednak stosowanie żywych, oczywiście niejadliwych (osłabionych, atenuowanych) drobnoustrojów, takich jak np. szczep BCG, wiąże się z pewnym ryzykiem rewersji szczepu atenuowanego do formy zjadliwej. Okazało się jednak, że antyklonotypowe przeciwciała skierowane przeciwko przeciwciałom pierwszej generacji, swoistym w stosunku do receptorów limfocytów T rozpoznających antygeny bakterii, mogą aktywować limfocyty T, stymulując rozwój komórkowej odporności protekcyjnej. W ten sposób udało się wzbudzić odporność myszy na zakażenie *Listeria monocytogenes*. Podobnie monoklonalne przeciwciało Ab₂, skierowane przeciwko przeciwciału Ab₁ reagującemu z antygenem białkowym prątków gruźlicy, stymulowało proliferację limfocytów T, a poliklonalne przeciwciało Ab₂ przeciwko przeciwciałom o swoistości dla antygenów *Brucella abortus* (pałeczka zakaźnego ronienia bydła) wykazywało działanie protekcyjne u myszy.

Pobudzanie limfocytów T przez przeciwciała antyidiotypowe lub antyklonotypowe może odbywać się przynajmniej na dwóch drogach. Przeciwciała takie, podobnie jak antygeny białkowe, mogą podlegać przetwarzaniu (processing) i następnie być rozpoznawane przez receptory limfocytów T, łącznie z antygenami klasy II lub I układu MHC. W tym przypadku aktywacja limfocytów T przez przeciwciała antyidiotypowe Ab₂ podlegałaby restrykcji antygenów MHC. Stwierdzono to w przypadku wspomnianych już przeciwciał Ab₂ o swoistości dla antygenów prątków gruźlicy lub reowirusów. Inna możliwość to aktywacja limfocytów T w wyniku krzyżowego wiązania receptorów tych komórek przez przeciwciała Ab₂. Ta droga aktywacji jest niezależna od ekspresji antygenów układu MHC i na tej drodze działają prawdopodobnie przeciwciała klonotypowe, np. opisane przeciwciała chroniące przed listeriozą.

Przeciwciała antyidiotypowe Ab₂ próbowano również użyć w celu wywołania odporności na pasożyty zwierzęce. Otrzymano przeciwciało Ab₂ chroniące szczury przed rozwojem przywr *Schistosoma mansoni* oraz przeciwciała Ab₂ wykazujące działanie protekcyjne u myszy zakażanych *Trypanosoma brucei rodesiens* (świdrowiec śpiączki afrykańskiej).

Dotychczasowe doświadczenia z przeciwciałami antyidiotypowymi Ab₂ wskazują, że tylko niektóre z nich pobudzają odporność protekcyjną, zwłaszcza

jeśli podawane są bez adiuwantów. Natomiast niektóre Ab_2 pobudzają mechanizmy supresyjne i hamują np. powstawanie przeciwciał pierwszej generacji. Takie przeciwciała mogą wręcz zwiększać podatność organizmu na zakażenie określonym drobnoustrojem. Stanowi to pewne ryzyko w zastosowaniu przeciwciał antyidiotypowych jako szczepionek i wskazuje na konieczność skrupulatnego sprawdzania ich właściwości przed ewentualnym ich wykorzystaniem. Przydatne w praktyce przeciwciała Ab_2 muszą być rozpoznawane przez limfocyty B i/lub T osobników o różnorodnym podłożu genetycznym, i to w sposób prowadzący do aktywacji limfocytów w pożądanym kierunku. Efekt działania przeciwciał antyidiotypowych Ab_2 zależy w istotnym stopniu od ich dawki oraz wieku biorcy takich przeciwciał. Na ogół przeciwciała antyidiotypowe są bardziej aktywne u młodych niż u starszych osobników, u których repertuar antygenowy limfocytów jest już ustalony. Ponadto, o ile niskie dawki Ab_2 działają raczej protekcyjnie, o tyle dawki wyższe często dają efekt supresyjny.

WIESŁAWA RUDNICKA, MAGDALENA CHMIELA

THE PERSPECTIVE OF USING IDIOTYPIC VACCINES FOR INFECTIOUS DISEASES

S u m m a r y

The concept that the immune response to an antigen can be regulated by a series of idio-anti-idiotypic reactions (idiotypic network) was proposed by Jerne in 1974. Since then a great progress in the understanding of the idio-anti-idiotypic nature and genetics has been made. It has been also found that, because of complementarity between the antigen (antigenic determinant) and the antibody (paratop), some anti-idiotypic antibodies represent the internal image of the antigen. Such anti-idiotypic antibodies can mimic the antigenic determinant and trigger the host's immune response into producing antibodies by injecting anti-idiotypic antibodies alone. If the antigen represents an infectious agent anti-idiotypic antibodies may induce immunity in a host who has never been exposed to the infectious agent. Experimental idio-anti-idiotypic vaccines produced till now are presented. Advantages and disadvantages of anti-idiotypic vaccines are discussed.

LITERATURA

1. Beauclair K. D., Khansari D. N. — *Protection of mice against Brucella abortus by immunization with polyclonal anti-idiotypic antibodies*. Immunobiol. 180: 208—220, 1990.
2. Bhogal B. S., Nollstadt K. H., Karkhanis Y. D., Schmatz D. M., Jacobson E. B. — *Anti-idiotypic antibody with potential use as an Eimeria tenella sporozoite antigen surrogate for vaccination of chickens against coccidiosis*. Infect. Immun. 56: 1113—1119, 1988.
3. Binz H., Frischknecht H., Shen F., Wigzell H. — *Idiotypic determinants on T cell subpopulations*. J. Exp. Med. 149: 910—922, 1979.
4. Caccia N., Mak T. W. — *T cell receptors*. [W] *T cells* (red. Feldmann M., Lamb J.) Wiley Intersci. Publ., New York, 39—73, 1989.

5. Cerny J., Smith J.S., Webb C., Tucker P.W. — *Properties of anti-idiotypic T cell lines propagated with syngeneic B lymphocytes*. J. Immunol. 141: 3718–3725, 1988.
6. Chmiela M., Rudnicka W. — *Induction of acquired resistance to Listeria monocytogenes infection by administration of antilisterial immunoglobulins*. Spr. Meet. Brit. Soc. Immunol. Londyn, 1.13, 1991.
7. Eichmann K. — *Idiotypic suppression. Influence of dose and of the effector functions of anti-idiotypic antibody on the production of an idiotypic*. Eur. J. Immunol. 4: 296–301, 1974.
8. Eichmann K., Emrich F., Kaufmann S.H.E. — *Idiotypic vaccination: consideration towards a practical application*. CRC Press, 1987.
9. Fey K., Simon M.M., Melchers I., Eichmann K. — *Quantitative estimates of diversity, degeneracy and connectivity in an idiotypic network among T cells*. [W] *The biology of idiotypes*. (red. Green M.I., Nisonoff A.), Plenum Press, New York, 261–277, 1984.
10. Gałązka A. — *Kierunki badań nad szczepionkami bakteryjnymi*. [W] *Szczepienia ochronne* (red. Dębiec B., Magdzik W.), PZWL, Warszawa, 39–55, 1991.
11. Gorczynsky R.M. — *Effect of neonatal injection with antibodies to Leishmania mexicana on its growth in adult infected mice*. Infect. Immun. 56: 1376–1381, 1988.
12. Greenspan N.S., Monafó W.J., Davide J.M. — *Interaction of IgG3 anti-streptococcal group A carbohydrate (GAC) antibody with streptococcal group A vaccine: enhancing and inhibiting effects of anti-GAC, anti-isotypic, and anti-idiotypic antibodies*. J. Immunol. 138: 285–292, 1987.
13. Hiernaux J.R. — *Idiotypic vaccines and infectious diseases*. Infect. Immun. 56: 1407–1413, 1988.
14. Julius M.H., Cosenza M., Augustin A.A. — *Evidence for endogenous production of T cell receptors bearing idiotypic determinants*. Eur. J. Immunol. 8: 484–491, 1978.
15. Kabat E.A. — *Idiotypic determinants, minigenes and the antibody combining site*. [W] *The biology of idiotypes* (red. Green M.I., Nisonoff A.), Plenum Press, New York, 3–17, 1984.
16. Kańtoch M. — *Kierunki badań nad szczepionkami wirusowymi*. [W] *Szczepienia ochronne* (red. Dębiec B., Magdzik W.), PZWL, Warszawa, 56–63, 1991.
17. Kato T., Takazoe I., Okuda K. — *Protection of mice against the lethal toxicity of a lipopolysaccharide (LPS) by immunization with anti-idiotypic antibody to a monoclonal antibody to lipid A from Eikenella corrodens LPS*. Infect. Immun. 58: 416–420, 1990.
18. Krzymański M. — *Znaczenie interakcji między idiotypem i antyidiotypem dla regulacji odpowiedzi immunologicznej*. Immunol. Pol. 8: 3–13, 1983.
19. Poljak R.J. — *Idiotypic markers and the three-dimensional structure of immunoglobulins*. [W] *The biology of idiotypes* (red. Green M.I., Nisonoff A.), Plenum Press, New York, 131–139, 1984.
20. Roitt I. — *Essential immunology* — Blackwell Sci. Publ. 7 wyd. Oxford, rozdz.3, 31–54, 1988.
21. Sachs D.H., El-Gamil M., Miller G. — *Genetic control of the immune response to staphylococcal nuclease. Effects of in vivo administration of anti-idiotypic antibodies*. Eur. J. Immunol. 11: 509–516, 1981.
22. Velge-Roussel F., Verwaerde C., Grzych J.M., Auriault A., Capron A. — *Protective effects of anti-anti-idiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26-kilodalton Schistosoma mansoni antigen*. J. Immunobiol. 142: 2527–2532, 1989.
23. Zembala M. — *Immunoregulacja*. [W] *Immunologia* (red. Mackiewicz S.), PZWL, Warszawa, 171–191, 1986.

MICHAŁ ZIMECKI

Laboratorium Immunobiologii

Zakład Immunobiologii

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Wrocław

CYTOKINY W REGULACJI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Celem swoistej odpowiedzi immunologicznej na wtargnięcie obcego antygeny (bakterii, wirusów, produktów bakteryjnych, pasożytów, alergenów) jest wytworzenie mechanizmów obronnych prowadzących do eliminacji antygeny z ustroju oraz wytworzenie swoistej pamięci immunologicznej, która warunkuje znacznie silniejszą odpowiedź wtórną na ponowną penetrację tego samego antygeny. Odpowiedź immunologiczna rozpoczyna się fazą indukcji, w tym przetworzenia (degradacji) antygeny oraz prezentacji jego fragmentów w asocjacji z produktami antygenów MHC (główny region zgodności tkankowej) klasy II komórkom T mającym receptor o odpowiedniej swoistości antygenowej [17]. Istnieje wiele typów komórek zdolnych do prezentacji antygeny, w tym: monocyty, makrofagi ze śledziony, płuc, jamy otrzewnowej, wątroby, komórki dendryczne, komórki Langerhansa oraz komórki B [57], których rola w tym procesie jest ostatnio szczególnie podkreślana. Wszystkie typy komórek prezentujących antygen charakteryzują się, oprócz ekspresji antygenów MHC II klasy, zdolnością do dostarczania komórkom T sygnałów dodatkowych w formie cytokin [29]. W zależności od natury antygeny i drogi jego wprowadzenia, już po upływie kilku dni (3—5) pojawiają się w narządach limfatycznych, a głównie w śledzionie, komórki produkujące przeciwciała początkowo klasy IgM, a później IgG. Pewne typy antygeny oraz wrota inwazji warunkują powstanie lokalnej odpowiedzi immunologicznej charakteryzującej się obecnością przeciwciał typu IgA (układ limfatyczny związany z układem pokarmowym) oraz IgE (nadwrażliwość na alergeny). Ogólnie biorąc, powstanie humoralnej odpowiedzi immunologicznej (obecność przeciwciał) jest poprzedzona powstaniem odpowiedzi typu komórkowego (obecność swoiście uczulonych komórek T).

OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW

- Ig — immunoglobulina
- CSF — czynnik stymulujący powstawanie kolonii
- PG — prostaglandyna
- TGF — czynnik powodujący wzrost i transformację komórek

IFN	— interferon
HC	— hydrokortyzon
TNF	— czynnik nekrotyczny guza
CRF	— czynnik uwalniający hormon przysadki
ACTH	— hormon przysadki działający na nadnercza
AVP	— wazopresyna argininowa
NGF	— czynnik powodujący wzrost nerwów
PVP	— poliwinylpirolidon
DNP	— dwunitrofenol

ROLA CYTOKIN W REGULACJI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Przebieg (kinetykę) odpowiedzi immunologicznej charakteryzuje szybki wzrost oraz stosunkowo powolne wygaszanie. Taki przebieg odpowiedzi immunologicznej jest wynikiem kilku procesów i ma zapewnić efektywną eliminację antygeny z ustroju oraz kontrolowane natężenie reakcji. Już na samym początku odpowiedzi immunologicznej ma miejsce hamowanie pewnych procesów, których niekontrolowany przebieg mógłby mieć katastrofalne następstwa dla ustroju. Chodzi w tym przypadku głównie o produkcję interleukiny 1 (IL-1), która jest niezbędna w procesie inicjacji odpowiedzi immunologicznej, jednakże jej nadmierna produkcja może doprowadzić do patologicznych zmian [10, 33]. Do cytokin hamujących powstawanie IL-1 można zaliczyć hydrokortyzon [3] i prostaglandyny z serii E [40], natomiast aktywność tej cytokiny jest ograniczana lub blokowana przez szereg inhibitorów zawartych w surowicy i w moczu [44], w tym antagonistę receptora dla IL-1IL-1Ra [10]. W samym jednakże etapie indukcji odpowiedzi immunologicznej przeważa aktywność cytokin wzmagających ten proces (IL-1,2,4,5,6) CSF, $\text{PGF}_2\alpha$ [24,39,41,49]. Stosunkowo szybko dochodzi do zjawisk hamowania odpowiedzi immunologicznej, których głównymi mediatorami są takie cytokiny jak: IFN- γ , PGE, HC, IL-10 i TGF- β [3,13,34,40,54]. Odpowiedź immunologiczna jest jednakże wygaszana łagodnie dzięki mechanizmom kontrasupresji (15), prawdopodobnie dzięki cytokinom będącym antagonistami cytokin zaangażowanych w supresji.

Pojęcie cytokin jest obszerne i powinno zawierać w sobie wszelkie związki niskocząsteczkowe, peptydy, polipeptydy i białka, które działają poprzez swoje receptory na komórki należące nie tylko do układu immunologicznego. Do cytokin należy zaliczyć: prostaglandyny, hormony układu nerwowego i gruczołów dokrewnych oraz limfatycznych, limfokiny, monokiny, w tym interleukiny [1] o ściśle zdefiniowanej strukturze i funkcji.

Cytokiny są produkowane przez wszystkie typy komórek i działają w sposób bardzo różnicowany. Mogą one działać autokrynnie pobudzając komórkę, przez którą są produkowane, do transformacji blastycznej lub proliferacji [34], jak również w sposób parakrynnny na sąsiadujące komórki [24]. Niektóre z cytokin odgrywają rolę hormonów będąc uwalniane do krwiobiegu i działając

na odległe organy/komórki [6]. Cytokiny spełniają w stosunku do siebie bardzo różne aktywności. Są to: synergizm w działaniu, antagonizm, sumowanie się aktywności, przeciwstawne działanie jednej cytokiny, pokrywanie się aktywności, indukcja innej cytokiny, hamowanie syntezy cytokin na poziomie mRNA oraz autoregulacja — stymulacja lub hamowanie własnej produkcji. Poniżej podane są przykłady na każdą z wymienionych aktywności. Synergizm w działaniu wykazują np. takie cytokiny jak IL-1 i IL-6, które stymulują tymocyty do polifracji [19]. Niektóre procesy wymagają udziału 2 lub nawet 3 cytokin dla uzyskania optymalnego efektu, przykładem może być generowanie cytotoksycznych komórek T, gdzie kooperują IL-6, IL-2 i TNF- α [52] oraz indukcja (przełączanie izotypu) IgE przez IL-4, HC i IL-6 [20]. Antagonizm w działaniu wykazuje wiele cytokin, najbardziej charakterystyczne jest przeciwstawne działanie prostaglandyn z grupy F i E [39, 40], IL-4 i TNF- γ [34], interleukin prozapalnych IL-1, 6, 8 i IL-10 [30, 54], pierwsze z wymienionych cytokin działają stymulująco, a drugie hamująco na odpowiednie etapy odpowiedzi immunologicznej. Niektóre z cytokin wywierają podobne lub jednakowe efekty na komórki docelowe np. IL-4, 5 oraz 6 powodują wzrost objętości i pobudzenie komórki [7, 24, 41]. Często rolą pewnych cytokin jest indukcja syntezy innej — IL-1 indukuje syntezę IL-6 [19], inne hamują syntezę cytokin, jak np. HC, lub IL-10 blokuje powstawanie IL-1 [3, 54]. Z reguły cytokiny wzmagają swoją własną produkcję (IL-1, 2, 4) [34], jednakże IL-10 hamuje swoją syntezę [54].

