

Izotypy przeciwciał występujące u gadów z uwzględnieniem ewolucji genów immunoglobulinowych

KLAUDIA CHRZĄSTEK, TOMASZ PIASECKI

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Chrząstek K., Piasecki T.

Reptilian isotypes of antibodies from the aspect of the evolution of the immunoglobulin gene

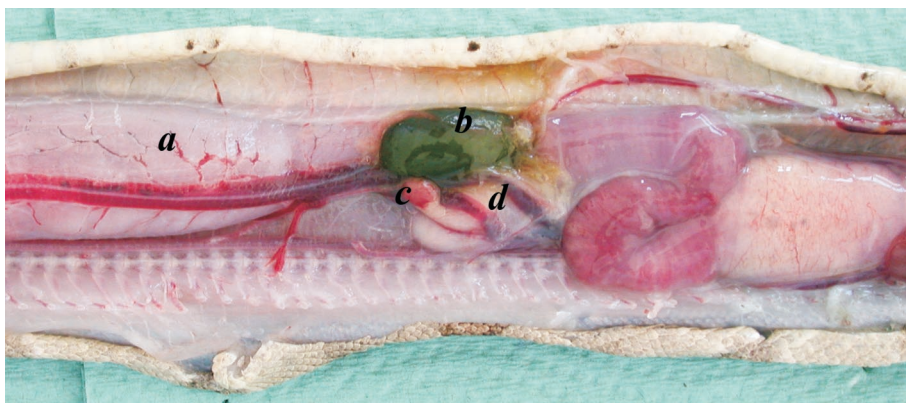
Summary

Antibodies (immunoglobulins, Ig) were first discovered in mammals, as IgM, IgD, IgG, IgE and IgA. These molecules are responsible for humoral immunity. The reptiles are the last major group of vertebrates in which the organization of the IgH locus and its encoded Ig H chain isotypes has not been well characterized. The reptile expresses three Ig H chain isotypes (IgM, IgD and IgY). The presence of the delta gene demonstrates an evolutionary continuity of IgD. Interestingly, A new study of the leopard gecko shows the presence of a gene that is the orthologue of IgA and IgX.

