

medycyna weterynaryjna

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

Czasopismo poświęcone nauce i praktyce weterynaryjnej oraz biologii stosowanej, założone w 1945 r. przez Wydział Weterynaryjny UMCS w Lublinie.

Wydawane z dotacją Komitetu Badań Naukowych

Referowane w: Biological Abstracts, Focus On: Veterinary Science and Medicine, FSTA, Veterinary Bulletin, Index Veterinarius

REDAKCJA: prof. dr hab. Edmund K. PROST – redaktor naczelny, prof. dr hab. Elżbieta PEŁCZYŃSKA – z-ca redaktora naczelnego, dr Krzysztof SZKUCIK – sekretarz administracyjny, mgr inż. Elżbieta STACHYRA – sekretarz redakcji

RADA REDAKCYJNA: prof. dr hab. Ryszard Badura, prof. dr hab. Zdzisław Larski, prof. dr hab. Marian Tischner, prof. dr hab. Stanisław Wołoszyn, prof. dr hab. Stanisław Cakała, prof. dr hab. Zygmunt Cygan, prof. dr hab. Zdzisław Gliński, prof. dr hab. Marian Grundboeck, prof. dr hab. Tomasz Janowski, prof. dr hab. Teodor Juskiewicz, prof. dr hab. Jerzy Kita, prof. dr hab. Włodzimierz Kluciński, prof. dr hab. Władysław Lutyński, dyr. dr Henryk Maciołek, prof. dr hab. Michał Mazurkiewicz, prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, prof. dr hab. Zbigniew Samborski, prof. dr hab. Tadeusz Studziński, prof. dr hab. Eustachy Szeligowski, prof. dr hab. Krzysztof Świeżyński, prof. dr hab. Jan Tropilo, prof. dr hab. Marian Truszczyński, prof. dr hab. Janusz Wawrzekiewicz, prof. dr hab. Jan Żmudzki.

MARIA PROST
Lublin

artykuł przeglądowy

Przeciwciała u ryb – struktura molekularna i jej różnicowanie

Prowadzone od lat siedemdziesiątych intensywne badania nad mechanizmem procesów immunologicznych u ryb pozwoliły na znaczne osiągnięcia i poszerzenie wiedzy z tej dziedziny. Dziś wiadomo, że procesy obronne u ryb w dużym stopniu są podobne do istniejących u wyższych kręgowców i człowieka. Składają się na nie procesy komórkowe i humoralne, w których uczestniczą różne wyspecjalizowane komórki oraz białka. Mechanizm obrony komórkowej wykonywanej głównie przez makrofagi oraz obrony humoralnej związanej z funkcją przeciwciał są regulowane aktywnością komórek mających rolę stymulatorów oraz innych komórek – wykonawców. Komórkami „stymulatorami” są limfocyty T, a „wykonawcami” procesów humoralnych – limfocyty B. Limfocyty T powstające u ryb w nerce przedniej (*pronephros*) dojrzewają w grasicy. Tutaj różnicują się na komórki T_c i T_h . Pierwsze z nich to limfocyty cytolityczne mające za zadanie liżę komórek, na powierzchni których przyłączone zostały obce antygeny. Komórki T_c mają zdolność rozpoznawania tych antygenów dzięki odpowiednim białkowym receptorom na swej powierzchni. Limfocyty T_h – pomocnicze (ang. helper) mają zdolność przyłączania obcych antygenów związanych z zatakowanymi nimi komórkami organizmu. Wyzwała to ich reakcję polegającą na produkcji i wydzielaniu białek zwanych cytokinami. Różne rodzaje cytokin stymulują komórki biorące udział w procesach ob-

ronnych, ale przede wszystkim komórki innej klasy limfocytów – zwanych limfocytami B. Aktywność tych ostatnich stymulowana cytokinami wyraża się produkcją przeciwciał.

Poznanie struktury i funkcji przeciwciał u ryb odbyło się dzięki pracom wielu badaczy, opublikowanym stosunkowo niedawno, głównie w latach dziewięćdziesiątych. Na sympozjum na temat immunologii ryb, które odbyło się w 1995 r. w Reykjaviku w Islandii między innymi przedstawiono (1) najnowsze szczegóły wiedzy o przeciwciałach ryb zebrane z wielu publikacji ogłoszonych w ostatnich latach. W niniejszym artykule zostaną omówione najważniejsze z nich. Wydaje się bowiem, że informacje na ten temat mogą być interesujące dla polskich ichtiopatologów.