Cytokiny spełniają różnorodne zadania w kolejnych etapach odpowiedzi immunologicznej oraz w dojrzewaniu komórek układu immunologicznego. IL-1, IL-2, IL-7 [7], hormony grasicy [6], laktoferyna [58] wpływają na dojrzewanie komórek T. Z kolei interleukiny 1, 4, 5 i 6 [24] promują dojrzewanie komórek z linii B. Te same interleukiny powodują aktywację komórek T i B. Pewne cytokiny, jak IFN- γ [55] i IL-4 [60] zwiększają gęstość antygenów MHC klasy II na komórkach prezentujących antygen. Cytokiny zaangażowane są także w przekazywaniu dodatkowych, kostymulujących sygnałów w procesie prezentacji antygenu komórkom T — należą do nich IL-1 [57, 29] i IL-6 [49]. Są również stymulatorami klonów komórek T do proliferacji — w przypadku komórek typu TH1 jest to IL-2, a dla komórek TH2 IL-4 [34]. W tych procesach interleukiny spełniają rolę autokrynnego czynnika stymulującego komórki do podziału — są one produkowane przez te same komórki, na które działają. Wreszcie cytokiny są zaangażowane w procesie przełączania izotypów immunoglobulin produkowanych przez komórki B. IL-4 na przykład w małym stężeniu wyzwała produkcję Ig klasy IgG₁ [4], a w większym stężeniu klasy IgE [9]. IL-5 z kolei indukuje produkcję immunoglobulin klasy IgA [35], natomiast IFN- γ stymuluje produkcję IgG₂- α [48].

Efekty działania cytokin mogą być kontrolowane na różnych poziomach. Przede wszystkim aktywność cytokin może być regulowana poprzez modulację ich komórkowych receptorów, co najlepiej można prześledzić na przykładzie

IL-1. Okazuje się, że liczba receptorów dla tej interleukiny jest niska (10–5000/komórkę), a IL-1 może wywierać swoje biologiczne efekty w komórce już w stężeniu 1–100 cząsteczek/komórkę [11]. W przypadku bezpośredniego działania mitogennego na komórki (fibroblasty) liczba receptorów dla IL-1 jest większa – 5000–7000/komórkę [2]. Po związaniu się IL-1 ze swoim receptorem jest on internalizowany i jego gęstość na powierzchni komórki spada [31]. Sugeruje się, że niska liczba receptorów dla IL-1 jest wynikiem obecności małych stężeń egzogennej IL-1 i może być fizjologicznie korzystna dla ustroju, by stał się niewrażliwy na stałą stymulację IL-1. Z kolei, IL-1 stymuluje ekspresję swego receptora poprzez endogenną produkcję prostaglandyn [2].

W przeciwieństwie do IL-1, IL-2 stymuluje powstanie swojego receptora składającego się z 2 podjednostek, z których każda jest zdolna do wiązania IL-2 [42]. Jedna z nich jest o niskim powinowactwie (Tac), druga o powinowactwie wyższym. Kiedy oba typy receptora są obecne na tej samej komórce, łączą się w kompleks o wysokim powinowactwie do IL-2. Receptory dla interleukin mogą różnie funkcjonować w zależności od typu komórki. Dla przykładu, pod wpływem aktywacji komórki T obniżają poziom receptora dla IL-6, natomiast komórki B nabywają go dopiero w późnych etapach dojrzewania [49]. Poza regulacją aktywności cytokin przez zwiększanie lub zmniejszanie liczby ich receptorów, aktywność cytokin może być regulowana zarówno przez inhibitory syntezy, jak i działania cytokin. Do znanych inhibitorów syntezy IL-1 można zaliczyć HC i PGE, aktywność zaś tej interleukiny hamowana jest przez szereg naturalnych inhibitorów izolowanych w moczu i surowicy pacjentów oraz w hodowlach komórkowych [44]. Najbardziej znanym i najlepiej scharakteryzowanym inhibitorem IL-1 jest inhibitor wchodzący w interakcję z jej receptorem – IL-1Ra (10). Jest to białko bardzo zbliżone strukturalnie do IL-1, nie powoduje jednakże przekazania sygnału do wnętrza komórki. Jeśli np. 3–4 μg IL-1/kg masy ciała powoduje u człowieka duży wstrząs, to podanie ochotnikom 750 mg IL-1Ra nie powodowało żadnych zmian. Jest bardzo prawdopodobne, że w niedalekiej przyszłości zostaną odkryte inhibitory dla innych interleukin.

POMOC–SUPRESJA NOWE POGLĄDY

Ogólnie przyjęte poglądy na regulację odpowiedzi immunologicznej zakładają obecność komórek pomocniczych (helper), supresorowych (suppressor) i kontrasupresorowych (contrasuppressor). Komórki te mają na celu sterowanie odpowiedzią immunologiczną poprzez jej indukcję i kontrolę jej natężenia. Komórki pomocnicze charakteryzujące się fenotypem CD4^+ , CD8^- podzielono niedawno na dwie subpopulacje – TH1 i TH2 [34]. Subpopulacje te wyróżniają się wytwarzaniem różnego spektrum cytokin oraz odmienną rolą w odpowiedzi immunologicznej, pierwsze z nich są odpowiedzialne za rozwój komórkowej, a drugie humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Komórki

TH1 produkują między innymi IL-2, limfotoksynę (LT) i $\text{TNF-}\alpha$, a komórki TH2 wytwarzają interleukiny 4, 5, 6 oraz 10. Oba typy komórek wpływają na swoją aktywność/proliferyzację hamującą poprzez dwie antagonistyczne cytokiny IFN- γ i IL-10 [54]. Chociaż komórki te scharakteryzowano początkowo na podstawie izolacji klonów komórkowych *in vitro*, istnieją pośrednie dowody na obecność analogicznych typów komórek pomocniczych *in vivo*. Okazuje się, że izolacja komórek węzłów chłonnych od zwierząt w kilka dni po immunizacji prowadzi do otrzymania w hodowli *in vitro* klonów o charakterystyce TH1, a po upływie dłuższego czasu (14 dni) daje w wyniku w większości klony TH2. Obserwacje te sugerują, że najpierw zostaje wytworzona odpowiedź typu komórkowego, a dopiero później humoralna. Ponadto uważa się, że antygenowo swoiste, pamięciowe komórki T należą do subpopulacji TH2.

Podział na komórki helper i suppressor – $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ według markerów powierzchniowych napotyka na trudności, gdyż spotyka się również komórki supresorowe o fenotypie CD4^+ [27]. Poza tym komórki supresorowe posiadają receptor komórkowy o bardzo różnym składzie łańcuchów, a więc: alfa/beta, beta/gamma, tylko beta, lub bez łańcucha beta [28], tak więc nie można tych komórek wyodrębnić stosując jako kryterium stały skład łańcuchów receptora [28, 32]. Jak dotychczas nie scharakteryzowano produktu genu *I-J* wchodzącego w skład subregionu *I* głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC [50], postulowanego poprzednio jako wyróżnik subpopulacji komórek supresorowych T. Co więcej, nie wyizolowano i nie sklonowano antygenowo-swoistych czynników supresorowych – produktów aktywnych komórek supresorowych [51]. Przedstawiane dotychczas schematy obrazujące zależności między różnymi typami komórek supresorowych są skomplikowane i zakładają obecność kilku typów komórek supresorowych, w tym: komórek prekursorowych, komórek indukujących to zjawisko i komórek efektorowych [12]. Jeszcze bardziej złożone są obwody kontrasupresyjne [15]. Brak zrozumienia mechanizmu działania komórek supresorowych oraz brak identyfikacji antygenowo swoistych czynników skłonił niektórych badaczy do wysunięcia nowych koncepcji wyjaśnienia zjawiska pomocy i supresji. Według tych koncepcji różnica między pomocą i supresją nie jest jakościowa, ale ilościowa i polega na różnicy w sile przekazywanego sygnału komórkom docelowym [36]. Podstawą tej teorii było wyizolowanie tzw. klonów bifunkcyjnych [8, 26, 53] i poznanie sposobu ich działania. Okazuje się, że np. komórki klonu komórkowego swoistego dla SRBC (erytrocyty barana), dodane w małej liczbie do hodowli, stymulują odpowiedź immunologiczną na ten antygen, w wysokiej zaś liczbie są cytotoksyczne [8]. Pracując z kolei na innym modelu (klony o swoistości antydyotypowej dla własnego receptora komórki T) wykazano, że działanie klonu w stosunku do komórek tarczowych zależy od stanu ich pobudzenia [37, 38]. Gdy komórki tarczowe były w stanie spoczynku, komórki klonu stymulowały je do proliferacji, w przypadku zaś pobudzonych komórek tarczowych komórki klonu wywierały na nie efekt hamujący. Autorzy koncepcji [43] postulują możliwość wytłumacze-

nia powyższego sposobu działania bifunkcyjnych klonów. Według pierwszego wariantu komórki tarczowe mogłyby stymulować komórki klonu do wytwarzania jednego rodzaju cytokiny, w zależności od stanu pobudzenia komórki tarczowej. Według drugiej koncepcji komórki klonu produkują zarówno cytokiny stymulatorowe, jak i inhibitorowe, a komórki docelowe decydują na jaki rodzaj cytokin reagować. Istnieją dane pośrednie wskazujące na możliwość przyjęcia drugiej koncepcji, ponieważ zarówno klony typu TH1, jak i TH2 produkują jednocześnie cytokiny stymulatorowe i inhibitorowe (IL-2 i IFN- γ oraz IL-4 i IL-10). Istnieją różne typy klonów komórkowych w zależności od repertuaru produkowanych cytokin, jedne z klonów mają charakter stabilny (typ TH1 lub TH2), inne zaś są pośrednie, produkują cytokiny charakterystyczne dla obu typów helperowych komórek T (THO) [34]. Jest ponadto charakterystyczne, że klony odpowiadają silnie na sygnały słabe (ale swoiste), natomiast silne sygnały powodują inaktywację funkcjonalną komórki.

W związku z powyższymi nowymi danymi, wskazującymi na brak ważności podziału według fenotypu między komórkami helperowymi a supresorowymi oraz na wzrastającą rolę cytokin w regulacji odpowiedzi immunologicznej, sugeruje się nową strategię w terapii chorób, gdzie występuje zmieniony stosunek komórek T CD4⁺ do CD8⁺ [6]. Mianowicie, zamiast eliminacji subpopulacji komórkowej będącej w nadmiarze, lub stymulacji subpopulacji o obniżonym poziomie, proponuje się stymulowanie produkcji cytokin, których stężenie jest zbyt małe, lub hamowanie produkcji cytokiny niepożądaney.

ZWIĄZEK MIĘDZY UKŁADEM NERWOWYM A UKŁADEM IMMUNOLOGICZNYM – SPRZĘŻENIE ZWROTNE

Stosunkowo niedawno [3, 23] stwierdzono, że układ immunologiczny znajduje się pod kontrolą układu nerwowego, który za pośrednictwem hormonów przysadki i nadnerczy ogranicza wielkość odpowiedzi immunologicznej. Nadmierna produkcja IL-1 indukuje sygnały z podwzgórza w postaci CRF (corticotropin releasing factor) uwalniający ACTH (adrenocorticotropin hormone) z przysadki mózgowej. ACTH z kolei działa na gruczoły nadnercza, które produkują kortyzon będący inhibitorem syntezy IL-1 [3] na poziomie mRNA. Okazało się ponadto, że funkcję przysadki mogą przejąć limfocyty, które również reagują na sygnały z podwzgórza (CRF + AVP) i produkują ACTH obok interferonu i β -endorfin [47, 45, 18]: działanie CRF i AVP hamowane jest przez glukokortykoidy. Zjawisko to wykryto również u myszy pozbawionych przysadki mózgowej, co wyklucza jej udział w produkcji ACTH [46]. Pośrednie efekty działania ACTH na odpowiedź immunologiczną są rozległe i obejmują hamowanie odpowiedzi na antygeny T-zależne, T-niezależne, proliferacji komórek B, produkcji IFN- γ przez komórki T oraz blokowanie aktywacji makrofagów przez IFN- γ [5, 21, 22, 25].

Niezwykle interesujący jest fakt oddziaływania na komórki układu nerwowego klasycznych interleukin, jak IL-1 i IL-6. IL-1 na przykład jest także

produkowana przez komórki mózgu [16], indukuje ona wzrost temperatury, promuje sen i uwalnia hormony przysadki. IL-6 z kolei upodabnia się w swoim działaniu do NGF (nerve growth factor) oraz indukuje jego produkcję [14, 43]. Ciekawym zjawiskiem, które jest prawdopodobnie uwarunkowane aktywnością cytokin, jest naturalny biorytm w natężeniu odpowiedzi immunologicznej. Wykazano odpowiedź na antygeny niezależne od komórek T (PVP, DNP – Ficoll) [56], jak i antygeny zależne od komórek T (SRBC) [59] wykazuje regularną zmienność. Zmiany te można w dużej mierze eliminować za pomocą inhibitorów syntezy prostaglandyn, co wskazuje na rolę prostaglandyn jako mediatorów tego zjawiska [56].

PODSUMOWANIE

Cytokiny są odpowiedzialne za indukcję oraz kontrolowany przebieg odpowiedzi immunologicznej. Dzięki dużemu spektrum aktywności i sposobowi działania regulują one kinetykę odpowiedzi immunologicznej oraz zabezpieczają ustrój przed gwałtownymi zaburzeniami homeostazy.

Aktywność cytokin zaangażowanych w regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz ich synteza znajduje się pod nadzorem centralnego układu nerwowego poprzez układ hormonalny (przysadka mózgowa, nadnercza).

Poglądy dotyczące podziału regulatorowych komórek T oraz antygenowo swoistej pomocy i supresji ulegają modyfikacji dzięki wykryciu klonów bifunkcyjnych. Obecnie wydaje się, że większe znaczenie może mieć regulowanie odpowiedzi immunologicznej bądź korekta zaburzeń i niedoborów immunologicznych za pomocą odpowiednich cytokin, niż przez eliminowanie lub stymulowanie subpopulacji regulatorowych komórek T.

MICHAŁ ZIMECKI

CYTOKINES IN REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE

Summary

Cytokines are responsible for induction and a controlled process of the immune response. Due to their broad spectrum of activities and mode of action, cytokines regulate kinetics of the immune response and protect the immune response against violent disturbances of homeostasis.

The activity and the synthesis of cytokines involved in the regulation of the immune response is controlled by the central nervous system and hormones (ACTH, corticosteroids).

Views on the nature and role of regulatory T cells and the antigen specific help and suppression undergo constant evolution. It seems, at present, that a major role in controlling and directing of the immune response is played by functionally distinct helper T cell subsets (TH1 and TH2) and bifunctional clones. New trends in immunotherapy of immunodeficiencies and other disturbances of the immune system include treatment with recombinant cytokines rather than elimination or stimulation of regulatory T cells.

LITERATURA

1. Aarden L. A. — *Revised nomenclature for antigen—nonspecific T cell proliferation and helper factors*. J. Immunol. 123: 2928—2935, 1979.
2. Akahoshi T., Oppenheim J. J., Matsushima K. — *Interleukin 1 stimulates its own receptor expression on human fibroblasts through the endogenous production of prostaglandin (s)*. J. Clin. Invest. 82: 1219—1224, 1988.
3. Besedovsky H., del Rey A., Sorkin E., Dinarello C. A. — *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones*. Science 233: 652—654, 1986.
4. Bossie A., Brooks K. H., Krammer P. H., Vitetta E. S. — *Activation of murine B cells from different tissues with different mitogens. II. Isotype distribution of secreted immunoglobulins in the presence and absence of IL-4-containing T cell supernatants*. J. Mol. Cell. Immunol. 3: 221—226, 1987.
5. Bost K. L., Smith E. M., Wear L. B., Blalock J. E. — *Presence of ACTH and its receptor on a B lymphocytic cell line: A possible autocrine function for a neuroendocrine hormone*. J. Biol. Reg. Homeostat. Agts. 1: 23—28, 1987.
6. Byron N. A., Hobbs J. R. — editors, *Thymic factor therapy*, Sereno Symposia Publications from Raven Press, vol. 16, 1984.
7. Carding S. R., Hayday A. C., Bottomly K. — *Cytokines in T-cell development*. Immunology Today 12: 239—245, 1991.
8. Clayberger C., Dekruyff R. H., Cantor H. — *Immunoregulatory activities of autoreactive T cells: an I-A-specific T cell clones mediate both help and suppression of antibody responses*. J. Immunol. 132: 2237—2243, 1984.
9. Coffman R. L., Carty J. — *A T-cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon -gamma*. J. Immunol. 136: 949—954, 1986.
10. Dinarello C. A., Thompson R. C. — *Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro*. Immunology Today 12: 404—410, 1991.
11. Dower S. K., Kronheim S. R., March C. J., Conlon P. J., Hopp T. P., Gillis S., Urdal D. L. — *Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1*. J. Exp. Med. 162: 501—515, 1985.
12. Dorf M. E., Benacerraf B. — *Suppressor cells and immunoregulation*. Ann. Rev. Immunol. 2: 127—158, 1984.
13. Ellingsworth L. R., Nakayama D., Segarini P., Dash J., Carrillo P., Waegell W. — *Transforming growth factor-betas are equipotent growth inhibitors of interleukin-1-induced thymocyte proliferation*. Cell. Immunol. 114: 41—54, 1988.
14. Frei K., Malipiero U. V., Leist T. P., Zinkernagel R. M., Schwab M. E., Fontana A. — *On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases*. Eur. J. Immunol. 19: 689—694, 1989.
15. Gershon R. K., Eardley D. D., Durum D. D., Shen F. W., Yamuchi K., Cantor H., Murphy D. B. — *Contrasuppression: A novel immunoregulatory activity*. J. Exp. Med. 153: 1533—1541, 1981.
16. Ginlian D., Baker T. J., Shih, Li-Chen N., Lachman L. B. — *Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia*. J. Exp. Med. 164: 594—604, 1986.
17. Grey H. M., Chesnut R. — *Antigen processing and presentation to T cells*. Immunology Today 6: 101—106, 1985.
18. Harbour-McMenamin D., Smith E. M., Blalock J. E. — *Bacterial lipopolysaccharide induction of leukocyte -derived corticotropin and endorphins*. J. Infect. Immun. 48: 813—1818, 1985.

