



Struktura przeciwciała i receptora limfocytów T – analogie i różnice

Kazimierz Madaliński, Jacek Michałkiewicz

Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

Structure of antibody and lymphocytes receptor – similarities and differences

Summary

In this paper the structure of molecules responsible for recognition of foreign antigen is given.

Key words:

immunoglobulins, antibodies, receptors, lymphocytes.

1. Wstęp

Sensem istnienia układu odpornościowego, trzeciego – obok układu nerwowego i endokrynnego – systemu integrującego nasze procesy życiowe, jest obrona przed niosącymi zagrożenie drobnoustrojami obcymi (patogenami). To pojęcie obrony, obejmujące przede wszystkim odporność przeciwwzakaźną, uległo w ostatnich latach rozszerzeniu o obronę przed powstającymi ciągle w organizmie klonami nowotworowymi (1). Zdolność swobodnego rozpoznania antygenów posiadają: przeciwciała krążące, przeciwciała związane na powierzchni limfocyta B, oraz receptory limfocytów T.

Adres do korespondencji

Kazimierz Madaliński,
Zakład Immunologii
Klinicznej, Instytut
„Pomnika Centrum
Zdrowia Dziecka”,
Al. Dzieci Polskich 20,
04-730 Warszawa;
e-mail:
Kmadalinski@wp.pl

2. Budowa przeciwciał (immunoglobulin)

Przeciwciała – to białka zawierające węglowodany – glikoproteiny o unikatowej strukturze. Składają się one z 2 łańcuchów ciężkich (H), które zawierają swoistość danej klasy oraz z dwóch łańcuchów lekkich (L). Te ostatnie występują w dwóch typach antygenowych: kappa i lambda (κ i λ), od nazwisk odkrywców: Korngold i Lipari. Terminy: przeciwciało i immunoglobulina (*immunoglobulin*) używane są zamiennie. Białka te występują w surowicy i płynach ustrojowych w 5 klasach antygenowych: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE, a odpowiednie łańcuchy ciężkie, różniące się masą cząsteczkową, występują w 5 odmianach: γ , α , μ , δ , ϵ . Łańcuchy ciężkie i lekkie kodowane są przez 2 różne geny, tak zatem cząsteczka immunoglobuliny jest pod tym względem unikatowa. Odcinki stykania się łańcuchów ciężkich i lekkich związanych mostkiem dwusiarczkowym tworzą „strefę wiążącą antygen”, czyli fragment Fab. Pozostałe części łańcuchów ciężkich, które są dłuższe niż łańcuchy lekkie, również połączone mostkami dwusiarczkowymi tworzą fragment Fc („krystalizujący”), który uruchamia kaskadę dopełniacza i wiąże się z receptorem Fc na licznych komórkach. W obrębie łańcuchów ciężkich i lekkich wyróżniono domeny, licząc je od strefy wiązania antygeny. Łańcuch lekki składa się z dwu domen: V_L (część zmienna) i C_L (część stała, determinując swoistość antygenową łańcucha). Łańcuch ciężki natomiast składa się z 4 domen: 1 zmiennej (V_H) i trzech stałych C_{H1} , C_{H2} i C_{H3} . Części stałe determinują swoistość łańcucha ciężkiego jego klasy i podklasy.

Najważniejsze cechy 5 klas immunoglobulin:

– Immunoglobulina IgG o masie cząsteczek 155 kD występuje w 4 podklasach antygenowych, IgG 1, 2, 3, 4 i stanowi większość immunoglobulin we krwi obwodowej (przynajmniej 75%). Jej stężenie mierzone jest w mg/mL.

– Immunoglobulina A zawiera 2 podklasy IgA1 i IgA2; w krążeniu występuje jako monomer – podobnie jak IgG, natomiast w szeregu płynach ustrojowych występuje w formie dimeru. Jako przykład takich płynów można podać wydzielinę oskrzelikowo-pęcherzykową, ślinę i płyn dwunastnicy, wydzielinę pochwy i układu moczowo-płciowego. Wydzielnicza IgA składa się z 2 monomerów połączonych łańcuchem 'J' (*joining piece*) oraz fragmentem wydzielniczym, syntetyzowanym przez komórki nabłonkowe.

– Immunoglobulina M jest pentamerem – białkiem o najwyższej masie cząsteczek spośród immunoglobulin: 950 kD. Składa się ona z 5 monomerycznych jednostek połączonych łańcuchami 'J'. Przeciwciało to pojawiło się jako pierwsze w rozwoju filogenetycznym zwierząt bezkręgowych i kręgowców; jest także pierwszą immunoglobuliną jaką syntetyzuje noworodek w odpowiedzi na bodźce zakaźne. Po uodpornieniu antygenami, np. krwinki czerwonej, zwierząt doświadczalnych, obecność tej klasy przeciwciał można wykazać w ciągu 3-4 dni. Potem następuje „przełączenie klas” IgM → IgG, zależne od cząsteczki CD40 na powierzchni limfocyta.

