

SZÉNHIDRÁT-SPECIFIKUS IMMUNITÁS

Buzás Edit

az orvostudomány kandidátusa

Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete

buzedi@dgci.sote.hu

Számos példát ismerünk a tudomány történetéből arra, hogy egy-egy kiemelkedő jelentőségű felfedezés miként határozza meg évek-re-évtizedekre a kutatás irányát. Arra is van sok példa, hogy korai, alapvető felismerések hogyan merülhetnek a feledés homályába hosszú időre, ha a tudományos közvélemény figyelme éppen másfelé irányul egy adott időszakban.

A szénhidrátokkal szembeni immunitás vizsgálata a fehérje antigénekkal kapcsolatos vizsgálatok sikere miatt szorult háttérbe az elmúlt évtizedekben. A modern immunológia születése a XX. század második felére tehető, mely során tisztázódott az immunrendszer sejtjeinek, a limfocitáknak a szerepe, az immunrendszer működésének elve, a klónszelekció alapuló immunitás. Ismertté vált, hogy szemben az eredeti konformációban antigéneket felismerni képes B limfocitákkal, a T-sejtek a komplex fehérje antigének úgynevezett antigénbemutató sejteken belül történő, peptidekké való lebontása után képesek csak antigénfelismerésre. Nyilvánvalóvá vált, hogy ennek a peptidfelismerésnek alapvető sajátossága az MHC restrikció, azaz csak saját MHC-molekulákkal való együttes antigénbemutató vezet a T-sejtek aktivációjához. A hibridóma technika kifejlesztése révén lehetőség nyílt arra, hogy monoklonális antitesteket hozzunk létre, melyek egyedi specititása elvezetett az immunrendszeri sejtek működésének molekuláris jellemzéséhez. Megismerhettük a sejtek aktiválásának feltételeként az antigénfel-

ismerő receptor ligandkötése mellett az úgynevezett ko-stimulációs szignálok jelentőségét, számos ismeret birtokába jutottunk az immunrendszeri sejtek aktivációjához vagy éppen funkciójuk gátlásához vezető jelátviteli utakat illetően. Fény derült a T-sejt alpopulációk egyensúlyának jelentőségére (Th1/Th2), a dendritikus sejtek megkülönböztetett szerepére az immunválasz kimenetelének meghatározásában. Legutóbb többek között a regulátoros T-sejtek felfedezése és a patogénekre jellemző molekuláris mintázat (PAMP) felismerő fehérjek közé tartozó, eredetileg ecetmuslicában leírt, az embrió dorsoventrális tengelyének kialakításában szerepet játszó Toll fehérjéhez szerkezetileg hasonló receptorcsalád (Toll-like receptor – TLR) tagjainak a természetes immunitás sejtjein való kifejeződése, és azok szerepe került az immunológia fókuszába. Eközben az esetek túlnyomó többségében az antigénspecifikus immunválasz vizsgálata a fehérje antigénekkal szembeni immunitás vizsgálatára szorítkozott.

Az immunológia tankönyvek is szűkszavúan emlékeznek meg a többnyire T-sejt independens antigénként vagy hapténként emlegetett szénhidrát struktúrákról, melyekkel szemben elsősorban IgM típusú antitestek termelődnek szervezetünkben.

Pedig Karl Landsteiner AB0 vércsoportrendszerrel szembeni alapvető megfigyelései közel százévesek. Az 1930-ban Nobel-díjban részesült tudós a szénhidrát-immunológia alapjait fektette le a vörösvértestek felszínén

jelen lévő antigénrendszer leírásával. Az A vércsoport-hoz tartozó személyek vörsvértest felszíni antigénjeit mindössze egyetlen N-acetil galaktózamin különbözteti meg a B vércsoportú egyénekétől, akik antigénjében ugyanazon oligoszaccharida-lánc-hoz terminálisan az N-acetil galaktózamin helyett galaktóz kapcsolódik, míg a 0-s vércsoport esetében a fent említett terminális monoszaccharidák egyike sincs jelen.