19. Helle M., Brakenhoff J., De Groot E., Aarden L. — *Interleukin 6 is involved in interleukin 1 induced activities*. Eur. J. Immunol. 18: 957–959, 1988.
20. Jabara H.H., Ahern D.J., Vercelli D., Geha R.S. — *Hydrocortisone and Il-4 induce IgE isotype switching in human B cells*. J. Immunol. 147: 1557–1560, 1991.
21. Johnson H.M., Smith E.M., Torres B.A., Blalock J.E. — *Neuroendocrine hormone regulation of in vitro antibody production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4171–4178, 1982.
22. Johnson H.M., Torres B.A., Smith E.M., Dion L.D., Blalock J.E. — *Regulation of lyphokine (interferon gamma) production by corticotropin*. J. Immunol. 132: 246–250, 1984.
23. Kehrer P.H., Gaillard R.C., Dayer J.M., Muller A.F. — *Human interleukin 1 beta stimulates ACTH release from rat pituitary cells in a cAMP and prostaglandin E₂ independent manner*. [W] Abstracts of the 1st International Congress of Neuroendocrinol. San Francisco s. 107, 1986.
24. Kishimoto T. — *Factors affecting B-cell growth and differentiation*. Ann. Rev. Immunol. 3: 133–157, 1985.
25. Koff W.C., Dunegan M.A. — *Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones*. J. Immunol. 135: 350–358, 1985.
26. Kotani H., Mitsuya H., Jarret R.F., Yenokida G.G., James S.P., Strober W. — *An autoreactive T cell clone that can be activated to provide both helper and suppressor function*. J. Immunol. 136: 1951–1959, 1986.
27. Krensky A.M., Clayberger C., Reiss C.S., Strominger J.L., Burakoff S.J. — *Specificity of OKT4⁺ cytotoxic T lymphocyte clones*. J. Immunol. 129: 2001–2003.
28. Kronenberg M., Goverman J., Haars R., Malissen M., Kraig E., Phillips L., Delovitch T., Suciu-Foca N., Hood L. — *Rearrangement and transcription of the beta-chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes*. Nature (London) 313: 647–653, 1985.
29. Kurt-Jones E.A., Beller D.I., Mizel S.B., Unanue E.R. — *Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1204–1208, 1985.
30. Lachman L.B., Bakouche O., Kleinerman E.S. — *Contradictory action of interleukin 1: cell growth and tumor cell killing*. Ann. Inst. Pasteur Immunol. 138: 500–503, 1987.
31. Matsushima K., Yodoi J., Tagaya Y., Oppenheim J.J. — *Down regulation of interleukin 1 (Il-1) receptor expression by Il-1 and fate of internalized ¹²⁵I-labeled Il-1 betain a human large granular lymphocyte cell line*. J. Immunol. 137: 3183–3188, 1986.
32. Mori L., Lecog A.F., Robbiati F., Barbanti E., Righi M., Sinigaglia F., Clementi F., Ricciardi-Castagnoli P. — *Rearrangement and expression of the antigen receptor alpha, beta and gamma genes in suppressor antigen-specific T cell lines*. EMBO J. 4: 2025–2030, 1985.
33. Morrissey P.J., Charrier K., Alpert A., Bressler L. — *In vivo administration of Il-1 induces thymic hypoplasia and increased levels of serum corticosterone*. J. Immunol. 141: 1456–1463, 1989.
34. Mosmann T.R., Coffman R.L. — *Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells*. Adv. Immunol. 46: 111–147, 1989.
35. Murray P.D., McKenzie D.T., Swain S.L., Kagnoff M.F. — *Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression*. J. Immunol. 139: 2669–2674, 1987.
36. Naor D. — *Bifunctional T cell clones challenge the traditional compartmentalization concept of the immune system*. Arch. Immunol. Ther. Exp. in press, 1992.

37. Naor D., Essery G., Tarcic N., Kahan M., Feldmann M. — *Interactions between autologous T cell clones*. Cell. Immunol. 128: 490–502, 1990.
38. Naor D., Essery G., Tarcic N., Kahan M., Lamb J. R., Feldman M. — *Specific interactions between a human CD4 $\pm$ clone and autologous CD4-bifunctional immunoregulatory clones*. Immunol. Rev. 116: 63–83, 1990.
39. Osheroff P. L., Webb D. R., Paulsrud J. — *Induction of T-cell dependent splenic prostaglandin F $_2$ alpha by T-cell dependent antigen*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 425–430, 1975.
40. Papiernik M., Homo-Dalorche F. — *Thymic reticulum in mice. III. Phagocytic cells of the thymic reticulum culture secrete both prostaglandin E $_2$ and interleukin 1 which regulate thymocyte proliferation*. Eur. J. Immunol. 13: 689–693, 1983.
41. Paul W. E., Ohara J. — *B-cell stimulatory factor interleukin 4*. Ann. Rev. Immunol. 5: 429–459, 1987.
42. Robb J. R., Kutny R. — *Structure–function relationship for the Il-2 receptor system. IV. Analysis of the sequence and ligand–binding properties of soluble Tac protein*. J. Immunol. 139: 855–862, 1987.
43. Satoh T., Nakamura S., Taga T., Matsuda T., Hiranao T., Kishimoto T., Kaziro Y. — *Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2 interleukin 6*. Mol. Cell. Biol. 8: 3546–3549, 1988.
44. Seckinger P., Dayer J. M. — *Interleukin 1 inhibitors*. Ann. Inst. Pasteur Immunol. 138: 486–488, 1987.
45. Smith E. M., Phan M., Kruger T. E., Coppenhaner D. H., Blalock J. E. — *Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6010–6015, 1983.
46. Smith E. M., Meyer W. J., Blalock J. E. — *Virus-induced increase in corticosterone in hypophysectomized mice: A possible lymphoid/adrenal axis*. Science, 218: 1311–1313, 1982.
47. Smith E. M., Meyer W. J., Morrill A. C., Blalock J. E. — *Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins*. Nature 321: 881–883, 1986.
48. Snapper C. M., Peschell C., Paul W. E. — *IFN-gamma stimulates IgG $_2$ secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide*. J. Immunol. 140: 2121–2127, 1988.
49. van Snick J. — *Interleukin 6: an overview*. Annu. Rev. Immunol. 8: 253–278, 1990.
50. Steinmetz M., Minard K., Hovarth S., McNicholas J., Srelinger J., Wake C., Long E., Mach B., Hood L. — *A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse*. Nature (London) 300: 35–42, 1982.
51. Tada T., Okomura K. — *The role of antigen-specific T cell factors in the immune response*. Adv. Immunol. 28: 1–87, 1979.
52. Takai Y., Wong G., Clark S., Burakoff S., Herrmann S. — *B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes*. J. Immunol. 140: 508–512, 1988.
53. Tite J. P., Janeway Jr. C. A. — *Cloned helper T cells can kill B lymphoma cells in the presence of specific antigen: Ia restriction and cognate vs. noncognate interactions in cytolysis*. Eur. J. Immunol. 14: 878–886, 1984.
54. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennet B., Figdor C. G., de Vries J. E. — *Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J. Exp. Med. 174: 1209–1220, 1991.
55. Warren M. K., Vogel S. N. — *Opposing effects of glucocorticoids on interferon- γ induced murine macrophage F $_c$ receptor and Ia antigen expression*. J. Immunol. 134: 2462–2469, 1985.

56. Zimecki M., Webb D. R. — *The regulation of the immune response to T-independent antigens by prostaglandins and B cells*. J. Immunol. 117: 2158–2164, 1976.
57. Zimecki M. — *Mechanizm prezentacji antygeny przez komórki B pomocniczym komórkom T*. (rozpr. hab. Zakł. Immunobiol. Wrocław 1986)
58. Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G. — *Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4⁺ CD8⁺ murine thymocytes*. Immunology Letters 30: 119–124, 1991.
59. Zimecki M., Wieczorek Z. — *Biorythm in the humoral immune response to SRBC in mice*. Arch. Immunol. Ther. Exp., in press, 1992.
60. Zlotnik A., Fisher M., Roehm N., Zipori D. — *Evidence for effects on interleukin 4 (B cell stimulatory factor 1) on macrophages: enhancement of antigen presenting ability of bone marrow — derived macrophages*. J. Immunol. 138: 4275–4279, 1987.

WIESŁAW WIKTOR JĘDRZEJCZAK

Zakład Immunologii CSK WAM

Warszawa

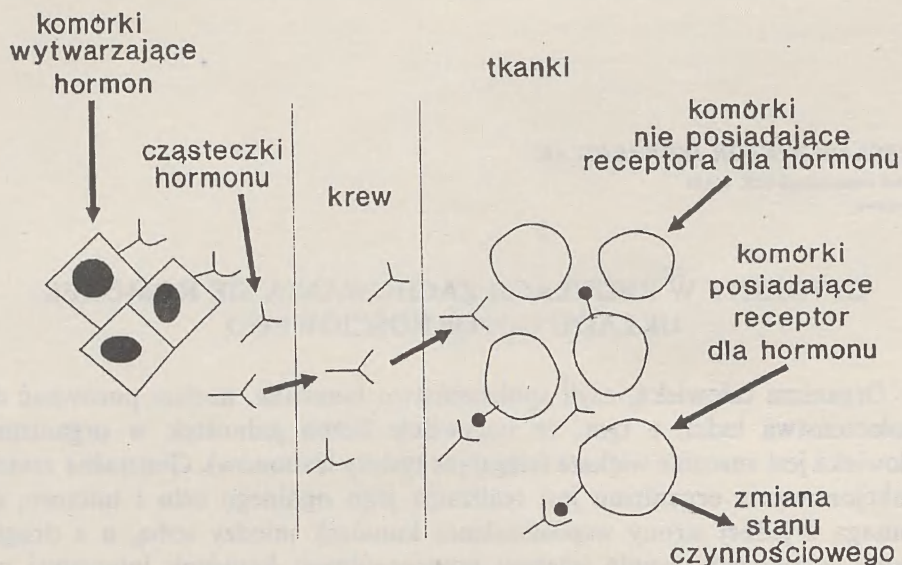
CYTOKINY W REGULACJI ZACHOWANIA SIĘ KOMÓREK UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Organizm człowieka, czyli społeczeństwo komórek, można porównać do społeczeństwa ludzi, z tym, że oczywiście liczba jednostek w organizmie człowieka jest znacznie większa (sięgająca tysięcy trylionów). Generalną zasadą funkcjonowania organizmu jest realizacja jego ogólnego celu i interesu, co wymaga z jednej strony współdziałania komórek między sobą, a z drugiej strony podporządkowania interesu poszczególnych komórek interesowi organizmu.

Podstawowym ośrodkiem decydującym organizmu jest mózg, a ściślej układ nerwowy. Układ ten przetwarza informacje i w oparciu o nie wydaje polecenia poszczególnym organom rozsyłając je do nich siecią wypustek komórek, czyli tzw. włóknami nerwowymi. Taki system sterowania oparty o przesyłanie poleceń i informacji siecią włókien do określonych miejsc jest jednak zupełnie nieprzydatny, gdy w grę jako odbiorcy wchodzi komórki przemieszczające się z jednych miejsc do innych.

Jednakże układ nerwowy jest częściowo połączony z jeszcze innym układem sterowania komórkami organizmu tzw. układem dokrewnym. Układ dokrewny wydaje niektóre polecenia pod wpływem dyspozycji z układu nerwowego. Ponadto wiele składowych tego układu działa automatycznie, samoregulując się, opierając się na mechanizmie sprzężenia zwrotnego. Polecenia układu dokrewnego są przekazywane za pośrednictwem substancji zwanych **hormonami**.

Hormony można najprościej określić jako substancje wydzielane przez jedne komórki, a w sposób swoisty modyfikujące zachowanie innych komórek. Klasycznie uważano, że hormony są wydzielane przez wyspecjalizowane komórki określonego narządu (np. komórki beta wysepek trzustki wydzielają hormon insuliny) i rozprowadzane drogą krwi do komórek (narządów) docelowych, które następnie reagują na dany hormon. Później okazało się, że ta zdolność do reagowania jest swoista i ograniczona wyłącznie do komórek, które mają receptor dla danego hormonu, czyli białko, które może przyłączyć dany hormon i tylko dany hormon. Z kolei połączenie hormonu z receptorem rozpoczyna pożądaną w danym momencie przez organizm rodzaj reakcji ze strony komórki (rys.1).



Rys. 1. Zasada wywierania wpływu regulującego przez układ dokrewny: hormon działa tylko na komórki mające dla niego receptor

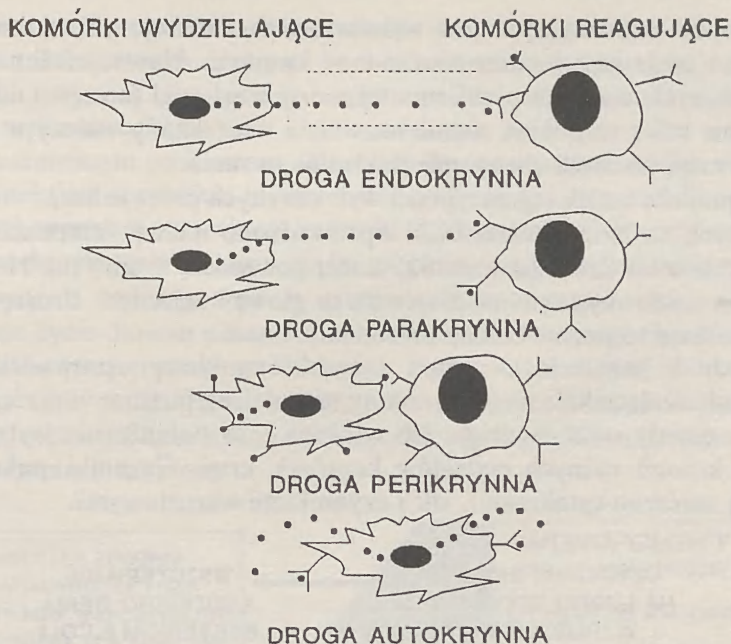
Wykryto również choroby, w których różne hormony bądź były wytwarzane w niedostatecznej ilości (np. insulina w cukrzycy), bądź w nadmiernej ilości.

Taki klasycznie znany układ dokrewny (oprócz trzustki, tworzy go jeszcze przysadka, tarczyca, przytarczyce, nadnercza i inne narządy) cechuje się jeszcze tym, że wydzielane hormony mają dzięki dokrewnemu wydzielaniu zasięg ogólnoustrojowy. Taki zasięg (w odróżnieniu od wydzielania substancji na zewnątrz organizmu) nazwano **endokrynnym**. To nie znaczy, że substancje, które za chwilę zacznę omawiać, nie są wydzielane do wewnątrz, oznacza tylko, że ze względów historycznych wykorzystanie tej nazwy ogranicza się do hormonów ogólnoustrojowych (rys.2).

Ostatnie lata, a zwłaszcza wyniki dotyczące układu odpornościowego, przyniosły bardzo wiele informacji rozszerzających wiedzę dotyczącą hormonów tkankowych i komórkowych, a więc mających mniejszy zasięg.

Przede wszystkim okazało się, że w układzie odpornościowym jest bardzo wiele hormonopodobnych białek, ale tylko wyjątkowo trafiają one do krwi. Najczęściej są obecne jedynie w bezpośrednim sąsiedztwie komórek wydzielających. Taki zakres oddziaływania określono jako **parakrynnny**.