– Immunoglobulina D (m.c. 180 kD) występuje w krążeniu w bardzo niewielkich ilościach. Jest przede wszystkim Ig błonową występującą w przebiegu rozwoju osobniczego limfocytów B.

– Immunoglobulina E (m.cz. 180 kD) występuje we krwi w najmniejszych ilościach (stężenie mierzone jest w ng/ml, lub jedn. międzynarodowych), lecz posiada największą efektywność biologiczną. Skupia aktywność przeciwciał reaginowych (alergia), lecz także bierze udział w eliminacji patogenów pasożytniczych (6).

Różne enzymy i związki chemiczne zastosowano do „cięcia” cząsteczki immunoglobuliny, a przez to poznanie jej struktury – najpierw klasy IgG. Należy tu wymienić przede wszystkim papainę, która tnie łańcuch ciężki na odcinku C_{H1} za aminokwasem $C_L 224$, a przed mostkiem dwusiarczkowym łączącym dwa łańcuchy ciężkie. W ten sposób pozostawione po dwa odcinki łańcucha lekkiego i ciężkiego, prawie równej wielkości, tworzą fragment Fab (*fragment antibody binding*), a pozostałe fragment Fc (krystalizujący).

Drugim enzymem użytym wczesnych studiach nad immunoglobulinami, była pepsyna. Enzym ten wykonuje pierwsze cięcie łańcucha ciężkiego na odcinku CH_2 , tuż za aa. 234, a następnie jeszcze trzy cięcia między aa. 234 a 333. Z pierwszego cięcia powstaje fragment $F(ab')_2$, który zawiera dwa łańcuchy lekkie i po dwa fragmenty łańcuchów ciężkich. Z następnych cięć powstają polipeptydy i fragment pFc' odpowiadający ostatniej domenie łańcucha ciężkiego, CH_3 ($C_{\gamma 3}$).

Odrębnym sposobem rozbicia cząsteczki IgG na podjednostki, jest zastosowanie merkaptotetanolu, czynnika redukującego mostki dwusiarczkowe. Bezpośrednio potem stosuje się alkilację, która zapobiega ponownej asocjacji podjednostek. Otrzymuje się w ten sposób cztery łańcuchy polipeptydowe – dwa ciężkie składające się z 450 aa. o m.cz. 150 000 daltonów i dwa łańcuchy lekkie złożone z 212 aa., o m.cz. ~25 000 daltonów. Łańcuchy ciężkie i lekkie można rozdzielić w środowiskach dysocjujących, np. 5 M mocznika i 0,5 M merkaptotetanolu.

Struktura. W obrębie regionów zmiennych V_L , V_H łańcuchów lekkich i ciężkich występują krótkie polipeptydowe segmenty o nadzwyczajnej zmienności budowy. Nazywamy je regionami nadzmiennymi – są zlokalizowane w pobliżu pozycji aminokwasów 30, 50 i 95. Te właśnie różnice sekwencji w regionach nadzmiennych immunoglobulin są przyczyną zjawiska, że ich cząsteczki mogą wiązać wiele różnych antygenów (7). Miejsca w pobliżu pozycji aminokwasów 30, 50 i 95 są *de facto* regionami determinującymi komplementarność wiązania antygeny z przeciwciałem (CDR – *complementarity determining regions*). W łańcuchach lekkich jak i ciężkich występują trzy regiony CDR: CDR 1 (~30 aa.), CDR 2 (~50 aa.) i CDR 3 (~95 aa.). Z kolei między tymi regionami i poza nimi znajdują się 4 segmenty peptydowe: FR1 – FR4, które nazwano fragmentami zrębowymi (FR – *frame regions*).

Podstawienia aminokwasów w regionach zmiennych H lub L oznaczono przez porównanie sekwencji wielu pojedynczych łańcuchów w każdej pozycji. Z kolei obliczono stosunek liczby różnych aminokwasów znalezionych w danej pozycji do częstotliwości występowania najbardziej powszechnych aminokwasów (4). Badając niektóre sekwencje, znaleziono dodatkowe aminokwasy – w pozycji i poza pozycją 95. Ponadto, pofałdowanie regionów zmiennych łańcuchów H i L powoduje, że

regiony nadzmiennie plasują się blisko siebie, tworząc strukturę powierzchniową, wiążącą antygen.