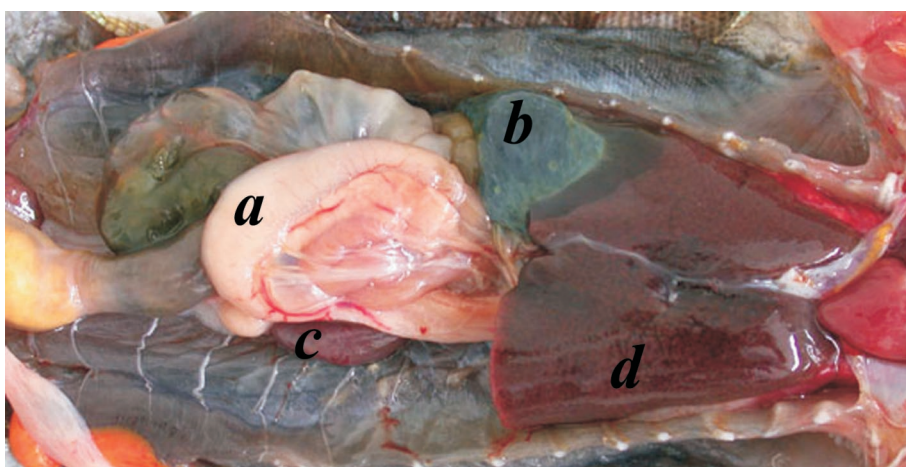
Keywords: reptile, immunoglobulin

Kręgowce w drodze ewolucji odziedziczyły po swych przodkach komórki odpornościowe fagocytarne i cytotoksyczne, stanowiące podstawę ich odporności wrodzonej, natomiast ich nowym nabytkiem są limfocyty, uczestniczące w tzw. odporności nabytej. Gady, podobnie jak i inne kręgowce, są w stanie odpowiadać na zakażenie typową swoistą odpowiedzią immunologiczną, zarówno ze strony immunokompetentnych limfocytów T, jak i B (5, 9, 18, 36), jednakże repertuar generowanych przeciwciał różni się od tych, występujących u ssaków czy choćby ptaków. W ostatnich latach ośrodki badawcze zwróciły szczególną uwagę na tę grupę zwierząt, jako jedną z ostatnich, która do tej pory nie została dokładnie opisana i, być może, stanowi brakujące ogniwo do pełnego zrozumienia ewolucji immunoglobulinowych genów (1, 4, 40). Dodatkowo do ważnych cech wpływających na rozwój odpowiedzi immunologicznej, różniących gady od innych kręgowców, należą: zrogowaciały naskórek pokryty łuskami, tarczками czy płytkami, linienie, rozwój embrionalny zarodków w jajach bądź organizmie samicy oraz zmienność ciepłota. Odpowiedź immunologiczna, będąca efektem pobudzenia układu odpornościowego, podlega także bardzo złożonej kontroli genetycznej. Geny kodujące zdolność odpowiedzi znajdują się w głównym kompleksie zgodności tkankowej. U wszystkich gadów wykryto geny kodujące białka MHC klasy I i II (15, 16, 22, 23).

Wśród narządów limfatycznych u gadów możemy wyróżnić: grasicę, śledzionę (ryc. 1, 2), szpik kostny oraz skupiska tkanki limfatycznej znajdujące się w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego (GALT, gut-associated lymphoid tissue), układu moczowego i kloaki (u żółwi, węży tworzące kompleks kloakalny, którego wielkość zależy od temperatury otoczenia, zdecydowanie zmniejsza się zimą) (13, 21). U niektórych gatunków gadów limfocyty spotyka się również w rejonie podtorebkowym wątroby. Grasica powstaje podczas rozwoju embrionalnego i tak samo jak u ssaków dochodzi do jej inwolucji wraz z wiekiem; dodatkowo u gadów mamy do czynienia z inwolucją przejściową, która ma miejsce np. w niskiej temperaturze otoczenia (13, 24). Śledziona zbudowana jest z miazgi białej i czerwonej, w jej komponentach dochodzi do proliferacji limfocytów pod wpływem stymulacji antygenowej (7, 8, 32, 38). W badaniach Borysenko (7) przeprowadzonych u żółwi wykazano, iż pod wpływem stymulacji antygenowej w 5. dniu od podania antygeny (KLH, keyhole limpet hemocyanin) w obrębie miazgi białej śledziony obecne są skupienia limfoblastów, których liczba wzrastała około 8. dnia. Z kolei około 20.-25. dnia od zastosowanego antygeny liczba limfoblastów w obrębie miazgi białej malała, natomiast zauważono wzrost liczby komórek plazmatycznych w obrębie miazgi czerwonej śledziony. Wykazano także obecność komórek układu odpornościo-



Ryc. 1. U większości gatunków węży śledziona, trzustka i woreczek żółciowy tworzą triadę i leżą przy tylnym biegunie żołądka (wąż zbożowy *Pantherophis guttatus*: a – żołądek, b – woreczek żółciowy, c – śledziona, d – trzustka)



Ryc. 2. Legwan zielony (*Iguana iguana*): a – żołądek, b – woreczek żółciowy, c – śledziona, d – wątroba

wego (immunoblastów, komórek plazmatycznych, makrofagów) w zatokach śledzionowych. Można zatem stwierdzić, że pod wpływem stymulacji antygenowej dochodzi do silnej odpowiedzi immunologicznej objawiającej się proliferacją, różnicowaniem i migracją limfocytów. Jednakże występuje pewna różnica w odpowiedzi ze strony komórek limfocytarnych w porównaniu z ssakami: odpowiedź ze strony komórek limfatycznych zauważono jedynie w temperaturze 30°C. Przeprowadzone przez autora badania w temperaturze 10°C nie wykazały żadnych zmian w obrębie śledziony, co świadczyć może o immunosupresyjnym działaniu niskiej temperatury (7).