Następnie okazało się, że niektóre z tych białek o budowie bardzo podobnej do białek wydzielanych nie opuszczają komórki wydzielającej, a są jedynie eksponowane na jej powierzchni. W takiej sytuacji na dane białko regulacyjne inna komórka może zareagować tylko wtedy, gdy swoim receptorem bezpoś-



Rys. 2. Zasięg działania hormonów

rednio zetknie się z komórką wydzielającą. Dla takiej sytuacji nie ma jeszcze powszechnie przyjętej nazwy i ja określam to jako oddziaływanie **perikrynnę**.

Szczególnie ciekawym rodzajem oddziaływania jest takie, kiedy komórka wydzielająca dane białko regulacyjne sama ma receptor je wiążący, czyli może nań reagować. Jest to oddziaływanie **autokrynnę**.

Wiele białek regulacyjnych w układzie odpornościowym (ale także w innych układach komórkowych) zostało odkrytych dzięki ich zdolności do pobudzania wzrostu, czyli rozmnażania się komórek. Dlatego często nazywa się wiele z nich **czynnikami wzrostowymi** (ang. growth factors). Tutaj muszę wtrącić, że niemal wszystkie nazwy są nadawane w chwili odkrycia danej cząsteczki w oparciu o jej jedną własność. Potem okazuje się, że ta sama cząsteczka ma szereg innych własności, w tym i takie, które są ważniejsze od tej pierwszej. W skrócie, nazwa nie przesądza o funkcji danej cząsteczki.

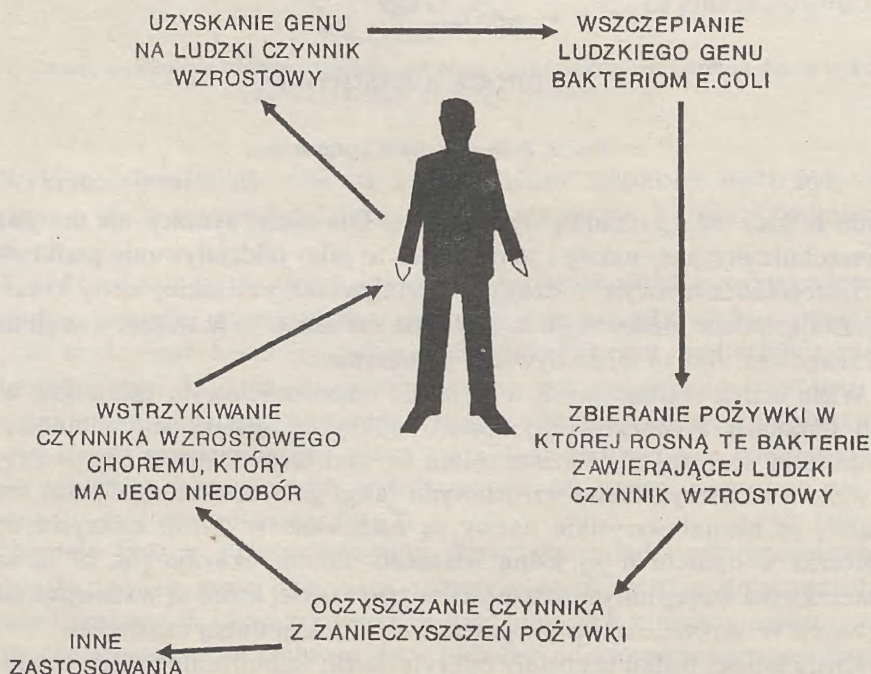
Kiedy indziej białka te zostały odkryte dzięki wzbudzeniu jakiejś czynności w komórkach reagujących. Z tego powodu często nazywa się je **cytokinami**. Nie ma żadnej zasadniczej różnicy między czynnikami wzrostowymi a cytokinami. Na ogół te same cząsteczki w zależności od rodzaju komórki reagującej wzmagają rozmnażanie, albo pobudzają czynności.

Niestety, to nie jest jeszcze koniec złożoności problemu. Otóż cytokiny wydzielane przez monocyty i makrofagi nazywa się **monokinami**, a cytokiny wydzielane przez limfocyty **limfokinami**. Nie ma tu znowu ostrej granicy, gdyż

wiele z białek regulacyjnych jest wytwarzanych zarówno przez makrofagi, limfocyty, a także często przez jeszcze inne komórki. Nawet jeżeli naukowcy używają różnych nazw dla określenia tej samej cząsteczki (a często odkryło je jednocześnie kilka zespołów, różnie nazwało i teraz każdy walczy o „swoją” nazwę) to mają na myśli **chemicznie dokładnie to samo**.

Następnie dla białek regulacyjnych wytwarzanych przez jedne krwinki białe i działających na inne krwinki białe wprowadzono nazwę: **interleukiny**. Gdy wspomnę, że w tej chwili (marzec 92) z całą pewnością znamy już 11 różnych interleukin, szanowny czytelnik złapie się za głowę i zniechęci. Proszę o cierpliwość, spróbuję to jeszcze trochę usystematyzować.

Jest jednak jeszcze jedna grupa nazw, którą muszę wprowadzić. Są to **czynniki pobudzające kolonie** (ang. colony stimulating factors: w skrócie CSF). Te białka zostały odkryte dzięki ich zdolności do pobudzania wytwarzania w szpiku kości różnych rodzajów komórek krwi. Czynniki pobudzające kolonie są zarówno cytokinami, jak i czynnikami wzrostowymi.

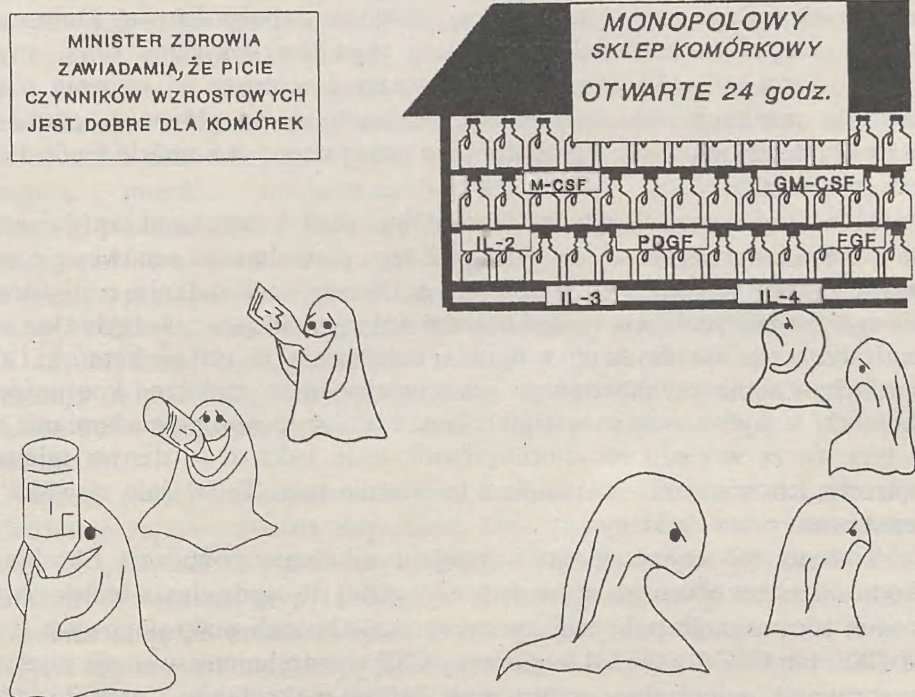


Rys. 3. Obecna metoda uzyskiwania hormonów do badań i zastosowań leczniczych

Najważniejsze jest to, że obecnie, jeżeli mówimy o jakimś czynniku, cytokinie, interleukinie itp., to mamy na myśli chemicznie zdefiniowane białko, którego struktura aminokwasowa jest znana, a także znany jest gen odpowiedzialny za jego wytwarzanie. Inaczej mówiąc mówimy o faktach a nie

o hipotezach. Na ogół taka sama wiedza jest dostępna dla receptora tego białka, a także jest ono dostępne w stanie chemicznie czystym, wytworzone metodami inżynierii genetycznej i często poddawane zupełnie praktycznym próbom wykorzystywania jako leku u ludzi (rys. 3).

Najważniejszym problemem, jaki cytokiny muszą regulować w odniesieniu do komórek jest oczywiście to, czy komórki będą żyć, czy nie. Podobnie, jak starzeje się organizm, starzeją się komórki i niektóre z nich umierają ze starości. Ale największym zagrożeniem dla organizmu nie jest przedwczesna śmierć danej komórki, gdyż można ją wtedy szybko zastąpić inną, ale wprost przeciwnie życie dłuższe niż to jest z punktu widzenia organizmu potrzebne. Ekstremalną postacią takiego dłuższego życia komórek jest choroba nowotworowa, czyli realizacja mitu Fausta na poziomie komórkowym. Aby jej zapobiec, większość komórek ma genetycznie zaprogramowaną śmierć. Zjawisko to nazywa się **apoptozą**.



Rys. 4. Fundamentalne znaczenie uzależnienia komórek od ich czynników wzrostowych.
Wyjaśnienie skrótów w tekście

Organizm za pośrednictwem cytokin może zarówno opóźnić, jak i przyspieszyć apoptozę. Większość czynników wzrostowych, swoistych dla określonego rodzaju komórek, po prostu hamuje ich apoptozę. Komórki są tak

uzależnione od swoich czynników wzrostowych, jak narkoman od narkotyku, z tym że jest to uzależnienie dla nich korzystne (rys.4). Przykładowo limfocyty T bez obecności czynnika zwanego interleukiną 2 umierają. Z kolei w obecności tego czynnika można je w warunkach laboratoryjnych hodować praktycznie w nieskończoność. Każdy rodzaj komórek ma swoisty dla siebie czynnik hamujący apoptozę i ma właściwe receptory dla tego czynnika. Nie jest również tak, że chwilowa ekspozycja na czynnik zabezpiecza komórkę przed koniecznością popełnienia harakiri (czym w istocie jest apoptoza). Komórka, aby żyć, musi stale otrzymywać nowe cząstki „swojego” czynnika.

Są również czynniki, które przyspieszają apoptozę. Ich przykładem jest tzw. czynnik martwicy nowotworów. Został on wykryty dzięki zdolności oddziaływania również na niektóre komórki nowotworowe (te, które nie utraciły właściwego receptora).

Odporność, czyli obrona organizmu przed różnymi jego wrogami wymaga udziału różnych komórek, a także bardzo precyzyjnego zgrania współpracy między nimi. Często mówi się wręcz o orkiestrze odpornościowej. Dobra gra orkiestry wymaga jednocześnie słuchania sygnałów dyrygenta oraz innych członków orkiestry. W zależności od sytuacji i w miarę jej rozwoju różne komórki przejmują rolę dyrygentów. Najogólniej, do głównych członków orkiestry należą makrofagi i granulocyty z jednej strony, a komórki limfoidalne z drugiej strony.

Makrofagi i granulocyty są fagocytami, czyli komórkami usuwającymi obce cząstki niezależnie od ich rodzaju. Z tego powodu często mówi się o nich jako o składowych odporności nieswoistej. Dla realizacji zadania, czyli usuwania ogniska zakażenia, np. tysięcy bakterii w danym miejscu, niezbędne jest aby znalazły się właśnie tam (a nie w ogóle w organizmie) te właśnie komórki i aby one były w stanie czynnościowym umożliwiającym im żarłoczną konsumpcję. Komórki te wytwarzane są w szpiku i musi istnieć sposób powiadamiania ich o tym, że ze względu na chorobę (wniknięcie bakterii w danym miejscu) potrzeba ich więcej niż normalnie i to właśnie tam. Te właśnie zjawiska są regulowane przez cytokiny.

Toksyny bakteryjne obecne w miejscu zakażenia pobudzają fibroblasty (komórki zrębu obecnego w każdym narządzie) do wydzielania białek określonych jako czynnik pobudzający wytwarzanie kolonii makrofagowych (tzw. M-CSF, lub CSF-1 gdyż był to pierwszy CSF wyodrębniony w stanie czystym) oraz czynnik pobudzający wytwarzanie kolonii makrofagów i granulocytów, tzw. GM-CSF.

GM-CSF działa tylko parakrynnie, ale CSF-1 osiąga również krew, a następnie szpik. Powoduje zwiększenie wytwarzania monocytów w szpiku i ich napływanie do tkanek, gdzie przekształcają się one w makrofagi. Tu dodatkowo działa na nie GM-CSF i razem pobudzają one czynności tych komórek, umożliwiając im przeżycie, a nawet w pewnym stopniu rozmnażanie w tkankach. GM-CSF dodatkowo ściąga w miejsce zakażenia granulocyty

i aktywuje je. Pobudzone makrofagi wydzielają dziesiątki różnych czynników, a wśród nich tzw. G-CSF, który dodatkowo pobudza napływanie granulocytów i interleukinę 8, która je aktywuje. Ponadto makrofagi wydzielają czynnik pobudzający rozmnażanie się fibroblastów (co ułatwia zamknięcie rany, jeżeli ona była przyczyną wniknięcia bakterii) oraz interleukinę 1, która pobudza limfocyty, a wreszcie TNF, który przyspiesza śmierć chorych komórek, niezbędną dla zrobienia miejsca zdrowym.

Limfocyty są odpowiedzialne za tzw. odporność swoistą, która polega na usuwaniu obcych białek dzięki ich szczególnej strukturze chemicznej (a ściślej dzięki kształtowi cząsteczki wynikającemu z tej struktury). Limfocyty mogą to „robić” w dwojaki sposób. Po pierwsze mogą wytwarzać białka zwane przeciwciałami, które wybiórczo wiążą się z obcymi białkami: antygenami i w ten sposób je zobojętniają, a następnie ułatwiają usunięcie przez fagocyty. Limfocyty są w stanie wytworzyć odrębne przeciwciała przeciw każdemu białku. Wytwarzaniem przeciwciał, które krążą w płynach ustrojowych (stąd ten rodzaj odporności swoistej nazywa się humoralną od humor: płyn), zajmuje się specjalny rodzaj limfocytów określanych jako limfocyty B. Proces wytwarzania limfocytów B jest regulowany przez interleukiny 3 i 7, a następnie ekspansja odbywa się pod wpływem antygeny. To antygen aktywuje ten i tylko ten rodzaj komórek B, które na niego reagują i powoduje zwiększenie ich liczby oraz przekształcenie w tzw. komórki plazmatyczne. Komórki plazmatyczne są właśnie małymi fabrykami przeciwciał. Ich rozmnażanie jest regulowane przez interleukinę 6. Ma to bardzo praktyczne znaczenie, gdyż w chorobie określanej jako szpiczak mnogi, która jest nowotworem komórek plazmatycznych, dochodzi właśnie do autokrynnego wydzielania interleukiny 6. Komórki nowotworowe rozmnażają się pod wpływem wytwarzanego przez siebie czynnika, napędzając błędne koło, które prowadzi do śmierci chorego, jeśli nie będzie skutecznie leczony.

Drugi rodzaj limfocytów, to tzw. limfocyty T. Limfocyty T są odpowiedzialne za tzw. swoistą odporność komórkową. Ten rodzaj odporności służy do usuwania antygenów związanych z komórkami, a więc np. komórek zarażonych wirusem grypy (i innymi wirusami), komórek nowotworowych. Komórki te są po prostu zabijane przez specjalny rodzaj komórek T, które nazywa się komórkami zabijającymi. Komórki takie są potencjalnie bardzo niebezpieczne, gdyż mogą zabić każdą komórkę organizmu, a tym samym organizm. Aby do tego nie doszło, istnieje bardzo złożony i precyzyjny mechanizm umożliwiający im odróżnienie tego co obce od tego co swoje (czytelnik może się z tym zapoznać w artykule Von Boehmera i Kisielowa „Jak układ immunologiczny rozpoznaje sam siebie” Świat Nauki 1991). Układ ten obejmuje jeszcze jeden zasadniczy rodzaj limfocytów T, tzw. limfocyty T pomagające. Komórki te są odpowiedzialne za to, aby pobudzić do zabijania odpowiedni rodzaj limfocytów T zabijających. Uzyskują one infor-

mację o strukturze antygeny, który w danej chwili zagraża organizmowi, od makrofagów oraz innych komórek zdolnych przedstawiać antygen.