Porównanie odpowiedzi „humoralnej” i „komórkowej” wskazuje na to, że polegają one na rozpoznaniu obcych patogenów i szkodliwych antygenów własnych, jak antygeny krwinek, komórki nowotworowe – przez (hetero) dimerowe glikoproteiny (5). Rozpoznanie antygeny przez te glikoproteiny odbywa się z udziałem przeciwciała w przypadku „odpowiedzi humoralnej”, a receptora typu $\alpha\beta$ lub $\gamma\delta$ limfocyta T (TCR) w przypadku „odporności komórkowej”. Inicjuje to serię kaskadową, której wynikiem jest zniszczenie i usunięcie zakażającego makroorganizmu, antygeny lub zakażonej komórki (3).

3. Budowa receptora TCR

Większość receptorów limfocytów T jest zbudowana z dwóch łańcuchów polipeptydowych α i β , o masie 40-50 kDa, z których każdy zawiera rejon zmienny (V) i stały (C). Łańcuchy te połączone są mostkami dwusiarczkowymi oraz wiązaniami niekowalencyjnymi. Receptory TCR są obok immunoglobulin jedynymi cząsteczkami zdolnymi do wiązania antygenów. Funkcja ta determinuje strukturę zarówno TCR, jak i immunoglobulin. Ze względu na strukturalne podobieństwo do immunoglobulin receptory TCR należą do tzw. nadrodziny immunoglobulin. Jest to grupa białek bardzo licznie reprezentowana. Około 40% błonowych receptorów leukocytarnych stanowią polipeptydy, zawierające domeny o budowie podobnej do immunoglobulin, obejmujące zarówno części zmienne (Ig V), jak i stałe (Ig C) ciężkich (H) i lekkich (L) łańcuchów immunoglobulin. W przeprowadzonych badaniach krystalograficznych wykazano istnienie tych domen w strukturze bardzo wielu receptorów błonowych leukocytów. Należą do nich m.in. (oprócz TCR): kompleks CD3, beta-2 mikroglobulina, antygeny HLA klasy I, antygeny HLA klasy II, receptor CD4 (domena 1 i 2), receptor CD8, receptor CD2 (domena 1), adhezyny (ICAM-1, 2, 3), receptory dla fragmentu Fc IgG i wiele innych.

Białka te stanowią integralną część błony komórkowej. Zawierają one odcinek pozakomórkowy, krótki fragment przezbłonowy i odcinek cytoplazmatyczny, zazwyczaj zawierający sekwencję sygnałową. Wszystkie te białka biorą udział w złożonym procesie aktywacji komórki, ponieważ uczestniczą w przekazywaniu sygnałów biochemicznych, poprzez uruchomienie systemu różnorodnych kinaz komórkowych. Kooperacja wielu receptorów błonowych warunkuje optymalną aktywację komórek. W przypadku limfocyta T receptor TCR wprawdzie rozpoznaje i wiąże antygen, ale wiele innych receptorów optymalizuje ten proces, działając jako tzw. cząsteczki kostymulacyjne. Funkcje te pełni wiele białek błonowych limfocyta, takich jak receptory CD4, CD8, CD2, ICAM-1, CD2 i CTLA-4.

Zasadniczą cechą aktywacji limfocyta T poprzez receptor TCR jest pewna unikatowa właściwość tego receptora, a mianowicie rozpoznawanie antygeny związane-

go z błoną komórkową innych komórek, tzw. komórek prezentujących antygen. Cecha ta zdecydowanie różni TCR od immunoglobulin, które mogą wiązać wolne antygeny. Receptory TCR wiążą immunogenne peptydy powstałe z białek pociętych na małe fragmenty przez enzymy hydrolityczne komórek prezentujących. Fragmenty te połączone są z cząsteczkami głównego kompleksu zgodności tkankowej (HLA) klasy I lub II, komórek prezentujących. Peptydy związane z HLA klasy I rozpoznawane są *via* TCR przez cytotoksyczne limfocyty T, które poprzez koreceptor CD8 wchodzi w interakcję z cząsteczkami HLA klasy I. Przeciwnie, peptydy związane z HLA, klasy II rozpoznawane są *via* TCR przez odrębną populację limfocytów T, tj. komórki pomocnicze, które dzięki koreceptorowi CD4 wchodzi w interakcję z HLA klasy II. Zjawisko to nosi nazwę restrykcji związanej z antygenami zgodności tkankowej. Oznacza to, że antygeny związane z HLA klasy I lub II rozpoznawane są odpowiednio przez cytotoksyczne i pomocnicze limfocyty T; musi istnieć także zgodność genetyczna pomiędzy komórkami prezentującymi antygen a limfocytami T. Monocyty, makrofagi, komórki Langerhansa skóry, komórki dendrytyczne i limfocyty B wykazują ekspresję HLA klasy II i mogą prezentować antygen limfocytom T pomocniczym o fenotypie TCR/CD4+. Przeciwnie, praktycznie większość komórek ustroju, z wyjątkiem krwinek czerwonych, wykazuje ekspresję HLA klasy I i może prezentować antygen limfocytom T cytotoksycznym o fenotypie TCR/CD8+.