Immunoglobuliny

Immunoglobuliny (Ig) za pośrednictwem receptorów błonowych dla fragmentów Fc (FcR) mogą być związane z powierzchnią wielu komórek, jednakże tylko na limfocytach B służą jako receptory wiążące antygen (BCR). Za syntezę receptorów immunoglobulinowych i wolnych przeciwciał odpowiadają różne mRNA. Powstają one w drodze modyfikacji pierwotnego transkryptu. Receptory immunoglobulinowe danego limfocyta B mają identyczne z wolnymi Ig części zmienne, różnią się natomiast budową części sta-

łych łańcuchów ciężkich. Oddzielne egzony kodują poszczególne domeny łańcuchów ciężkich. Ostatni egzon jest połączony z odcinkiem S kodującym krótki aminokwasowy fragment, który występuje tylko na przeciwciałach uwalnianych z komórki, natomiast odcinki M kodują śródbłonowe oraz wewnątrzkomórkowe fragmenty występujące tylko w receptorach Ig. Część zmienna łańcucha lekkiego jest kodowana przez dwa segmenty genowe: V (variable) i J (joining), a łańcucha ciężkiego przez trzy: V, D (diversity) i J. Oddalone są one od segmentu C-kodującego części stałe Ig. Dzięki temu, że istnieje wiele wariantów genów V, D, J w genomie, przypadkowe ich łączenie zwiększa różnorodność immunoglobulin (1-3, 20, 31, 33). I tak, na przykład, w badaniach Turchin i wsp. (33) wykazano, że u żółwi występuje pojedynczy IgH locus z wieloma genomowymi segmentami VH oraz jeden C mu gen. Przy użyciu metod biologii molekularnej, wykorzystując VDJ rearanżację genów dla IgM łańcucha ciężkiego wykazano, że jedno zwierzę posiada 32 unikalne segmenty VDJ, co w efekcie daje 22 warianty sekwencji dla IgM łańcucha ciężkiego. Ta stosunkowo niewielka liczba kombi-

nacji może sugerować istnienie wielu sekwencji dla fragmentu J lub modyfikacji somatycznych w regionie zmiennym. Różnorodność syntetyzowanych przeciwciał jest niezwykle ważna, bowiem warunkuje specyficzną odpowiedź immunologiczną przeciwko konkretnym patogenom zasiedlającym organizm.

Ig zostały po raz pierwszy odkryte i opisane u ssaków jako: IgM, IgD, IgG, IgE i IgA. U ptaków występują: IgM, IgY, IgA, z kolei u płazów możemy wyróżnić pięć izotopów: IgM, IgY, IgX, IgD, IgF (najlepiej opisane u *Xenopus*) (25, 30, 39). Różnią się one wielkością, składem aminokwasów, zawartością węglowodanów, ładunkiem. Podstawową strukturą wszystkich Ig jest jednostka składająca się z dwóch identycznych lekkich i dwóch identycznych ciężkich łańcuchów polipeptydowych połączonych wiązaniem dwusiarczkowym. Różnorodność w obrębie klas i podklas (która pojawiła się późno w ewolucji) określa się jako zmienność izotypową. Wszystkie kręgowce posiadają Ig, które swą strukturą przypominają występujące u ssaków IgM (14). Jej struktura podczas ewolucji uległa tylko nieznacznym zmianom. Ten typ Ig posiada cztery domeny w regionie stałym (C_H1 , C_H2 , C_H3 , C_H4), a każdy z nich zbudowany jest z co najmniej 100 aminokwasów. Można ją znaleźć zarówno u ryb

chrzęstnoszkieletowych, jak i u ssaków (6, 17, 33). Uważa się, że inne klasy przeciwciał powstały w drodze rekombinacji IgM, jednak w dostępnej literaturze można również spotkać się z badaniami, które sugerują, że IgD powstała w tym samym czasie bądź jest nawet ewolucyjnie starsza niż IgM (17, 28). Za tym stwierdzeniem przemawia fakt odkrycia ortologicznych domen charakterystycznych dla IgW u płaza *X. tropicans* w miejscu, gdzie występują domeny dla części stałych IgD (28, 39). Dotychczas uważano, że IgW, nazywana czasem preewolucyjną linią immunoglobulin, występuje jedynie u ewolucyjnie prymitywnych zwierząt (29). Wykazanie jej obecności u płazów oraz koekspresja na powierzchni limfocytów z IgM potwierdza hipotezę, że *de facto* IgW może być prymitywną formą IgD. Jeśli ta teoria okazałaby się trafna, wtedy można założyć, że IgD jest ewolucyjnie starsza niż IgM (28, 39). Dodatkowo u płazów pojawiają się dwie, inne niż u ssaków, immunoglobuliny: IgY oraz IgX. Występująca u *Xenopus* IgY zbudowana jest z czterech domen w obrębie regionu stałego i uważana jest za funkcjonalny homolog występującego u ssaków IgG (34). Natomiast IgX najczęściej występuje w obrębie błony śluzowej jelit, jako analog występującego u ssaków IgA (27). Wszystkie te molekuly są odpowiedzialne za humoralną odpowiedź immunologiczną, a tym samym zaangażowane w obronę przeciwko czynnikom zakaźnym (14).