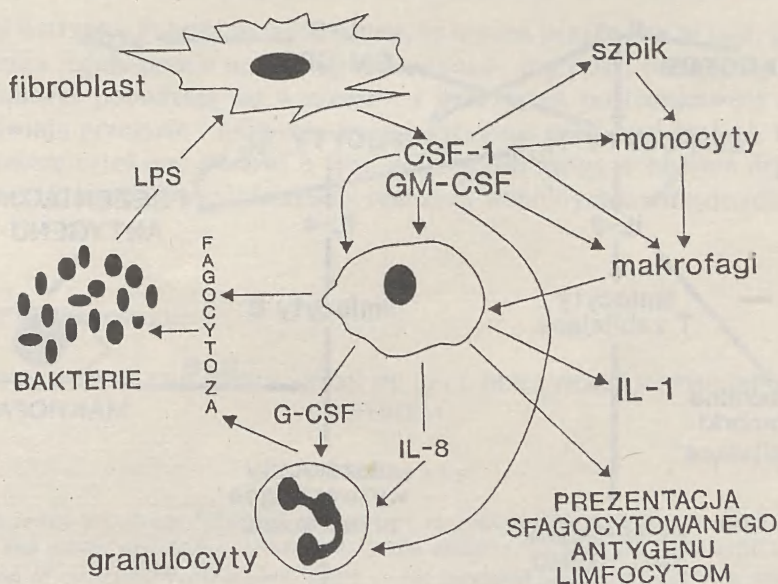
Za przetrwanie i rozmnażanie zarówno komórek T zabijających, jak i pomagających odpowiedzialna jest interleukina 2. Pobudza ona dodatkowo jeszcze jeden rodzaj limfocytów, tzw. naturalne komórki zabijające, które odgrywają istotną rolę w zwalczaniu komórek nowotworowych. Z tego względu interleukina 2 jest obecnie poddawana badaniom klinicznym jako lek przeciwnowotworowy.

Interleukina 2 jest wytwarzana przez pobudzone interleukiną 1 limfocyty T pomocnicze. Jednakże okazało się, że nie wszystkie komórki tego typu są zdolne ją wytwarzać. Te, które posiadają tę własność, nazwano komórkami T pomocniczymi typu pierwszego. Istnieje jeszcze typ drugi, który cechuje się wytwarzaniem interleukiny 4, której z kolei nie wytwarza typ 1. Interleukina 4 pobudza dojrzewanie limfocytów B, stąd więc z bardzo dużym uproszczeniem można mówić, że komórki pomocnicze typu 1 pomagają limfocytom T zabijającym, komórki typu drugiego limfocytom B.

Jednakże podział na limfocyty T pomagające typu 1 i 2 został dokonany bardzo niedawno i wzajemne znaczenie istnienia komórek tego typu nie jest jeszcze poznane. Jeszcze w połowie 1991 roku kwestionowano jego istnienie u człowieka. Dopiero wykazanie, że ludzie cechujący się ciężkim przebiegiem trądu to ci, którzy mają (z powodu wrodzonej predyspozycji) mało komórek typu 1, a dużo typu 2 i odwrotnie ludzie cechujący się łagodnym przebiegiem trądu mają dużo komórek typu pierwszego i mniej typu 2 udowodniło, że komórki te mają krytyczne znaczenie dla regulacji przebiegu odpowiedzi odpornościowej również u człowieka. O ile przewaga komórek T pomocniczych typu 1 jest korzystna w trądzie, o tyle może się okazać, że w zwalczaniu innych chorób korzystniejszą rolę odgrywają komórki pomocnicze typu 2. Poza tym w dniu dzisiejszym dysponujemy możliwościami celowanego wpływu na reakcje indukowane przez zarówno interleukinę 2, jak i 4, gdyż obie te cytokiny są dostępne do badań klinicznych.

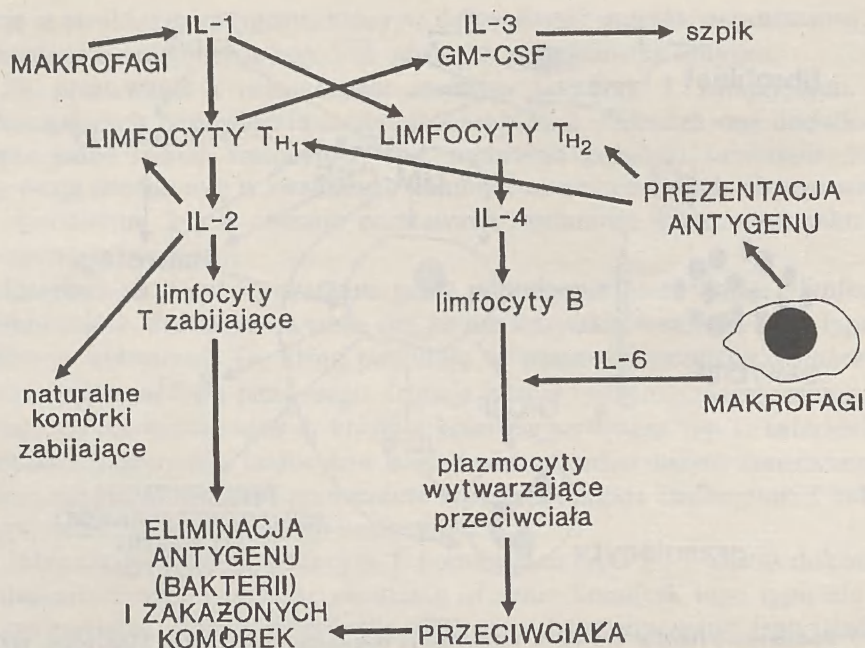
Z punktu widzenia tytułu tego artykułu podział na limfocyty T pomocnicze typu 1 i 2 jest o tyle istotny, że po raz pierwszy kryterium podziału i wyodrębnienia nowego rodzaju komórek w układzie odpornościowym stało się wydzielanie określonej cytokiny.

Odporność nieswoista i swoista są ze sobą bardzo powiązane i uwikłanie makrofagów w początkowo nieswoiste zwalczanie zakażenia uruchamia mechanizmy odporności swoistej. Pobudzone makrofagi wytwarzają interleukinę 1 (IL-1), która z kolei aktywuje obydwa rodzaje pomocniczych limfocytów T. Makrofagi także przedstawiają im antygen, a zwykle kilka różnych antygenów pochodzących ze sfagocytowanych bakterii. Z kolei pomocnicze limfocyty T aktywują antygenowo swoiste klony limfocytów B i limfocytów T zabijających. Dodatkowo wspomagają czynność tych komórek, zwiększają ich liczbę, a także same się pobudzają, wydzielając interleukiny 2 i 4 (IL-2 i IL-4). IL-2



Rys. 5. Podstawowe funkcje cytokin w regulowaniu odporności nieswoistej. Makrofagi, prezentując antygen limfocytom i wydzielając interleukinę 1, uruchamiają reakcje odporności swojej pokazane na rys. 6. LPS = endotoksyna bakteryjna

pobudza jeszcze jeden rodzaj komórek odpornościowych, tzw. naturalne komórki zabijające. Ich rola w zwalczaniu zakażeń jest prawdopodobnie znikoma i dlatego nie będę jej dalej omawiał. Natomiast pobudzenie antygenowo swoistych klonów limfocytów B wzmagane przez IL-4 prowadzi do ich zróżnicowania do plazmacytów, które wytwarzają przeciwciała przeciwko tym antygenom. Proces różnicowania i namnażania plazmacytów jest pobudzany przez inny czynnik wydzielany przez makrofagi: interleukinę 6 (IL-6). Przeciwciała wiążą się z antygenami i jako kompleksy są usuwane przez makrofagi. Jeżeli antygeny są na powierzchni zakażonych komórek, to takie komórki (będące źródłem zakażenia) są zabijane z jednej strony po przyłączeniu przeciwciała przez specjalną grupę białek zwaną dopełniaczem, a z drugiej strony przez fagocyty. Ponadto, jeszcze skuteczniej takie komórki mające na swojej powierzchni obce antygeny są eliminowane przez antygenowo swoiste limfocyty T zabijające namnożone pod wpływem antygeny i interleukiny 2 (rys. 6). Tak jak pobudzenie odporności nieswoistej przez zakażenie prowadzi przez wysyłanie sygnałów cytokinami do pobudzenia odporności swojej, tak ta ostatnia pobudza również mechanizmy odporności nieswoistej. Mianowicie, obydwa rodzaje komórek pomocniczych typu T po pobudzeniu wytwarzają interleukinę 3 (IL-3) oraz czynnik pobudzający wytwarzanie granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Czynniki te, działając miejscowo oraz na szpik, pobudzają wytwarzanie i czynność granulocytów, a także makrofagów i innych komórek.



Rys. 6. Podstawowe funkcje cytokin w regulowaniu odporności swoistej

Taki schemat jest oczywiście ciągle jeszcze bardzo uproszczony, gdyż w rzeczywistości w zwalczaniu każdego rodzaju agresora biorą udział nieco inne mechanizmy, ale zawiera już podstawowe rodzaje komórek, cytokin i mechanizmów, które w każdej chwili każdego z nas bronią przed różnego rodzaju agresorami.

Jak wspomniałem, dzięki osiągnięciom inżynierii genetycznej większość z wymienionych przeze mnie cząsteczek jest obecnie wytwarzana przemysłowo jako tzw. formy **rekombinowane**. Najczęściej, ze względów ekonomicznych, ludzkie cytokiny są wytwarzane przez specjalne szczepy pałeczek okrężnicy, którym wprowadzono odpowiednie ludzkie geny. Rekombinowane cytokiny są obecnie wykorzystywane jako leki. Ta forma leczenia, która wykorzystuje naturalne ludzkie białka do pobudzania procesów, które te białka fizjologicznie regulują, nazywa się **bioterapią**. Jednocześnie trzeba sobie uświadomić, że w wielu wypadkach cząsteczka, która fizjologicznie ma zasięg parakryny, jest podawana ogólnoustrojowo. To zwróciło uwagę, na fakt, że wiele cytokin wywiera działania na bardzo różne komórki (nazywa się to działaniem **plejotropowym**) i podanie ich ogólnie może powodować dramatyczne niepożądane efekty. Klasycznymi przykładami są tu IL-1 i czynnik martwicy nowotworów. Jak się okazało, cząsteczki te, gdy działają na skalę ogólnoustrojową, są odpowiedzialne za objawy stanu najwyższego zagrożenia życia ustroju, tj. za

objawy wstrząsu. Poucza to także o tym, że nie ma przypadku w tym, czy dana cząsteczka fizjologicznie ma zasięg endo-, para-, czy tylko perikryny.

Komórki pobudzają się wzajemnie i hamują za pośrednictwem cytokin, umożliwiają przeżycie i nakazują śmierć. Istnienie całej sieci reakcji, w której pośredniczą cytokiny, stanowi o tym, że komórki mogą w obrębie organizmu żyć, funkcjonować i współdziałać w realizacji wspólnych nadrzędnych celów.

WIESŁAW WIKTOR JĘDRZEJCZAK

CYTOKINES IN THE REGULATION OF CELL BEHAVIOUR IN THE IMMUNE SYSTEM

S u m m a r y

This review introduces definitions of cytokines, monokines, lymphokines, interleukins, growth factors, and colony stimulating factors. It describes receptor, distance and cell condition limits to the action of cytokines. Furthermore, major events regulated by cytokines during mounting an immune response to antigen are presented. Particular attention is paid to a switch between non-specific and specific immunity. Finally, application of the released cytokine profile as an indicator of cell identity (e.g. T helper-1 cells producing interleukin 2 versus T helper-2 cells producing interleukin 4) is mentioned. All the reviewed data confirm the central regulatory role of the cytokine network in immunity.

PAWEŁ S. BEREZOWICZ

Katedra Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Akademia Medyczna
Wrocław

NEUROIMMUNOLOGIA

WSTĘP

Neuroimmunologia jest nauką stosunkowo młodą, nawet biorąc pod uwagę krótką przecież historię immunologii. Jest ona jedną z najszybciej rozwijających się i najciekawszych dziedzin nauk biomedycznych, stale przyciągających utalentowanych badaczy różnych dyscyplin. Termin „immuno-neurologia” stworzył w roku 1964 Francis O. Schmitt z Massachusetts Institute of Technology; termin ten oznaczał pierwotnie wykorzystanie technik immunologicznych do badania funkcji mózgu. Następnie stworzono pojęcie neuroimmunologii, obejmujące głównie badanie chorób układu nerwowego związanych z aktywnością układu immunologicznego. Uczeń zajmujący się behawiorem, czyli zachowaniem zwierząt i ludzi, uważając aktywność układu immunologicznego za rezultat bodźców środowiska. W swoich badaniach, określanych jako psychoneuroimmunologia, pobudzają „czarną skrzynkę” (cały organizm) bodźcem środowiskowym i mierzą zmiany zachowania i zjawiska immunologiczne. Psychoneuroimmunologia próbuje badać mechanizmy biologiczne, wpływające poprzez emocje, postawy i psychiczne zmagania się chorego na przebieg choroby. Implikacją psychoneuroimmunologii dla medycyny praktycznej jest teza, że postawa chorego i jego stosunki z lekarzem mogą być co najmniej równie ważne jak swoista terapia choroby. Przedstawiciele zaś nauk podstawowych usiłują zajrzeć do wnętrza owej „czarnej skrzynki”, by poznać jak najdokładniej mechanizmy złożonych zależności między układami: nerwowym, endokrynnym i odpornościowym. Ich wysiłki w połączeniu z pracami klinicystów i badaczy behawioru tworzą naukę o neuroimmunomodulacji [10]. Termin „neuroimmunomodulacja” wprowadził w roku 1979 Novera Herbert Spector z Bethesdy na określenie wielokierunkowych zależności między układem immunologicznym a układami nerwowym i endokrynnym [17].

Niektóre znane od dawna schorzenia układu nerwowego: miastenia, stwardnienie rozsiane — są uważane za choroby o podłożu immunologicznym. Teoria o wirusowej etiologii schizofrenii i jej związku z zaburzeniami odporności komórkowej powstała ponad pół wieku temu i cyklicznie powraca do prasy

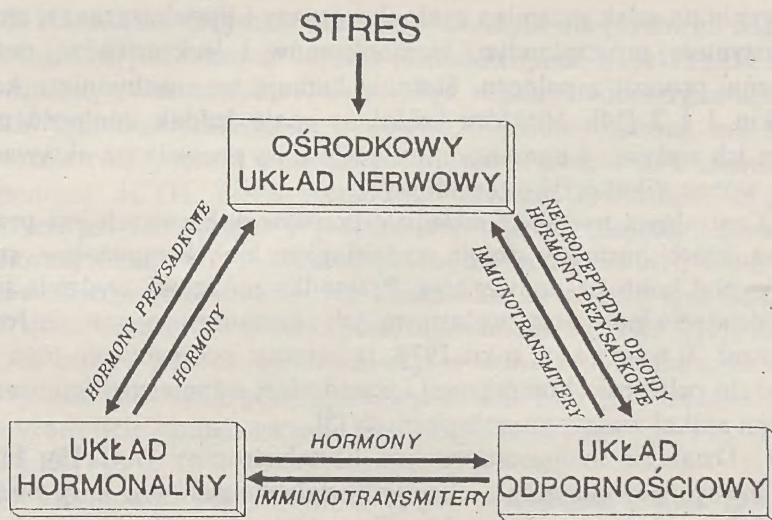
naukowej. Obecnie postuluje się, że tajemnicza i groźna choroba Alzheimera jest związana z procesami immunologicznymi zachodzącymi w mózgu [6]. Jednakże twierdzenie, że układ immunologiczny wpływa na układ nerwowy nie tylko w przebiegu niektórych jego chorób, że sam pozostaje pod jego kontrolą oraz że są to normalne procesy regulacyjne zdrowego organizmu, zyskało uznanie całkiem niedawno. Ale też niedawno wykryto zjawiska pozwalające uzasadnić ową tezę. Owszem, wpływ usunięcia przysadki mózgowej na inwolucję grasicy opisał S m i t h 60 lat temu. Prace S e l y e g o na temat wpływu glikokortykosteroidów na odporność powstały także w latach trzydziestych, ale przez długi czas działanie steroidów na układ immunologiczny uważano raczej za fenomen farmakologiczny niż za mechanizm fizjologiczny. Natomiast receptory opiatowe P e r t i S n y d e r wykryli w roku 1973, a praca H u g h e s a i K o s t e r l i t z a o endogennych peptydach opioidowych ukazała się w „Nature” w roku 1975. Cztery lata później Joseph W y b r a n* opisał receptor dla *met*-enkefaliny na ludzkich limfocytach, po dalszych czterech latach znaleziono je także u myszy. W połowie lat siedemdziesiątych G u i l l e m i n, laureat nagrody Nobla z Instytutu Salka w La Jolla, odkrył wiązanie endorfin do receptorów na limfocytach. O interleukinach zaczęto mówić pod koniec lat siedemdziesiątych. Dlatego wiele doniesień ma charakter wstępny, a na ostateczne wnioski trzeba będzie jeszcze poczekać.

ROZDZIAŁ I

Do skutecznego współdziałania układów neurohormonalnego i immunologicznego konieczna jest komunikacja pomiędzy nimi. Jak obecnie wiemy, środków tej komunikacji jest wiele, co przedstawia schematycznie rys. 1. W tym rozdziale postaram się opisać najważniejsze z nich.