Ukierunkowanie prezentacji antygeny na określone typy limfocyta poprzez mechanizm restrykcji związanej z HLA ma główne znaczenie w procesie dojrzewania limfocytów T i ich selekcji w grasicy. Ogromna większość (powyżej 90%) nowo powstałych w grasicy komórek T (tymocytów) ginie w procesie negatywnej selekcji. Przeżywają jedynie takie limfocyty T, które nie rozpoznają własnych antygenów jako obcych (tolerują je), a wykazują zdolność do rozpoznawania praktycznie nieograniczonej liczby swoistości antygenów obcych. Jest to wynik selekcji pozytywnej, zachodzącej w grasicy. Zjawisko to leży u podstaw tzw. restrykcji klonalnej. Warunkiem tej restrykcji jest genetycznie uwarunkowany mechanizm rozpoznania przez limfocyt T tylko określonej swoistości obcego antygeny. Jest to możliwe dzięki olbrzymiej różnorodności części zmiennej receptora TCR (tzw. repertuar TCR), co powoduje że limfocyty T praktycznie zdolne są do rozpoznania nieograniczonej liczby „obcych” swoistości.

Rozpoznanie antygeny powoduje aktywację komórek rozpoznających, ich proliferację i ekspansję tzw. klonów komórek T (tj. populacji wywodzących się od pojedynczych komórek, pierwotnie rozpoznających antygen). W aktywacji limfocyta T *via* receptor TCR bierze udział inna struktura, a mianowicie wspomniany już kompleks CD3, składający się z 5 łańcuchów polipeptydowych, który przekazuje sygnał indukowany poprzez kontakt antygeny z receptorem TCR. Receptor TCR i kompleks CD3 są związane ze sobą, tworząc strukturę TCR/CD3.

TCR zbudowany jest, jak już wspomniano, z dwóch łańcuchów polipeptydowych. Podobnie, jak w przypadku immunoglobulin każdy z nich ma część stałą (C) i część zmienną (V). Są one związane z komórką przez krótki odcinek śródbłonowy i krótki

odcinek wewnątrzkomórkowy. Gdyby nie to zakończenie w błonie komórkowej i cytoplazmie, przypominałyby budową łańcuchy lekkie immunoglobulin. Istnieją dwa główne rodzaje cząsteczek TCR: receptory składające się z łańcuchów α , β oraz receptory składające się z łańcuchów γ , δ .

Ogromna większość limfocytów krwi obwodowej (ponad 90%) posiada ekspresję receptorów TCR $\alpha\beta$, a tylko poniżej 10% wykazuje ekspresję TCR $\gamma\delta$. Komórki te różnią się fenotypowo i czynnościowo. Ponad 60% limfocytów T z ekspresją TCR $\alpha\beta$ wykazuje ekspresję receptora CD4 (populacja komórek pomocniczych), natomiast ponad 30% tych komórek posiada receptor CD8 (populacja limfocytów cytotoksycznych/supresyjnych). Populacje te reprezentują nie nakładające się na siebie, wysoce zróżnicowane pule limfocytów o różnych, dobrze poznanych funkcjach i bardzo zróżnicowanym repertuarze swoistości, zależnym od struktury części zmiennej receptora TCR. Natomiast, populacja limfocytów z ekspresją TCR $\gamma\delta$ nie wykazuje ekspresji receptora CD4, część z tych komórek posiada receptory CD8. Większość komórek T z TCR $\gamma\delta$ wykazuje aktywność cytotoksyczną. Zasiedlają one głównie nabłonek wyściełający przewód pokarmowy.

Części zmienne łańcuchów TCR, podobnie jak części zmienne łańcuchów immunoglobulin zawierają trzy regiony hiperzmiennie, tj. CDR1, CDR2 i CDR3, determinujące dopasowanie cząsteczki w kontakcie z antygenem. Struktury te, podobnie jak w przypadku przeciwciał, określają swoistość rozpoznania antygeny. Aktywacja limfocyta T *via* receptor TCR wymaga udziału wielu innych, wymienionych receptorów, tzw. cząsteczek kostymulacyjnych, które optymalizują proces aktywacji limfocytów T przez antygen.