Közismert, hogy az A vércsoportú személyek B vércsoport-antigénnel szembeni keringő antitestekkel rendelkeznek, míg azokban, akik a B vércsoport-hoz tartoznak, anti-A keringő antitestek vannak jelen (a jelenség háttérben feltehetőleg mikrobiális, például bélbaktérium eredetű szénhidrát antigénnel való szenzibilizáció áll). A 0-s vércsoportú személyekben mind anti-A, mind anti-B antitestek jelen vannak, míg az AB vércsoportú személyek nem rendelkeznek keringő antitesttel az A vagy B antigének ellen.

A fentiek alapján három alapvető következtetést is levonhatunk:

1. Létezik szénhidrát-specifikus immunitás emberben;
2. Szénhidrát-specifikus immuntolerancia is kell hogy létezzék, hiszen adott vércsoport-hoz tartozó személyek esetében nem mutathatók ki a saját vércsoport antigénnel szembeni, keringő antitestek;
3. Ennek a szénhidrát antigénnel szemben kialakuló antitestválasznak genetikai meghatározottsága kell hogy legyen, hiszen az AB0 vércsoportrendszer közismert módon öröklődik.

Napjainkra már ismert az AB0 lókuszt (9q34.1-34.2), ahol glikozil transzferáz enzim gén található. Az is ismertté vált, hogy a 0 allél lényegében megegyezik az A alléllal, a különbség mindössze egyetlen bázis deléciója (258-G), amely révén eltolódik a genetikai kód leolvasási kerete (frame shift), így erről a kódról nem keletkezik funkcióképes glikozil transzferáz enzim.

A B allél esetében is csak néhány bázis különbség figyelhető meg, és a fehérje termék is mindössze négy aminosavban tér el az A allél által kódolt enzimfehérjétől.

Eddig 88 allélvariánszt írtak le 52 polimorf helyen az AB0 kódoló régió körül.

Fenti példából kiderül, hogy a korai, szénhidrát-specifikus immunreaktivitásra vonatkozó megfigyelések értelmezéséhez a modern genomika nyújthat értékes segítséget.

Az a meglepő felismerés, hogy a humán genom génjeinek száma mindössze 20-30 ezer közötti, egyértelműen felhívta a figyelmet a poszt-transzlációs módosulások jelentőségére.

Miközben az elmúlt évtizedekben az immunológiában a figyelem a fehérje antigének immunfelismerésére összpontosult, addig a szénhidrát antigének szerkezeti sokfélesége messze felülmúlja a fehérjéket.

Ha a hat elemből felépülő szerkezeteket tekintjük, a különbség magáért beszél (Laine, 1997):

Hexamer struktúrák

Hexanukleotidok	4096	variáns
Hexapeptidek	$6,4 \times 10^6$	variáns
Hexaszaccharidok	$1,44 \times 10^{15}$	variáns

Figyelembe véve, hogy az immunrendszer számára a B-sejt receptorok esetében hozzávetőlegesen 10^{13} féle, a T-sejt receptorok esetében 10^{18} féle receptorspecifitás áll rendelkezésre, felvetődik a kérdés, hogyan birkózik meg immunrendszerünk a szénhidrátstruktúrák hatalmas diverzitásával. Elképzelhetetlennek tűnik, hogy az immunrendszer minden egyes szénhidrátstruktúra specifikus felismerésére külön antigénreceptor-fehérjét hozzon létre.

Feltételezhetjük tehát, hogy léteznek az immunrendszer esetében olyan, a rendkívül sokféle szénhidrátszerkezetet kevesebb közös nevezőre hozó, „receptorgén-takaré-

kos” stratégiák, melyek segítségével az immunrendszer elemei képesek a saját-idegen, ártalmas-ártalmatlan szénhidrát antigének megkülönböztetésére.