1. Istnieją dwie zasadnicze drogi przekazywania bodźców z układu nerwowego do układu immunologicznego: (i) bezpośrednia, za pomocą peptydów neuroendokrynnych uwalnianych z przysadki mózgowej pod kontrolą podwzgórza; (ii) pośrednia przy udziale części współczulnej autonomicznego układu nerwowego [3]. Na początku lat osiemdziesiątych poznano unerwienie narządów limfatycznych. Są one bogato zaopatrzone w pozazwojowe, bezmielinowe noradrenergiczne włókna układu współczulnego. Strefy T unerwione są obficie od stref B. Przekaznik sygnałów, noradrenalina, może działać bezpośrednio na receptory na makrofagach i limfocytach, a ponadto wpływa na syntezę i uwalnianie substancji aktywnych biologicznie z komórek dodatkowych oraz na przepływ krwi i przepuszczalność naczyń, a przez to na ruch

* Profesor Wybran, wybitny uczony pracujący w Brukseli, był pionierem klinicznego zastosowania opioidów. We wrześniu 1989 r. był gościem VI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Immunologicznego w Gdyni, na którym wygłosił wykład inauguracyjny. Niedługo potem zginął w zamachu z rąk palestyńskich terrorystów.



Rys. 1. Schemat dwukierunkowych powiązań pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym, układem wydzielania wewnętrznego i układem odpornościowym. Stres może wpływać pośrednio na układ immunologiczny poprzez neuropeptydy i hormony przysadkowe oraz opioidy [11].

limfocytów [7]. Neurony współczulne w śledzionie zawierają także enkefaliny i neuropeptyd Y [8]. Większą jednakowoż rolę w neuroimmunomodulacji zdają się odgrywać czynniki humoralne (hormony, opioidy, neurotransmitery). Limfocyty noszą na swej błonie komórkowej receptory dla wielu różnych hormonów i autakoidów. Nie są one rozpowszechnione przypadkowo; różne receptory występują z różną gęstością na poszczególnych podtypach limfocytów, a ich dystrybucja może się zmieniać w pewnych stanach chorobowych [14].

2.1. Powszechnie znany i wykorzystywany w medycynie jest efekt immunosupresyjny i przeciwzapalny glikokortykosteroidów. Receptory dla nich występują na wszystkich populacjach leukocytów. Steroidy hamują proliferację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pod wpływem czynników mitogennych; powodują obumarcie niektórych subpopulacji mysich tymocytów tak *in vivo*, jak *in vitro* przez uszkodzenie błony jądrowej i DNA. (To ostatnie zjawisko nie występuje u ludzi ani świnek morskich.) [14] Podobnie jak w wypadku innych komórek, steroid wiąże się z receptorem cytoplazmatycznym limfocytu, po czym kompleks ligand–receptor wędruje do jądra komórkowego, gdzie indukuje syntezę nowego mRNA, a zatem nowego białka. Najważniejsza z indukowanych białek dla działania przeciwzapalnego glikokortykosteroidów jest lipokortyna. Jest ona silnym inhibitorem fosfolipaz (w tym fosfolipazy A_2). Hamowanie aktywności fosfolipaz zapobiega uwalnianiu kwasu arachidonowego z fosfolipidów błon komórkowych i jego

wstępowaniu na szlak przemian cyklooksygenazy i lipooksygenazy, zmniejsza więc biosyntezę prostaglandyn, tromboksanów i leukotrienów, potężnych mediatorów procesu zapalnego. Steroidy hamują też uwalnianie z komórek interleukin 1 i 2 [14]. Niektóre limfokiny mają jednak zdolność przeciwdziałania ich wpływowi immunosupresyjnemu, co pozwala na aktywację limfocytów wobec glikokortykosteroidów [1].

2.2. Centralnym narządem układu gruczołów dokrewnych jest przysadka mózgowa, której hormony sterują wydzielaniem innych gruczołów, same zaś pozostają pod kontrolą podwzgórza. Przysadka mózgowa wydziela tak hormony o działaniu immunostymulującym, jak i immunosupresyjnym. Jednakże, jak wykazał B e r c z i w roku 1978, u zwierząt po usunięciu tego organu dochodzi do osłabienia komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej, w tym reakcji autoimmunologicznych [3].

2.2.1. Działanie immunosupresyjne kortykotropiny (ACTH), hormonu przysadkowego powodującego sekrecję kortykosteroidów z kory nadnerczy, jest w dużym stopniu zależne od glikokortykosteroidów i nie występuje u zwierząt po adrenalektomii. Ale ACTH podany dokomorowo królikom skutecznie obniża gorączkę i usunięcie kory nadnerczy nie wpływa na ten efekt. Na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej występują dwa typy receptorów dla ACTH o różnym powinowactwie z ligandem. Pobudzenie tych receptorów zmniejsza wytwarzanie przeciwciał przez limfocyty B [14]. ACTH, podobnie jak peptydy opioidowe, jest pochodną prekursora zwanego proopiomelanokortyną (POMC) (patrz niżej). Wykazano, że normalne leukocyty mają zdolność syntezy POMC i jej pochodnych. Sekwencja leukocytnego ACTH jest identyczna z sekwencją hormonu przysadkowego, a kontrola sekrecji jest analogiczna: aktywują ją kortykoliberyna (CRF — podwzgórzowy czynnik uwalniający ACTH z przysadki mózgowej) i wazopresyna, hamują glikokortykosteroidy poprzez modulację transkrypcji genu POMC. Jest to więc prawdziwy hormon przysadkowy syntetyzowany przez limfocyty, a zatem biosynteza hormonów nie jest ograniczona tylko do wyspecjalizowanych komórek gruczołów wydzielania wewnętrznego.

2.2.2. W leukocytach wykryto również hormon tyreotropowy (TSH) oraz kodujący go mRNA [2]. Tyreoliberyna, podwzgórzowy czynnik uwalniający TSH, zwiększa ilość tego mRNA i samego białka w leukocytach podobnie jak w przysadce. TSH jest również wydzielany przez limfocyty T stymulowane enterotoksyną gronkowca złocistego; hormon ten w badaniach *in vitro* nasilał odpowiedź humoralną [14]. Kolejnym hormonem wyizolowanym z limfocytów jest gonadotropina kosmówkowa. Jej synteza przez limfocyty może być konieczna do implantacji zapłodnionej komórki jajowej w ścianie macicy [2]. α -melanotropina (α -MSH), inny hormon przysadki pochodny proopiomelanokortyny, wywiera silne działanie przeciwgorączkowe, jest też antagonistą interleukiny 1 w jej stymulacji tymocytów i uwalnianiu prostaglandyn. [1]

2.2.3. Hormonem przysadki mózgowej istotnym dla przebiegu odpowiedzi immunologicznej jest hormon wzrostu (somatotropina; STH). Także on może być wydzielany przez limfocyty, co podlega regulacji adrenergicznej. Jest on być może sygnałem inicjującym odpowiedź immunologiczną; ma zdolność przywracania reaktywności u szczurów wprowadzonych w stan immunosupresji za pomocą ACTH. Bierze udział jako czynnik pomocniczy w generacji cytotoksycznych limfocytów T [14]. Myszy i psy z zespołem karłowatości przysadkowej manifestują różny stopień niedoboru odporności, lecz u człowieka karłowatość przysadkowa nie jest znamiennej związana z tym niedoborem. U ludzi stres fizyczny lub psychospołeczny wzmacnia sekrecję STH, natomiast u niższych ssaków jego uwalnianie zostaje w warunkach stresowych zahamowane [11]. Somatostatyna, podwzgórzowy czynnik hamujący uwalnianie somatotropiny, swoiście hamuje sekrecję immunoglobulin klasy IgA bez wpływu na klasy G i M [14].

2.2.4. Hormonem pokrewnym STH jest prolaktyna (PRL), zawiadująca rozwojem gruczołów mlekowych i wydzielaniem mleka. Receptory dla niej występują na limfocytach i monocytach u szczurów i ludzi. PRL stymuluje komórkową odpowiedź immunologiczną oraz pobudza powstawanie anionów nadtlennych w makrofagach i granulocytach obojętnochłonnych. Działa bezpośrednio na procesy zachodzące na błonie komórkowej limfocytów i na metabolizm leukocytów. Antagonistą PRL jest znany lek immunosupresyjny, cyklosporyna A, która jednak nie hamuje wiązania hormonu w gruczole mlekowym, co świadczy o heterogenności receptorów. Bromokryptyna (lek dopaminergiczny silnie hamujący sekrecję PRL) ma działanie immunosupresyjne, które jest znoszone przez egzogenne PRL i STH. W warunkach fizjologicznych zwiększenie ilości prolaktyny w surowicy następuje pod wpływem stresu, ciężkiej pracy, podwyższenia temperatury środowiska [1, 11]. Hyperprolaktynemia bywa związana z ciężkimi stanami autoimmunologicznymi w przebiegu choroby Addisona lub tocznia rumieniowatego układowego u mężczyzn; hypoprolaktynemię obserwuje się u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Karły przysadkowe nie manifestują zaburzeń w działaniu PRL; nie stwierdzono występowania łącznego niedoboru STH i PRL. Być może PRL chroni tych chorych przed niedoborem odporności, połączony zaś niedobór STH i PRL jest defektem letalnym związanym z totalnym niedoborem immunologicznym. W roku 1987 Istvan B e r c z i, Węgier pracujący w Kanadzie, sformułował hipotezę, iż przysadka mózgowa (a za jej pośrednictwem podwzgórze i wyższe ośrodki nerwowe) reguluje odpowiedź immunologiczną poprzez kontrolę wzrostu tkanek chłonnych. Proliferacja jest warunkiem wstępnym wszelkich reakcji immunologicznych, dlatego jej kontrola jest skuteczną regulacją odpowiedzi immunologicznej. STH i PRL promują wzrost tkanki limfatycznej przez aktywację onkogenu *c-myc*, co czyni komórki wrażliwymi na czynniki wzrostowe. Natomiast oś kortykotropina – glikokortykosteroidy miałyby działać antagonistycznie [1]. Dowodami słuszności tej

hipotezy miałyby być: (i) silne działanie immunosupresyjne cyklosporyny A i glikokortykosteroidów; (ii) deregulacja onkogenu *c-myc* obserwowana w chłoniakach złośliwych.

2.3. Ważnym, choć słabo znanym ogniwem regulacji neurohormonalnej jest szyszynka, tajemnicze trzecie oko boga Sziwy z mitologii indyjskiej. Przez długi czas uważano, że u ssaków jest organem szczątkowym, jednakże pod koniec lat pięćdziesiątych wyizolowano z niej substancję hormonalną pochodną serotoniny, którą nazwano melatoniną, gdyż u płazów powoduje zmianę działania melanotropiny na komórki barwnikowe skóry. Usunięcie szyszynki u szczurów powoduje zahamowanie odczynu Arthusa, reakcji nadwrażliwości opóźnionej i rozwoju doświadczonego alergicznego zapalenia mózgu. Melatonina hamuje wydzielanie jednej z gonadotropin przysadkowych, mianowicie folikulotropiny (FSH), oraz ACTH; zmniejsza też czynność wydzielniczą gruczołu tarczowego. W układzie odpornościowym przypisuje się jej rolę immunoregulacyjną, zwłaszcza w warunkach stresowych [10].

3.1. Inną grupą substancji biologicznie czynnych działających w układach immunologicznym i nerwowym są peptydy opioidowe: enkefaliny i endorfiny [18]. Są to naturalne ligandy receptorów opioidowych (wiążących morfinę i jej pochodne), modulujące percepcję bólu. W układzie nerwowym pełnią one funkcje neuroprzekaźników i modulatorów, mają też pewne cechy hormonów obwodowych. W układzie immunologicznym ich działanie jest złożone, wielokierunkowe, ciągle jeszcze niejasne. Wspomniani już Hughes i Kosterlitz zidentyfikowali dwa pentapeptydy, *leu*-enkefalinę i *met*-enkefalinę, zawarte w sekwencji aminokwasowej β -lipotropiny (hormonu przysadki mózgowej o nie znanej jeszcze funkcji w organizmie człowieka). W innych laboratoriach wyizolowano dłuższe peptydy, nazwane endorfinami α , β i γ oraz dynorfinami. Wszystkie te peptydy mają identyczną sekwencję czterech aminokwasów N-końcowych: NH_2 -Tyr-Gly-Gly-Phe... Są to pochodne trzech białek prekursorowych, których sekwencja zapisana jest w kodzie genetycznym: proopiomelanokortyny, proenkefaliny i prodynorfiny. Enkefaliny i endorfiny są produktami ich obróbki posttranslacyjnej, głównie enzymatycznego trawienia wiązania pomiędzy dwoma aminokwasami zasadowymi: Arg-Arg i Arg-Lys. Proopiomelanokortyna (265 reszt aminokwasowych) została jako pierwsza opisana w przednim płacie przysadki mózgowej. Występuje też w podwzgórzu, płucach, przewodzie pokarmowym i łożysku. Jest ona macierzą dla ACTH, MSH i β -endorfiny. Jej pochodne to hormony układu neuroendokrynnego, których syntezę i sekrecję stwierdzono po raz pierwszy w komórkach układu immunologicznego [2]. Ekspresja genu POMC jest regulowana głównie przez kortykoliberynę (CRF) [9]. Opisano dotychczas 18 peptydów opioidowych.

3.2. W OUN stwierdzono kilka typów receptorów opioidowych (oznaczonych literami alfabetu greckiego) różniących się funkcją tudzież powinowactwem z agonistami i antagonistami. Funkcje receptora typu δ w OUN pozostają

niejasne, a receptor opioidowy na komórkach limfoidalnych jest prawdopodobnie tożsamy właśnie z receptorem typu delta [2]. β -endorfina ma wysokie powinowactwo do receptorów μ , κ i δ ; enkefaliny zaś do receptora δ i mniejsze do μ . Receptory opioidowe są swoiste dla wspólnego N-końca rzeczonych peptydów, pewne fakty wskazują jednak na istnienie na limfocytach receptorów dla C-końca β -endorfiny (taki receptor opisano już też w OUN). Efekty działania tego peptydu, które nie są hamowane przez nalokson (jest to swoisty antagonist receptorów opioidowych) – takie jak nasilenie proliferacji limfocytów śledzionowych szczura pod wpływem lektyn lub zwiększenie syntezy interleukiny 2 przez aktywowane mysie komórki T – uważa się za skutki pobudzenia nieopiodowego receptora β -endorfiny.

3.3. Oto tylko kilka przykładów działania opioidów na układ odpornościowy. Peptydy opioidowe wywierają efekt chemotaktyczny na limfocyty, granulocyty i monocyty. Endorfiny prawdopodobnie biorą udział w rozwoju wstrząsu endotoksycznego [2]; niektórzy autorzy sugerują, że główną rolą opioidów jest regulacja odpowiedzi immunologicznej w warunkach stresu. Endorfiny β i γ oraz *met*-enkefalina nasilają cytotoksyczność komórek NK*, ich zdolność do wytwarzania interferonu oraz generację cytotoksycznych limfocytów T w mieszanej hodowli limfocytów [2, 9]. U szczurów rasy Wistar wywierają działania antyanafilaktyczne, zmniejszając syntezę IgE i degranulację komórek tucznych; ale także zapobiegają hamowaniu przez dopaminę, prostaglandynę E_1 i izoprotenerol wydzielania serotoniny przez mastocyty stymulowane IgE. β -endorfina nasila proliferację limfocytów śledzionowych u szczurów, a *met*-enkefalina – u myszy. α -endorfina silnie hamuje odpowiedź humoralną; również enkefaliny u ludzi i myszy hamują wytwarzanie przeciwciał. Opioidy aktywują też generację rodników nadtlenkowych w makrofagach i granulocytach obojętnochłonnych. Inkubacja makrofagów otrzewnowych szczura z *met*-enkefaliną zwiększa ich skuteczność wobec komórek docelowych. Peptydy opioidowe wywierają też wpływ na antygeny powierzchniowe limfocytów.

W ostatnich latach ukazały się bardzo liczne prace dotyczące immunologicznych następstw podawania enkefalin i endorfin, przy czym wyniki badań bywały sprzeczne, opisywano immunopotencjalizację i immunosupresję. Dopiero doniesienia grupy J a n k o w i ć a z Belgradu dowiodły, że enkefaliny wywierają (przynajmniej u szczurów) efekt dwojaki w zależności od dawki: stosunkowo duże dawki hamują, natomiast małe dawki wzmacniają różnorodne reakcje immunologiczne.

3.4. Niejednokrotnie zwracano uwagę na częste występowanie chorób zakaźnych i inwazyjnych u osób uzależnionych od narkotyków opiatowych.

* Komórki NK (natural killer cells) są to limfocyty pochodzące ze szpiku kostnego, zdolne do zabijania różnorodnych komórek docelowych bez uprzedniego uczulenia i bez restrykcji MHC. Mają ogromne znaczenie dla odporności przeciwnowotworowej.