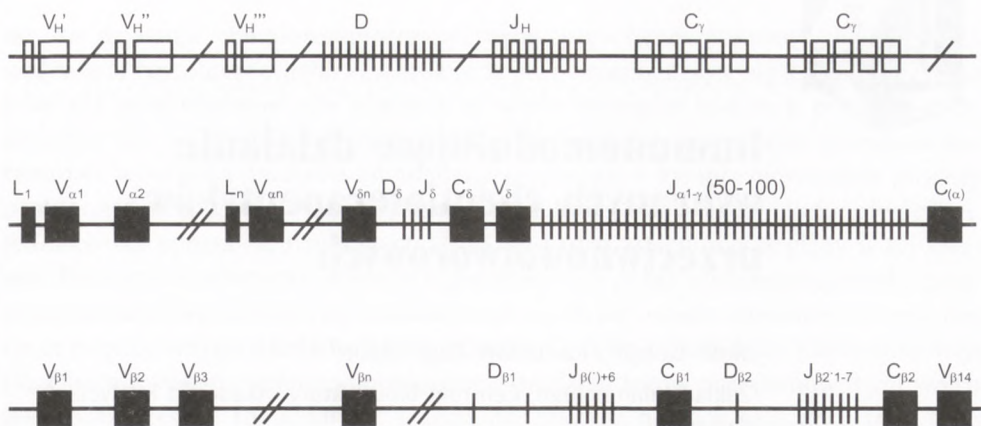
4. Podsumowanie

1) Podobieństwo budowy przeciwciał oraz receptora limfocyta T polega na tym, że domeny receptora limfocyta T składają się ze struktur podobnych do immunoglobuliny, o długości ok. 110 aminokwasów, ze środkowym wewnętrznym mostkiem dwusiarczkowym między łańcuchami polipeptydowymi. Zasadniczą organizację łańcuchów polipeptydowych immunoglobuliny i receptorów TCR przedstawiono na rysunku 1.

Istnieją jednak zasadnicze różnice:

2) Dimery alfa-beta oraz gamma-delta są cząsteczkami integralnie związanymi z błoną komórkową limfocyta T, tworząc kompleks TCR-CD3. Odcinek receptora związany z błoną komórkową nazywamy odcinkiem przezbłonowym; natomiast odcinek obecny w cytoplazmie nazwano śródplazmatycznym. Natomiast, immunoglobuliny są wolnymi cząsteczkami obecnymi w surowicy lub płynach ustrojowych.

3) Receptory limfocyta T rozpoznają antygen, który związany jest z komórkami prezentującymi antygen. Natomiast immunoglobuliny mogą rozpoznawać wolne antygeny.



V_H – regiony zmienne łańcucha ciężkiego,
 $V_{\alpha 1}$, $V_{\alpha 2}$ – regiony zmienne łańcucha alfa TCR,
 D – regiony różnorodności,
 J – segmenty łączące genu,
 C_γ – eksony regionu odpowiednich łańcuchów ciężkich,
 C_α – regiony stałe łańcucha alfa TCR,
 C_β – regiony stałe łańcucha beta TCR.

Rys. 1. Schemat genów immunoglobulin i łańcuchów receptora T (wg 2, zmodyfikowany).

Od góry przedstawiono: 1) łańcuch ciężki immunoglobuliny gamma; 2) łańcuch alfa receptora T;

3) łańcuch beta receptora T.

Literatura

1. Feleszko W., Gołąb J., Jakóbiński M., Lasek W., Stokłosa T., Zagożdżon R., (1999), *Odkrycia medycyny. Fascynująca immunologia*, Wyd. BART, Warszawa, 5-8.
2. Rassenti L. Z., Kipps T. J., (1997), *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Eds. N. R. Rose, E. C. de Macario, J. D. Folds, H. C. Lane, R. M. Nakamura, Amer. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC, 147-155.
3. Garcia K. C., Degano M., Speir J. A., Wilson I. A., (1999), *Rev. Immunogen.*, 1, 75-90.
4. Kabat E. A., (1992), *Encyclopedia of Immunology*, Eds. Roitt I. M., Delves P. J., Academic Press, London, 91-93.
5. Janeway C. A., Travers P., (1996), *Immunobiology*, 2nd ed. Current Biology, London.
6. Madalinski K., (1995), *Central Eur. J. Immunol./Polish J. Immunol.*, 20, 17-29.
7. Owen M., (2000), *Immunologia*, red. Roitt I., Brostoff J., Male D., PZWL – Wyd. Medyczne Slotwiński, 83-92.