Mint korábban említettük, polimer szénhidrátstruktúrák TI-2 (thymus independent 2) típusú antigénként a B-sejt receptor többszörös kereszt kötése révén aktiválnak B-sejteket. Számos TI-2 antigén esetében a CD5⁺ B1 B-sejtek szerepét írták le. A B1 B-sejtek polireaktív, kevésbé specifikus IgM antitesteket termelnek. A polireaktív szénhidrát-specifikus IgM antitestek önmagukban is egyfajta „egyszerűsítő” stratégiát képviselhetnek a szénhidrát antigénnel szembeni immunválasz során.

A közelmúlt vizsgálatai még közelebb vihetnek bennünket a szénhidrát antigénnel szembeni „gazdaságos” immunfelismerés megértéséhez.

1. A konvergens epitóp (antigén determináns) felismerés stratégiája

A közelmúltban leírt megfigyelés szerint két, egymástól függetlenül létrehozott, Lewis Y tetrasacchariddal (Fuc (α 1 \rightarrow 2) Gal(β 1 \rightarrow 4) [Fuc(α 1 \rightarrow 3)] GlcNac) reagáló monoklonális antitest szinte tökéletesen megegyező stratégiát (lényegében azonos antigénkötést kialakító aminosavakat) alkalmazott, mely jelentős hasonlóságot mutatott egyszersmind egy lektin (*a Lectin IV of Griffonia simplicifolia*) ugyanazon tetrasaccharidot kötő szerkezetével (Ramsland et al., 2004).

A fenti jelenséget, a különböző immunrendszeri receptorok konvergens, konzervált szénhidrát antigén-kötő stratégiáját számos különböző munkacsoport eredményei megerősítik.

2. Az indukált illeszkedés (induced fit) stratégiája

Bakteriális lipopoliszaccharid (LPS) ellen hoztak létre olyan szénhidrát-specifikus monoklonális ellenanyagot, mely egyaránt reagál a terminális monoszaccharid egy-

ségben megegyező tri-, di- és monoszaccharida epitópokkal (Nguyen et al, 2003). A fenti monoklonális ellenanyag szabad és ligandkötött formáinak kristályszerkezeti vizsgálata szerint a szabad és bármely szénhidrát ligandot kötő forma térszerkezete között lényeges különbség mutatkozott: az immunglobulin nehézlánc 3-as antigén-kötő hurok részletének (CDR H3) konformációja bármely ligandkötött formában azonos volt, de jelentősen eltért a szabad formától.

Feltehetőleg a fenti mechanizmus, tehát a konzervált terminális monoszaccharidát kötő zseb mellett meglévő jelentős flexibilitás lehetővé teszi, hogy szénhidrátkötő antitestek több, különböző hosszúságú szénhidrátstruktúrával kapcsolódni tudjanak.

3. Az antitest domén-kicserelődés stratégiája (Calarese et al., 2003)

Az AIDS okozója, a HIV vírus gp120 glikoproteinje ellen létrehozott, Man9GlcNac2 epitópot felismerő monoklonális antitest esetében figyeltek fel a jelenségre. Már a negatívan festett elektronmikroszkópos felvételeken feltűnt, hogy a fenti antitest esetében a jellegzetes Y alakú antitestmolekula képe módosul: az Y két felső karja szokatlanul közel helyezkedik el egymáshoz, szinte párhuzamosak mind a szabad, mind a ligandkötött forma esetében. A kristályszerkezeti vizsgálatok hasonlóképpen azt igazolták, hogy a két nehézlánc variábilis régiói (V_H) egymással mintegy összefekve egy új közös antigén-kötő domént hoznak létre a két, hagyományos nehéz és könnyű láncok által alkotott $V_H - V_L$ domén mellett: a $V_H - V_H$ domént. E stratégia révén lehetővé válik, hogy egy adott antitest egymáshoz közel elhelyezkedő epitópok clusterével létesítsen kapcsolatot.