Zjawisko to związane bywa przede wszystkim z łatwością zakażenia przy wielokrotnych iniekcjach bez postępowania aseptycznego, jednakże może być związane z przewlekłym działaniem opiatów i niedoborami odpornościowymi. U ludzi uzależnionych obserwowano zmniejszenie liczby limfocytów T w krwi krążącej i obniżenie stosunku limfocytów T pomocniczych do supresorowych, upośledzenie odpowiedzi humoralnej, zaburzenia fagocytozy i syntezy rodników nadtlenkowych.

3.5. Komórki układu immunologicznego nie tylko odpowiadają na peptydy opioidowe, lecz mogą też je syntetyzować. W aktywowanych pomocniczych limfocytach T myszy wykryto mRNA dla preproenkefalin, makrofagi śledzionowe zawierają mRNA dla β -endorfiny, a *met-enkefalinę* znaleziono w komórkach miazgi białej śledziony szczura. Ekspresję genu proopiomelanokortyny stwierdzono w ludzkich limfocytach T i B. Ludzki interferon alfa może wiązać się do receptorów opioidowych w mózgu myszy, wywołując efekt analgetyczny i katatoniczny. Łagodzi on też objawy doświadczalnego zespołu odstawienia u szczurów uzależnionych od morfiny.

3.6. Obecnie prowadzone są próby zastosowania peptydów opioidowych jako immunomodulatorów u ludzi cierpiących na choroby nowotworowe i AIDS [15]. Grupa prof. W y b r a n a podawała *met-enkefalinę* chorym na raka oskrzela, obserwując wzrost aktywności komórek NK i liczby limfocytów z antygenami Leu11 i OKT10. U chorych na AIDS *met-enkefalina* podnosi w krwi obwodowej liczbę limfocytów T3+T4+, wydzielanie interleukiny 2 i odpowiedź proliferacyjną limfocytów na tę limfokinę.

3.7. Warto może wspomnieć, że peptydy opioidowe występują nie tylko u kręgowców. Wykazano, że u bezkręgowców biorą udział w regulacji mechanizmów odpornościowych. Hemocyty morskich mięczaków z rodzaju *Mytilus* i karaluchów z rodzaju *Leucophaea* są obiecującym modelem badań nad wpływem opioidów na reakcje immunologiczne. Na tych komórkach występują także receptory dopaminergiczne [18].

4.1. Nie tylko układ nerwowy moduluje przebieg odpowiedzi immunologicznej, ale też odpowiedź ta wpływa na funkcje OUN, a pośredniczą w tym między innymi interleukiny (IL)*. Podanie IL-1 tak obwodowo, jak i ośrodkowo powoduje rozwój odpowiedzi ostrej fazy; również dokomorowe wstrzyknięcie tej cytokiny zmienia profil sekrecji białek przez hepatocyty. Interleukina 1 działając ośrodkowo wywiera też wpływ na reakcje immunologiczne na obwodzie. Małe dawki IL-1 podane domózgowo (do komory bocznej) w krótkim czasie wywoływały zahamowanie aktywności komórek NK i wydzielania IL-2 przez limfocyty krwi obwodowej i śledziony. Zjawisko to jest niezależne

* Wiadomości o interleukinach i ich funkcjach w układzie immunologicznym przedstawia artykuł doc. Z i m e c k i e g o w tymże zeszycie.

od osi przysadkowo-nadnerczowej, gdyż występuje u zwierząt pozbawionych nadnerczy, jest natomiast blokowane przez α -melanotropinę (α -MSH), wspomniany już hormon przysadki pochodny proopiomelanokortyny. Oprócz tego IL-1 zwiększa ekspresję mRNA dla POMC w komórkach przysadki mózgowej [8].

4.2. Pojawia się tutaj problem bariery krew–mózg, którą do niedawna uważano za skuteczną przeszkodę dla limfokin. Obecnie jednak wiadomo, że bariera ta nie jest tak idealnie szczelna, a mogą ją nawet przeniknąć aktywowane limfocyty T [16]. Są też pośrednie dowody na to, że w pewnych regionach w okolicach komór III i IV bariera krew–mózg jest przepuszczalna dla interleukin [19].

4.3. Ostatnio sugeruje się, że interleukina 1 jest nie tylko mediatorem odpowiedzi ostrej fazy, lecz że odgrywa istotną (aczkolwiek nie do końca poznaną) rolę w OUN w warunkach fizjologicznych. Autoradiograficznie stwierdzono u szczurów rozprzestrzenienie receptorów błonowych dla IL-1 w prawie całym mózgu. Liczne receptory wykryto w okolicach bogatych w neurony: w pewnych okolicach kory mózgowej, jądrach podkorowych, jądrach wzgórze i podwzgórze, jądrach i pewnych warstwach kory mózdzku. Stwierdzono także obecność mRNA dla IL-1- β — przede wszystkim w mózdzku i hipokampie, a także w niektórych neuronach podwzgórzowych [6]. Peptyd o aktywności podobnej do IL-1 znaleziono w normalnym płynie mózgowo-rdzeniowym; poziom jej waha się w cyklu snu i czuwania. Egzogenna IL-1 (podana obwodowo lub ośrodkowo) wywiera znaczny wpływ na oś podwzgórzowo-przysadkową. Nie działa ona bezpośrednio na tkankę nadnerczy, nie wiadomo, czy działa na poziomie przysadki, natomiast indukuje uwalnianie kortykoliberyny (CRH) w podwzgórze. Odnerwienie podwzgórze powoduje zanik tego efektu, co sugeruje wpływ wyższych ośrodków nerwowych [19]. Oprócz tego IL-1 indukuje sekrecję STH i PRL. Z kolei interleukina 6 stymuluje wydzielanie ACTH, STH i PRL przez komórki przysadki (co hamuje dopamina). Istnieje możliwość, że IL-6 jest uwalniania w podwzgórze i funkcjonuje jako jeszcze jedna liberyna. Komórki pęcherzykowo-gwiazdkiste przysadki są również zdolne do jej wydzielania. Dlatego regulacja sekrecji hormonów przez IL-6 jest zapewne procesem złożonym z udziałem interleukiny ze źródeł podwzgórzowych, śródprzysadkowych i obwodowych. IL-6 może wpływać na wydzielanie podstawowe oraz na odpowiedź płata przedniego przysadki na liberyny podwzgórze. Na obwodzie zaś glikokortykosteroidy hamują syntezę IL-6 w monocytach.

4.4. W OUN wykryto także obecność innej interleukiny, mianowicie IL-3 i jej receptorów, lecz ich rola fizjologiczna pozostaje zupełnie niewyjaśniona [6]. Najnowsze doniesienia postulują możliwość, że funkcje neuromodulatora pełni też interleukina 2.

ROZDZIAŁ II

Podane wyżej fakty niezbicie dowodzą istnienia licznych wielokierunkowych zależności pomiędzy układem neurohormonalnym a immunologicznym na poziomie komórek, mediatorów i receptorów. Ich zrozumienie powinno umożliwić bardziej owocne wykorzystanie fenomenów neuroimmunomodulacji w klinice. Wszelako neuroimmunologia nie ogranicza swych zainteresowań do tego poziomu; interesuje ją również poziom wyższy i zależności pomiędzy zjawiskami psychicznymi a odpornością. Zagadnienia te zostaną przedstawione w niniejszym rozdziale.

1. Prowadzono liczne badania elektrofizjologiczne na zwierzętach, obserwując modyfikację funkcji immunologicznych po stymulacji lub zniszczeniu poszczególnych ośrodków mózgowych oraz zmiany aktywności neuronów w przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzono, że uszkodzenie przedniej części podwzgórza powoduje zahamowanie sekrecji przeciwciał w odpowiedzi na niektóre antygeny, osłabienie nadwrażliwości typu I i IV, zahamowanie rozwoju doświadczalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE). Podobne efekty wywołuje dokomorowe podanie analogów katecholamin i serotoniny blokujących ich receptory [13]. Z kolei czynniki immunologiczne powodują zmiany neuroendokrynnie i elektrofizjologiczne w mózgu. Na przykład mikroelektrody umieszczone w polu przedwzrokowym i jądrze przykomorowym podwzgórza rejestrowały zmiany aktywności elektrycznej komórek nerwowych w przebiegu pierwotnej i wtórnej odpowiedzi szczurów na krwinki barana, a cyklofosfamid zapobiegał temu zjawisku [13]. Wydaje się więc, że drogi nerwowe podwzgórzowe biorą udział w modulacji odpowiedzi immunologicznej; mogą one stanowić ramię pętli sprzężenia zwrotnego aktywowanego podczas inwazji antygeny.

Wydaje się, że kora mózgowa bierze niewielki udział w immunoregulacji, a jednak jej uszkodzenie u myszy powoduje deplecję limfocytów T. Zniszczenie prawostronne nasila, lewostronne zaś osłabia odpowiedź komórkową (bez wpływu na limfocyty B). Również choroby atopowe i autoimmunologiczne zapalenia tarczycy występują częściej u ludzi leworęcznych niż u ich praworęcznych krewnych [10, 13].

2.1. Związki pomiędzy wyższymi czynnościami nerwowymi a odpornością organizmu poznano najlepiej badając zjawisko stresu. Obserwacje Selleyego z lat trzydziestych tego wieku uważane są za pierwsze dowody powiązań narządów układu neurohormonalnego z organami układu immunologicznego. A po pół wieku Michael Irvin z San Diego wykazał, że stres emocjonalny powoduje uwalnianie kortykoliberyny (CRF) z podwzgórza.

2.2. Opisy wpływu stresorów na funkcje układu immunologicznego pojawiały się więc w literaturze od lat, wszelako nie były znane przyczyny ani mechanizmy wrażliwości komórek limfoidalnych i mieloidalnych na stres. Wyniki wczesnych badań na zwierzętach dowodziły, że stres wywołuje immunosupresję i przyspiesza wzrost nowotworów [4]. Na przykład u myszy

poddanych działaniu stresu obniżona jest sekrecja interferonu i odporność przeciwwirusowa, zahamowany rozwój EAE i mniej prawdopodobne odrzucenie alloprzeszczepu skóry. U szczurów opisywano głęboką supresję proliferacji komórek T w odpowiedzi na lektyny, aktywności komórek NK i sekrecji IL-2 i interferonu γ [20]. Co ciekawe, biorą tu udział dwa różne mechanizmy reakcji: supresja odpowiedzi limfocytów T na mitogeny jest niezależna od receptora opioidowego i ulega habituacji po kilku sesjach stresu; obniżenie aktywności komórek NK nie poddaje się habituacji, lecz może być zniesione za pomocą naloksonu, zatem w reakcji tej biorą udział opioidy. Wpływ stresu na odporność jest więc złożony, zależy nie tylko od cech stresora, lecz i od relacji czasu jego aplikacji do przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Pewne stresory mogą też nasilać odporność na patogeny [4]. Bardzo ważna jest zdolność przewidywania i kontroli wystąpienia stresu. Wykazano, że pojedyncza sesja nieuniknionych elektrowstrząsów nasilała wzrost guzów u szczurów w porównaniu ze zwierzętami, które miały możliwość ucieczki przed tym stresem [4]. Wymuszony stres hamował też odrzucanie przeszczepionych nowotworów; podobnie odpowiedź limfocytów na mitogeny była obniżona u zwierząt poddanych niespodziewanym elektrowstrząsom w porównaniu ze szczurami poddanymi elektrowstrząsom spodziewanym. Nasilenie odpowiedzi immunologicznej zdarza się przy przewlekłym oddziaływaniu stresorów; również stres łagodniejszy od zazwyczaj stosowanych w eksperymentach nasila odporność [20]. Wyniki takich prac bywały krytykowane, gdyż elektrowstrząsy mają niewiele wspólnego ze stresami, na które zwierzęta mogą być narażone w swoim środowisku naturalnym. Ale wpływ na fenomeny immunologiczne mają też stresy „socjologiczne” — zatłoczenie klatek czy częste przegrupowywanie zwierząt. Przedwczesne oddzielenie małpiątek od matek obniża ich odporność przeciwwirusową. Przeciwnie, dominacja u myszy i szczurów jest związana z nasiloną odpowiedzią komórkową i humoralną [4].

2.3.1. Wpływ stresu na odporność opisywany jest także u ludzi. Badania prowadzi się zazwyczaj na studentach w okresie sesji egzaminacyjnej i na chorych psychicznie w stanie depresji [4], a także na ludziach długotrwale bezrobotnych, okrytych żałobą lub cierpiących z powodu złych stosunków w małżeństwie. I tak, u studentów w czasie sesji stwierdzano zaburzenia stosunku poszczególnych subpopulacji limfocytów T, obniżenie odpowiedzi limfocytów na mitogeny, aktywności komórek NK, sekrecji interferonu γ , reaktywację opryszczki, a także wzrost miana przeciwciał skierowanych przeciw wirusom latentnym (opryszczki, cytomegalii i wirusowi Epsteina-Barr; wzrost miana przeciwciał uważa się za wykładnik wyzwolenia się wirusa spod kontroli układu odpornościowego). Co ciekawe, miano tych przeciwciał było skorelowane z indeksem poczucia samotności w przeprowadzanych równolegle testach psychologicznych, samotność zatem była dodatkowym czynnikiem immunosupresyjnym.

Podobne fenomeny obserwowano u ludzi dotkniętych utratą bliskiej osoby lub pracy. W Stanach Zjednoczonych szczęście małżeńskie uważane jest za

ważny czynnik wpływający na stan zdrowia. U kobiet owdowiałych w 6 tygodni po śmierci męża wykazano zahamowaną odpowiedź limfoproliferacyjną na stymulację mitogenami, a także obniżoną aktywność komórek NK. Również limfocyty żon mężczyzn z zaawansowanym procesem nowotworowym słabiej odpowiadają na stymulację. U kobiet rozwiedzionych, w porównaniu z mężatkami, stwierdzono znamienne obniżoną odpowiedź komórkową i reakcję limfocytów na mitogeny [5].

Chorzy hospitalizowani z powodu depresji demonstrują również osłabioną odpowiedź limfocytów na mitogeny. Zjawisko to jest zależne od przebiegu choroby: u tych samych pacjentów limfoproliferacja jest zmniejszona w okresie ostrego rzutu choroby w stosunku do okresu remisji [5]. Zmniejszone jest też wydzielanie hormonów przez limfocyty tych chorych. Jednakże obniżoną odporność mają też cyklofrenicy w stadium manii. Ponadto u chorych umysłowo obserwowano zahamowanie aktywności komórek NK, a w niektórych badaniach także spadek ich liczby.

2.3.2. Niektórzy badacze postulują wpływ nastroju chorego na przebieg choroby. I tak, na przykład, czas przeżycia kobiet z rakiem sutka istotnie zależy od postawy chorej, czynników psychologicznych i socjologicznych. U kobiet demonstrujących pasywny stoicyzm i apatię, pozbawionych oparcia środowiska, znamienne obniżona jest aktywność komórek NK [4].

2.3.3. Wydaje się więc, że zmiany w układzie immunologicznym, indukowane przez stresory fizyczne, mogą być modyfikowane przez czynniki fizjologiczne i trening. Zdolność do zmagania ze stresem może osłabiać jego negatywny wpływ na odporność. Trzeba jednak powiedzieć, że choć wyniki badań wiążą wdowieństwo, rozwód, bezrobocie, podróż kosmiczną czy depresję z obniżeniem odpowiedzi immunologicznej, to konieczne są dalsze studia. Nie jest jeszcze poznane kliniczne znaczenie obniżenia odporności pod wpływem czynników psychologicznych. Poza tym osoby poddane działaniu stresu zazwyczaj palą więcej papierosów, piją więcej alkoholu niż zwykle, gorzej śpią i odżywiają się — a wszystkie te czynniki mogą również zmniejszać odporność organizmu [5].

2.4. Pewnym paradoksem jest fakt, że chociaż stres obniża immunokompetencję, to jednak bywa związany z początkiem i nasila rozwój chorób o podłożu autoimmunologicznym. Ponieważ jest raczej nieprawdopodobne, aby stres zmieniał antygenowość tkanek, przyczyna tego zjawiska kryje się w deregulacji układu odpornościowego. Badania retrospektywne dostarczają dowodów na związek licznych chorób ze stresami. Początek cukrzycy insulinozależnej często bywa związany z ciężkim stresem, jakim jest śmierć lub rozwód rodziców. Początek i nawroty choroby Leśniowskiego-Crohna, nawroty zapalenia błony naczyniowej gałki ocznej są związane z przeżyciem stresu. Twierdzi się też, że reumatoidalne zapalenie stawów rozwija się częściej i ma cięższy przebieg u chorych pod działaniem stresorów. Pacjentki (gdyż choroba ta atakuje częściej kobiety) są bardziej nerwowe i napięte psychicznie

od zdrowych kobiet. U chorych, u których dochodzi do dekompensacji emocjonalnej, często obserwuje się szybszy postęp choroby oraz słabą odpowiedź na farmakoterapię. Dlatego spotyka się pogląd, że przebieg tej choroby jest związany z integralnością obrony psychicznej pacjenta [15].