Gady są ostatnią grupą kręgowców, u których organizacja *locus* IgH (C) oraz kodowanie IgH izotypów nie były dostatecznie scharakteryzowane. IgH *locus* to region w obrębie chromosomu, gdzie znajdują się geny kodujące części stałe Ig. Najnowsze badania Wei i wsp. (35), wykonywane u jaszczurek *Anolis carolinensis* sugerują, że gady posiadają trzy różne IgH (C), które kodują części stałe immunoglobulin IgM, IgD i IgY natomiast brak jest regionu dla części stałej łańcucha alpha IgA.

IgM

Występowanie IgM u gadów wykazano u żółwi, gekonów, kajmanów (10, 12, 33). Konwencjonalna IgM składa się z podstawowych jednostek czteropięciocuchowych, łańcuch ciężki tworzą cztery domeny (4C(H) domeny). Występują dwa typy: sekrecyjna oraz powierzchniowa IgM; transkrypt kodujący krótką powierzchnową glikoproteinę wykazuje brak pierwszych dwóch (transmembranowych) C(H) domen (VDJ-C(H)3-C(H)4). Powstał on w wyniku alternatywnego złączenia mRNA łańcucha ciężkiego (35). Podczas rozwoju embrionalnego Ig te pojawiają się jako pierwsze, już w 7. dniu po zapłodnieniu (37).

Ig D

Obecność genu kodującego łańcuch ciężki delta Ig u jaszczurek świadczy o ewolucyjnej kontynuacji IgD poprzez różne gatunki zwierząt, począwszy od ryb do ssaków, brak jej natomiast u ptaków. Powierzchniowa

IgD, podobnie jak IgM, pełni rolę receptorów w dojrzających limfocytach B. Charakteryzuje się występowaniem 11 C(H) domen, tylko cztery pierwsze są używane podczas ekspresji powierzchniowych IgD (35). Immunoglobuliny IgD można spotkać począwszy od 10. dnia rozwoju zarodkowego; ich poziom, tak samo jak IgM, stopniowo wzrasta od 30. dnia po zapłodnieniu (37).

Ig Y

IgY, podobnie jak u płazów czy ptaków zbudowane są z czterech domen w obrębie regionu stałego. U gadów występuje także krótka izoforma IgY z dwiema C(H) domenami (35). W badaniach Xu i wsp. (37) przeprowadzanych u żółwi wykazano, że podczas rozwoju embrionalnego brak jest ekspresji IgY.

W pierwszym dniu życia ekspresja IgM oraz IgD jest największa w obrębie śledziony, nerek i krwi. Natomiast w 15. dniu obecność IgM oraz IgD można wykazać dodatkowo w jelicie, wątrobie i żołądku. Kontrastuje to z brakiem IgY do 90. dnia, które pojawiają się dopiero w 180. dniu obserwacji w śledzionie, nerkach. Wykazanie dużej ilości IgM, IgD, IgY w tych narządach może świadczyć o ich znaczącej roli w proliferacji limfocytów B oraz jako miejsca prezentacji antygenów (37).

Przeciwciała podobne do Ig A

Interesującym wydaje się fakt, że w badaniach Wei i wsp. (35), nie stwierdzono obecności IgH (C) *locus* dla części stałej łańcucha alpha IgA. Natomiast w badaniach Deza i wsp. (10, 11) wykazano obecność przeciwciał posiadających ewolucyjne podobieństwo do ptasich i występujących u ssaków IgA. Powstały one najprawdopodobniej w procesie rekombinacji pomiędzy IgY a IgM (dwie pierwsze domeny C_H1 i C_H2 są homologiczne z C_H1 i C_H2 IgY, natomiast domeny C_H3 i C_H4 z domenami C_H3 i C_H4 IgM). Autorzy wykazali także ich wysoką koncentrację w obrębie błony śluzowej jelit (11, 12).