Glikolipid antigének T-sejtek általi felismerése

A glikolipid antigéneket az immunrendszer nem az igen polimorf MHC/HLA molekulák-

kal mutatja be, hanem a nem polimorf CD1 molekulák révén.

A CD1b-restrikcióval glikolipid antigént felismerő T-sejtek számára a megfigyelések szerint viszonylag közömbösnek bizonyulnak a lipid farkak változásai. A CD1 molekula hidrofób gödre meglehetősen aspecifikus módon köti az acil csoportokat, így a hidrofíl szénhidrátészletek szabadon hozzáférhetőek a specifikus T-sejt receptorok számára (Moody et al., 1997).

A CD1d restrikcióval glikolipideket felismerő NKT-sejtek a közelmúltban az immunológia fókuszába került, immunregulációban részt vevő sejtek, melyek igen korlátozott T-sejt receptorrepertoárral rendelkeznek. Ez a korlátozott receptor repertoár szintén példázza az igen sokféle szénhidrát struktúra leegyszerűsített, konvergens és gazdaságos immunfelismerését.

MHC-I restrikciójú glikopeptid bemutatás T-sejtek számára

Érdekes helyzetet írtak le a közelmúltban egy MUC1 glikopeptid MHC-I molekulához kötött formája esetén (Apostolopoulos et al., 2003). Kiderült, hogy a glikopeptid N acetil galaktózamin része a mélybe, a peptidkötő gödör feneké felé tekintve MHC-horgonyként funkcionál, jelentősen megnövelve a peptid MHC-hez való kötődésének erősségét. Így nemcsak, hogy külön glikopeptid-specifikus receptorszerkezetre nincs szükség, hanem a glikoziláció ilyen formában segítheti a lehorgonyzott peptid epitóp T-sejtek általi felismerését.

Ismerünk azonban példát arra is, hogy miközben a peptid hagyományos módon rögzül az MHC-I molekula peptidkötő gödrében, a hozzá kapcsolódó szénhidrát struktúrák előemelkednek a gödör szintjéből, és a T-sejt receptor felé tekintenek. A glikoziláció helye kulcsfontosságúnak tűnik a peptiden belül. A centrális aminosavakhoz kapcsolódó mono- vagy diszacharid szerkezetek

esetén, mind az α/β , mind a γ/δ T-sejtek receptora képes specifikus kapcsolatot létesíteni a glikopeptiddel és a peptidkötő gödröt határoló két a hélix egyes részeivel. Azonban úgy tűnik, a gödör és a határoló a hélixek szintjéből való jelentősebb előemelkedés (például a peptidhez kapcsolódó triszacharid esetén, már nem kedvez az α/β T-sejtek általi felismerésnek, ilyen glikopeptideket a γ/δ T-sejtek receptora képes felismerni (Speir et al., 1999).

MHC-II restrikciójú glikopeptid bemutatás T-sejteknek

Egyes bakteriális polisaccharidák ikerionos karakterűek (zwitterionic polysaccharide – ZPS), az ismétlődő diszacharida egységek alternálva hordoznak COO^- és NH_3^+ csoportokat. Ilyen ikerionos polisaccharidák esetében leírták a szénhidrát antigének antigén-bemutató sejteken belüli, MHC-II molekula segítségével történő bemutatását α/β T-sejtek számára. Az extracelluláris eredetű ZPS antigének enjten belüli lebontásáért nem lizoszomális sejtek felelősek, hanem az *oxidative burst* során a NOS enzim hatására keletkező nitrogénmonoxid (Cobb et al., 2004).

Napiainkra számos technikai problémát sikerült megoldani az oligoszacharid-szintézist és szekvenálást illetően, hozzáférhetőkké váltak az első *microarray* alapú szénhidrát *chipek*, melyek felhasználásával egyidejűleg igen nagyszámú szénhidrát vizsgálható.