Trzeba jednak powtórnie zaznaczyć, że według ostatnich badań wpływ stresu na przebieg choroby zależy (oprócz cech osobniczych) od siły reakcji stresowej. Umiarkowana odpowiedź na stres powoduje przewagę odpowiedzi komórkowej nad humoralną, oporność organizmu na patogeny pozostające pod kontrolą odporności komórkowej (np. świdrowce z rodzaju *Leishmania*, prątki Kocha czy Hansena) i wrażliwość na choroby autoimmunologiczne związane z komórkowym typem odpowiedzi, a do takich należy reumatoidalne zapalenie stawów. Przeciwnie, nasilona odpowiedź na stres wiąże się ze względną przewagą odpowiedzi humoralnej, wrażliwością na wspomniane patogeny i opornością na reumatoidalne zapalenie stawów, doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego i podobne schorzenia [12].

2.5. Badania wpływu psychiki na układ immunologiczny przynoszą niekiedy wyniki wręcz humorystyczne. W roku 1963 w Anglii wykonano doświadczenie, w którym pod wpływem sugestii hipnotycznej nie rozwinął się skórny odczyn tuberkulinowy. Reakcja była makroskopowo ujemna, lecz histopatologicznie dodatnia — zatem pod wpływem hipnozy skóra nie odpowiedziała na mediatory reakcji zapalnej. Nie udało się nigdy powtórzyć tego ze wszech miar interesującego eksperymentu [10]. Natomiast poważnie wypada traktować badania nad warunkowaniem odpowiedzi immunologicznej. Doświadczenia zgodnie z procedurą Pawłowa prowadzili jeszcze w latach dwudziestych Metalnikov i Chorin. W ciągu ostatnich 15 lat badania takie prowadzono m.in. w USA, Jugosławii, Niemczech i Kanadzie. Na przykład podawano szczurom osłodzoną sacharyną wodę (bodziec warunkowy) i cyklofosfamid (bodziec bezwarunkowy), po czym sama osłodzona woda wywoływała immunosupresję porównywalną z cyklofosfamidem [10, 17]. Obecnie nie ma raczej wątpliwości, że można uwarunkować immunosupresję u zwierząt doświadczalnych, a ostatnio para badaczy z Memorial Sloan-Kettering Cancer Center w Nowym Jorku wykazała, że u chorych poddawanych chemioterapii może się rozwinąć uwarunkowana supresja odporności wskutek powtarzanych wizyt w szpitalu w celu kolejnych cykli kuracji przeciwnowotworowej. Nie ma natomiast jeszcze niepodważalnego dowodu uwarunkowanej immunopotencjalizacji, aczkolwiek zdania uczonych są w tej kwestii podzielone. W pewnych bowiem warunkach zapach olejku kamforowego mógł zastąpić interferon β zwiększający aktywność komórek NK [10].

3. W świetle obecnej wiedzy wyłania się następujący obraz: antygen wnikaający do ustroju prezentowany jest przez odpowiednie komórki pomocniczym limfocytom T, które wysyłają sygnały nie tylko w obrębie układu immunologicznego, lecz także do OUN i organów neuroendokrynnych. Sygnały te mogą być przenoszone przez cytokiny, może też przez klasyczne białka

hormonalne wydzielane przez komórki układu odpornościowego. Te „immunotransmitery” stanowią część aferentną pętli sprzężenia zwrotnego [4], którego częścią eferentną jest oś podwzgórzowo-przysadkowa i układ sympatyczny. Owo sprzężenie zwrotne gra ważną rolę w koordynacji odpowiedzi behawioralnej i fizjologicznej na infekcję i zapalenie. Spotykamy się z pokusą interpretacji wpływu czynników psychologicznych na układ immunologiczny w kontekście psychosomatycznego modelu choroby. Można domniemywać, że cechy osobowe i zjawiska psychologiczne grają rolę przyczynową w etiologii licznych chorób, nie tylko tych o podłożu autoimmunologicznym. Ale jeżeli wrażliwość układu immunologicznego na stresory stanowi część pętli sprzężenia zwrotnego, to można równie dobrze postulować zależność odwrotną. Mianowicie skłonności emocjonalne i cechy psychologiczne mogą być manifestacjami zmian w ośrodkowym układzie nerwowym, zmian spowodowanych nawet niewykrywalnymi zaburzeniami funkcji immunologicznych. Na przykład uczucie bezradności i beznadziejności u osób dotkniętych chorobą nowotworową, a obserwowane jeszcze przed postawieniem rozpoznania, może być wtórne do ośrodkowych skutków działania produktów komórek immunologicznych lub nowotworowych [4]. Znanie są też typowe zmiany charakterologiczne chorych na gruźlicę. I druga sprawa: można przypuszczać, że jak stres zaburza funkcje układu immunologicznego, tak dobre samopoczucie (również w aspekcie psychologicznym i socjologicznym) może wzmacniać odporność przeciwpalną i przeciwnowotworową [15]. Jednakowoż popularyzacja neuroimmunologii niesie ze sobą niebezpieczeństwa związane właśnie z tym jej aspektem i z niezrozumieniem jej istoty. Ostatnio na listach amerykańskich bestsellerów znalazły się dwie książki zawierające wskazania, jak można zwalczyć choroby za pomocą właściwego myślenia i nastawienia do własnej choroby. Wymienia się tam m.in. jaskrę i zapalenie wyrostka robaczkowego – i jeżeli naiwny a rozczarowany do medycyny oficjalnej czytelnik uwierzy w te brednie, może się to dlań skończyć ślepotą bądź zgonem [17].

ZAKOŃCZENIE

Znajdujemy się w środku rewolucji w podstawowych naukach biomedycznych, rewolucji, która pociągnie za sobą wielkie przemiany w medycynie klinicznej i, co ważniejsze, medycynie prewencyjnej [17]. Chociaż wiele jeszcze musimy się dowiedzieć o interakcjach układu immunologicznego z układem neurohormonalnym i innymi narządami i tkankami, wydaje się pewne, że układ immunologiczny ma zdolność mobilizacji całego organizmu w interesie obrony gospodarza przed inwazją patogenów. Musi on być obecnie postrzegany jako układ o nieuniknionej funkcjonalnej i regulacyjnej interakcji z całym ustrojem, nie zaś jako autonomiczny, samoregulujący się kompartment [1]. Zadaniem naszym pozostaje zrozumienie, jak może dochodzić do rozchwiania homeostatycznych mechanizmów regulatorowych, a w konsekwencji do choroby [4].

NEUROIMMUNOLOGY

Summary

Until recently it has been generally accepted that homeostasis is maintained by the nervous and endocrine systems. Those systems cooperate closely. The immune system, on the contrary, has been considered completely independent. It defends the body in splendid isolation from other systems. However, nowadays the opposite point of view is generally taken. There is a perpetual interchange of signals among the nervous, endocrine, and immune systems. Coordinated activity of those three systems integrates the living organism and is an essential condition of maintaining the homeostasis.

The first chapter of the article discusses briefly the main ways of communication between the neuroendocrine and immune systems. The lymphoid organs' innervation, pituitary and pineal hormones, opioid peptides as well as interleukins have been described. The second chapter focuses on the connection between psyche and immunity. The closed link between stress and immunocompromising is conferred in detail. Animal and human experiments are described. Emphasis is put on the influence of psychic phenomena on the course of cancer and autoimmune diseases, e.g., rheumatoid arthritis and Crohn disease.

In conclusion, it has been stated that the immune system can mobilize the whole organism to defend the host against the pathogens. It should be regarded not as an autonomous and autoregulating compartment, but as a system that interacts with other body systems. Neuroimmunology has caused a revolution in the life sciences. Further understanding of neuroimmunological problems would change our present apprehension of clinical as well as preventive medicine.

LITERATURA

1. Berczi I. — *Immunoregulation by neuroendocrine factors*. Dev. Comp. Immunol. 13: 329–341, 1989.
2. Carr D.J.J., Blalock J.E. — *Cells of the immune system produce opioid peptides and express their receptors*. [W:] *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases*. Alan R. Liss, New York, 99–104, 1989.
3. Chelmicka-Schorr E., Arnason B. G. W. — *Nervous system — immune system interactions*. [W:] Waksman B.H. (red.). *Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease*. Raven Press, New York, 67–89, 1990.
4. Dantzer R., Kelley K.W. — *Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system*. Life Sci. 44: 1995–2008, 1989.
5. Evans D. L., Leserman J., Pedersen C. A., Golden R. N., Levis M. H., Folds J. A., Ozer H. — *Immune correlates of stress and depression*. Psychopharmacol. Bull. 25: 319–324, 1989.
6. Farrar W. L., Hill J. M., Harel-Bellan A., Vincour M. — *The immune logical brain*. Immunol. Rev., 100: 361–378, 1987.
7. Felten D. J., Felten S. Y., Bellinger D. L., Carlson S. L., Ackerman K. D., Madden K. S., Olschowski J. A., Livant S. — *Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function*. Immunol. Rev., 100: 225–260, 1987.
8. Goetzel E. J., Adelman D. C., Sreedharan S. P. — *Neuroimmunology*. Adv. Immunol. 48: 161–190, 1990.

9. Heijnen C. J., Kavelaars A., Ballieux R. E. — *β -endorphin: cytokine and neuropeptide*. Immunol. Rev. 119: 41–63, 1991.
10. Janković B. J. — *Neuroimmunomodulation: facts and dilemmas*. Immunol. Letters 21: 101–118, 1989.
11. Khansari D. N., Murgio A. J., Faith R. E. — *Effects of stress on the immune system*. Immunol. Today 11: 170–175, 1990.
12. Mason D. — *Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease*. Immunol. Today 12: 57–60, 1991.
13. Ovadia H., Saphier D., Weidenfeld J., Abramsky O. — *Neuroimmunomodulation: The interaction between the nervous system and the immune system*. Isr. J. Med. Sci. 25: 7–14, 1989.
14. Plaut M. — *Lymphocyte hormone receptors*. Ann. Rev. Immunol. 5: 621–669, 1987.
15. Rabin B. S., Cohen S., Ganguli R., Lysle D. T., Cunnick J. E. — *Bidirectional interactions between the central nervous system and the immune system*. CRC Crit. Rev. Immunol. 9: 279–312, 1989.
16. Rogers J., Lubner-Narod J. — *Immune action in nervous system: A brief review with special emphasis on Alzheimer's disease*. Drug Develop. Res. 15: 227–235, 1988.
17. Spector N. S. — *Neuroimmunomodulation takes off*. Immunol. Today 11: 381–383, 1990.
18. Stefano G. B. — *Role of opioid neuropeptides in immunoregulation*. Progress Neurobiol. 33: 149–159, 1989.
19. Sternberg E. M. — *Monokines, lymphokines, and the brain*. Year Immunol. 5: 205–217.
20. Weiss J. M., Sundar S. K., Becker K. J. — *Stress-induced immunosuppression and immunoenhancement: Cellular immune changes and mechanisms*. [W:] Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases. Alan R. Liss, 193–206, 1989.

SPIS TREŚCI

<i>Czesław S. Cierniewski</i> — Zagadnienia współczesnej immunologii	303
<i>Elwira Lisowska</i> — Białka jako antygeny: reakcje z przeciwciałami i analiza epitopów . . .	309
<i>Włodzimierz Ptak</i> — Mechanizmy prezentacji i rozpoznania antygeny	325
<i>Andrzej Górski</i> — Aktualne poglądy na mechanizmy warunkujące krążenie komórek immunologicznie aktywnych i ich interakcje z tkanką łączną	341
<i>Piotr Kuśnierczyk</i> — Antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej. Budowa, genetyka i funkcja biologiczna	349
<i>Jan Salwa</i> — Regulacja odpowiedzi immunologicznej przez przeciwciała antyidiotypowe .	371
<i>Maria Janusz</i> — Strukturalne i funkcjonalne zróżnicowanie immunoglobulin	383
<i>Henryka Długońska, Wiesława Rudnicka</i> — Przeciwciała monoklonalne	401
<i>Wiesława Rudnicka</i> — Budowa immunoglobulin	413
<i>Wiesława Rudnicka, Magdalena Chmiela</i> — Perspektywy użycia szczepionek idiotypowych w profilaktyce chorób zakaźnych	429
<i>Michał Zimecki</i> — Cytokiny w regulacji odpowiedzi immunologicznej	439
<i>Wiesław W. Jędrzejczak</i> — Cytokiny w regulacji zachowania się komórek układu odpornościowego	451
<i>Paweł S. Berezowicz</i> — Neuroimmunologia	463

CONTENTS

<i>Czesław S. Cierniewski</i> — Aspects of modern immunology	306
<i>Elwira Lisowska</i> — Proteins as antigens: reactions with antibodies and analysis of epitopes	321
<i>Włodzimierz Ptak</i> — The mechanisms of antigen presentation and recognition	338
<i>Andrzej Górski</i> — Current views on the mechanisms regulating the circulation of immunocompetent cells and their interactions with the connective tissue	346
<i>Piotr Kuśnierczyk</i> — Major histocompatibility complex antigens: structure, genetics and biological function	368
<i>Jan Salwa</i> — Regulation of the immune response by antiidiotypic antibodies	379
<i>Maria Janusz</i> — Structural and functional diversity of immunoglobulins	398
<i>Henryka Długońska, Wiesława Rudnicka</i> — Monoclonal antibodies	411
<i>Wiesława Rudnicka</i> — The structure of immunoglobulins	427
<i>Wiesława Rudnicka, Magdalena Chmiela</i> — The perspective of using idiotypic vaccines for infectious diseases	437
<i>Michał Zimecki</i> — Cytokines in regulation of the immune response	445
<i>Wiesław W. Jędrzejczak</i> — Cytokines in the regulation of cell behaviour in the immune system	461
<i>Paweł S. Berezowicz</i> — Neuroimmunology	477

SZANOWNI CZYTELNICY

W związku ze zmianą Wydawcy, jak i Kolportera, Redakcja KOSMOSu uprzejmie prosi o przesłanie zgłoszeń prenumeraty na rok 1993 pod niżej podanym adresem **Medycznej Agencji Wydawniczo-Informacyjnej w Warszawie**.

Ze względu na rosnące koszty wydawnicze i wysyłki pocztowej, zostaliśmy zmuszeni do podniesienia ceny pisma w pierwszym półroczu 1993 r. do 40 tysięcy złotych za jeden zeszyt, tj. 80 tysięcy za I półrocze. Czytelnicy, którzy opłacili już prenumeratę za rok 1993 w „Ruchu” lub w Oddziałach Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika, proszeni są o dokonanie uzupełniającej wpłaty na konto Agencji MAWI.

Dla ułatwienia opłaty załączamy zaadresowany blankiet pocztowy.

Wydawca KOSMOSU, jego adres i numer konta:

Medyczna Agencja Wydawniczo-Informacyjna
00-821 Warszawa, ul. Złota 60/28
PKO BP IX O/Warszawa
Nr r-ku: 1599-321004-136

REDAKCJA „KOSMOS”

Tylko prenumerata zapewnia
regularne otrzymywanie
kwartalnika

K O S M O S

Wpłaty na prenumeratę przyjmowane są na okresy kwartalne. Informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe oraz oddziały pocztowe oraz oddziały Kolportażowe w miastach.

Prenumeratę przyjmują:

- oddziały Kolportażowe właściwe dla miejsca zamieszkania lub siedziby prenumeratora; odbioru zamówionych egzemplarzy dokonuje prenumerator w wyznaczonych punktach sprzedaży lub w inny, uzgodniony sposób,
- urzędy pocztowe i listonosze — od prenumeratorów z terenów wiejskich lub innych miejscowości, w których nie ma oddziałów PUPiK, a w miastach tylko od osób niepełnosprawnych — poczta zapewnia dostawę zamówionych egzemplarzy pod wskazany adres pod warunkiem uiszczenia dodatkowej opłaty za każdy doręczony egzemplarz; wysokość opłat za każdy kwartał ustala poczta.
- Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, 00-958 Warszawa, konto PBK XIII Oddział Warszawa 370044-1195-139-11 — tylko od prenumeratorów zlecających dostawę za granicę.

Prenumerata ze zleceniem dostawy za granicę jest o 100% wyższa; w przypadku zlecenia dostawy drogą lotniczą — koszt dostawy lotniczej w pełni pokrywa prenumerator.

Terminy przyjmowania wpłat na prenumeratę:

- | | | |
|--------------------------|------------|--------------------------|
| — na kraj i za granicę — | do 20 XI | na I kw. roku następnego |
| | do 20 II | na II kw. |
| | do 20 V | na III kw. |
| | do 20 VIII | na IV kw. |

Bieżące numery można nabyć w Księgarni Wydawnictwa Naukowego PWN sp. z o.o., ul. Miodowa 10, Warszawa. Również można je nabyć, a także zamówić (przesyłka za zaliczeniem pocztowym) we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY S.A. 201061-710-13100