Podsumowując, gady w odpowiedzi na różnego typu antygeny są w stanie wykorzystywać wiele mechanizmów efektorowych układu odpornościowego, w tym także endogennie syntetyzować przeciwciała. Odpowiedź humoralna, rodzaj syntetyzowanych Ig różni się od innych kręgowców. W ubiegłym stuleciu uważano, że jedynymi występującymi u gadów izotypami Ig są IgM oraz IgY. Obecnie najnowsze badania (10-12, 35, 37) wskazują również na obecność przeciwciał klasy IgD oraz przeciwciał podobnych do IgA. Powyższe dane ułatwiają zrozumienie teorii ewolucji Ig genów.

Piśmiennictwo

1. Ambrosius H.: Developmental aspects of immunoglobulins and antibodies. *Altex* 1996, 10, 4.
2. Anderson M., Amemiya C., Luer C., Litman R., Rast J., Niimura, Y., Litman G.: Complete genomic sequence and patterns of transcription of a member of an unusual family of closely related, chromosomally dispersed Ig gene clusters in Raja. *Int. Immunol.* 1994, 6, 1661-1670.

3. Anderson M. K., Strong S. J., Litman R. T., Luer C. A., Amemiya C. T., Rast J. P., Litman G. W.: A long form of the skate IgX gene exhibits a striking resemblance to the new shark IgW and IgNARC genes. *Immunogenetics* 1999, 49, 56-67.
4. Aveskog M., Hellman L.: Evidence for an early appearance of modern post-switch isotypes in mammalian evolution: cloning of IgE, IgG, and IgA from the marsupial *Monodelphis domestica*. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 2738-2750.
5. Badir N., Afifi A., El Ridi R.: Cell-mediated immunity in the gecko, *Tarentola annularis*. *Folia Biol. (Praha)* 1981, 27, 28-36.
6. Belov K., Hellman L., Cooper D. W.: Characterisation of echidna IgM provides insights into the time of divergence of extant mammals. *Dev. Comp. Immunol.* 2002, 26, 831-839.
7. Borysenko M.: Changes in spleen histology in response to antigenic stimulation in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.* 1976, 149, 224-241.
8. Borysenko M.: Ultrastructural analysis of normal and immunized spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.* 1976, 149, 243-263.
9. Cray C., Varella R., Bossart G. D., Lutz P.: Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *J. Zoo Wild. Med.* 2001, 32, 436-440.
10. Deza F. G., Espinel C. S.: IgD in the reptile leopard gecko. *Mol. Immunol.* 2008, 45, 3470-3476.
11. Deza F. G., Espinel C. S., Benitez J. V.: A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Dev. Comp. Immunol.* 2007, 31, 596-605.
12. Deza F. G., Espinel C. S., Mompó S. M.: The immunoglobulin heavy chain locus in the reptile *Anolis carolinensis*. *Molecular Immunology* 2009, 46, 1679-1687.
13. El Ridi R., El Deeb S., Zada S.: The gut associated lymphoepithelial tissue (GALT) of lizard and snake. *Aspects of Developmental and Comparative Immunology*. Vol. 1. Pergamon Press, New York 1980, 233-239.
14. Flajnik M. F.: Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprise and portents. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2, 688-698.
15. Glaberman S., Du Pasquier L., Caccone A.: Characterization of a Nonclassical Class I MHC Gene in a Reptile, the Galápagos Marine Iguana (*Amblyrhynchus cristatus*). *PLoS One*. 2008, 3, e2859.
16. Glaberman S., Maria A. Moreno, Caccone A.: Characterization and evolution of MHC class II B genes in Galápagos marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 2009, 33, 939-947.
17. Greenberg A. S., Hughes A. L., Guo J., Avila D., McKinney E. C., Flajnik M. F.: A novel „chimeric” antibody class in cartilaginous fish: IgM may not be the primordial immunoglobulin. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 1123-1129.