A vércsoport antigénekkal kapcsolatban említett példa is mutatja, hogy a genomika eszköztára segítségével feltárhatjuk a glikoziláció genetikailag meghatározott hátterét. A glikozil transzferáz és glikozidáz enzimek polimorfizmusainak, a glikozilációs helyeket érintő genetikai változatoknak, a szénhidrát epitópokat utánozni képes peptidek genetikai meghatározottságának a vizsgálata közelebb vihet bennünket a betegségekkel asszociált glikozilációs változások megértéséhez. A bioinformatika és a proteomika lehetőségeit

egyesítve a kibontakozó új tudomány, a *glikomika* gazdagodó eszköztárával lehetőség nyíllhat a szénhidrát-fehérje kapcsolódás teljesebb megértésére, a szénhidrát-specifikus immunrepertoár teljes feltérképezésére. Mindezen eredmények birtokában a fer-

tőző, autoimmun és malignus megbetegedésekkel szembeni vakcinák tervezése új korszakba léphet.

Kulcsszavak: *szénhidrát, immunitás, anti-gén receptorok, glikoprotein, glikomika*

IRODALOM

- Apostolopoulos, Vasso – Yuriev, E. – Ramsland, P. A. – Halton, J. – Osinski, C. – Li, W. – Plebanski, M. – Paulsen, H. – McKenzie, I. F. (2003): A Glycopeptide in Complex with MHC Class I Uses the GalNAc Residue as an Anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100, 15029–15034.
- Calarese, Daniel A. – Scanlan, C. N. – Zwick, M. B. – Deechongkit, S. – Mimura, Y. – Kunert, R. – Zhu, P. – Womald, M. R. – Stanfield, R. L. – Roux, K. H. – Kelly, J. W. – Rudd, P. M. – Dwek, R. A. – Katinger, H. – Burton, D. R. – Wilson, I. A. (2003): Antibody Domain Exchange is an Immunological Solution to Carbohydrate Cluster Recognition. *Science*. 300, 2065–2071.
- Cobb, Brian A. – Wang, Q. – Tzianabos, A. O. – Kasper, D. L. (2004): Polysaccharide Processing and Presentation by the MHCII Pathway. *Cell*. 117, 677–687.
- Laine, Roger A. (1997): The Information-storing Potential of the Sugar Code. In: Gabius, Hans-Joachim – Gabius, Sigrun (eds.): *Glycosciences: Status and Perspectives*. Chapman & Hall, London, Weinheim, 1–14.
- Moody, D. Branch – Reinhold, B. B. – Guy, M. R. – Beckman, E. M. – Frederique, D. E. – Furlong, S. T. – Ye, S. – Reinhold, V. N. – Sieling, P. A. – Modlin, R. L. – Besra, G. S. – Porcelli, S. A. (1997): Structural Requirements for Glycolipid Antigen Recognition by CD1b-restricted T Cells. *Science*. 278, 283–286.
- Nguyen, Hoa P. – Seto, N. O. – MacKenzie, C. R. – Brade, L. – Kosma, P. – Brade, H. – Evans, S. V. (2003): Gemline Antibody Recognition of Distinct Carbohydrate Epitopes. *Natural Structural Biology*. 10, 1019–25.
- Ramsland, Paul A. – Farrugia, W. – Bradford, T. M. – Mark, Hogarth P. – Scott, A. M. (2004): Structural Convergence of Antibody Binding of Carbohydrate Determinants in Lewis Y Tumor Antigens. *Journal of Molecular Biology*. 340, 809–18.
- Spear, Jeffrey A. – Abdel-Motal, U. M. – Jondal, M. – Wilson, I. A. (1999): Crystal Structure of an MHC Class I Presented Glycopeptide That Generates Carbohydrate-specific CTL. *Immunity*. 10, 51–61.