18. Herbst L. H., Klein P. A.: Monoclonal antibodies for the measurement of class-specific antibody responses in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995, 46, 317-335.
19. Hsu E.: The variation in immunoglobulin heavy chain constant regions in evolution. *Semin Immunol.* 1994, 6, 383-391.
20. Hsu E., Pulham N., Rumpf L., Flajnik F.: The plasticity of immunoglobulin gene systems in evolution. *Immunol Rev.* 2006, 210, 8-26.
21. Hussein M. F., Badir N., el-Ridi R., Akef M.: Effect of seasonal variation on lymphoid tissues of the lizards, *Mabuya quinquetaeniata* Licht. and *Uromastix aegyptia* Forsk. *Dev. Comp. Immunol.* 1978, 2, 469-478.
22. Kasahara M., Flajnik M. F., Ishibashi T., Natori T.: Evolution of the major histocompatibility complex: a current overview. *Transpl. Immunol.* 1995, 3, 1-20.
23. Kaufman J., Skjoedt K., Salomonsen J.: The MHC molecules of nonmammalian vertebrates. *Immunol Rev.* 1990, 113, 83-117.
24. Leceta J., Zapata A.: Seasonal changes in the thymus and spleen of the turtle, *Mauremys caspica*. A morphometrical, light microscopical study. *Dev. Comp. Immunol.* 1985, 9, 653-668.
25. Lundqvist M. L., Middleton D. L., Radford C., Warr G. W., Magor K. E.: Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Dev. Comp. Immunol.* 2006, 30, 93-100.
26. Mead K. F., Borysenko M.: Surface immunoglobulin on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Dev. Comp. Immunol.* 1984, 8, 109-120.
27. Musmann R., Du Pasquier L., Hsu E.: Is *Xenopus* IgX an analog of IgA? *Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 2823-2830.
28. Ohta Y., Flajnik M. F.: IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 10723-10728.
29. Ota T., Rast J. P., Litman G. W., Amemiya C. T.: Lineage-restricted retention of a primitive immunoglobulin heavy chain isotype within the Dipnoi reveals an evolutionary paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 2501-2506.
30. Schaerlinger B., Basco M., Fripiat J. P.: A new isotype of immunoglobulin heavy chain in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* predominantly expressed in larvae. *Mol. Immunol.* 2008, 45, 776-786.
31. Thompson C. B.: New insights V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* 1995, 3, 531-539.
32. Tomonaga S., Zhang H., Kobayashi K., Fujii R., Teshima K.: Plasma cells in the spleen of the Aleutian skate, *Bathyrhaja aleutica*. *Arch. Histol. Cytol.* 1992, 55, 287-294.
33. Turchin A., Hsu E.: The generation of antibody diversity in the turtle. *J. Immunol.* 1996, 156, 3797-805.
34. Warr G. W., Magor K. E., Higgins D. A.: IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 1995, 16, 392-398.
35. Wei Z., Wu Q., Ren L., Hu X., Guo Y., Warr G. W., Hammarström L., Li N., Zhao Y.: Expression of IgM, IgD, and IgY in a reptile, *Anolis carolinensis*. *J. Immunol.* 2009, 183, 3858-3864.
36. Work T. M., Balazs G. H., Rameyer R. A., Chang S. P., Berestecky J.: Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000, 74, 179-194.
37. Xu Z., Wang G. L., Nie P.: IgM, IgD and IgY and their expression pattern in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Mol. Immunol.* 2009, 46, 2124-2132.
38. Zapata A., Leceta J., Barrutia M. G.: Ultrastructure of splenic white pulp of the turtle, *Mauremys caspica*. *Cell Tissue Res.* 1981, 220, 845-855.
39. Zhao Y., Pan-Hammarstrom Q., Yu S., Wertz N., Zhang X., Li N., Butler J. E., Hammarstrom L.: Identification of IgF, a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 12087-12092.
40. Zimmerman L. M., Vogel L. A., Bowden R. M.: Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 2010, 213, 661-671.

Adres autora: lek. wet. Klaudia Chrzastek, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław; e-mail: klaudia.chrzastek@up.wroc.pl