Budowa molekularna cząsteczki przeciwciała u ryb

Przeciwciała czyli immunoglobuliny (Ig) są białkami, które występują u wszystkich kręgowców począwszy od ich najniższej grupy bezszczętkowców (*Gnathostoma*). Schemat budowy cząsteczki przeciwciała jest podobny u wszystkich tych zwierząt. Cząsteczka ta składa się z czterech łańcuchów aminokwasowych. Są to jednakowe dwie pary: para dłuższych łańcuchów ciężkich (H – ang. heavy) oraz para krótszych lekkich (L – ang. light). Między

nimi tworzą się tzw. mostki dwusiarczkowe (S-S) łączące atomy siarki wchodzące w skład aminokwasu cysteiny. Wiązania te stabilizują cząsteczkę przeciwciała (ryc. 1). Każdy z czterech łańcuchów aminokwasowych ma charakterystyczne grupy sekwencji zwane domenami, które mają swoiste funkcje. Na końcach N łańcuchów H i L (to jest na końcach, w których pierwszy aminokwas ma wolną grupę aminową NH₂) rozróżnia się domenę zmienną V (ang. variable), a za nią domenę C – stałą (ang. constant), której ostatni aminokwas w łańcuchach H i L ma wolną grupę karboksylową COOH – stąd koniec ten zwany jest końcem C (ryc. 1).

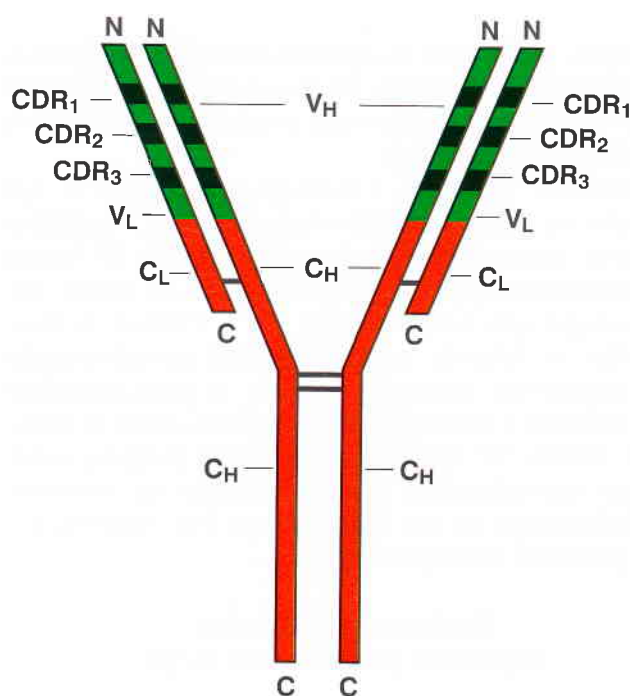
Zadaniem zmiennej domeny V jest wiązanie antygeny. Funkcję tę wykonują zwłaszcza trzy rejony aminokwasowe określane jako nadzmiennie: CDR₁, CDR₂, i CDR₃ (ang. complementarity determining regions). Różne rodzaje przeciwciał różnią się sekwencją aminokwasów w tych właśnie trzech rejonach (ryc. 1).

Zadaniem stałej domeny C w cząsteczce przeciwciała (sekwencja aminokwasów jest w niej niezmienna) jest wiązanie i uaktywnianie zespołu białek mających różne funkcje, a między innymi wywołujących lizę komórek związanych z przeciwciałami. Zespół tych białek zwany jest dopełniaczem. Funkcja obronna przeciwciała jest więc realizowana przez do-

meny stałe przeciwciała. Stąd też domeny te określa się jako efektorowe.

Przeciwciała różniące się budową i funkcją dzielone są u wyższych kręgowców na kilka klas. O przynależności do tej samej klasy decyduje jednako sekwencja aminokwasowa w łańcuchach ciężkich (H). U wyższych kręgowców i człowieka rozróżnia się pięć klas (niektóre z nich dzielą się jeszcze na podklasy). U ryb dotychczas stwierdzono tylko jedną klasę, której struktura molekularna jest podobna do struktury klasy IgM u wyższych kręgowców. Przeciwciała IgM są pierwszymi, które powstały w filogenezie kręgowców oraz pierwszymi produkowanymi przez komórki B w ontogenezie danego gatunku. Cechą charakterystyczną cząsteczek przeciwciał klasy IgM u ryb kostnoszkieletowych jest ich przestrzenna budowa tetrameryczna (ryc. 2). Oznacza to, że cząsteczka przeciwciała tej klasy jest zbudowana z czterech jednostek, z których każda ma typową, czterołańcuchową budowę (dwa łańcuchy H i dwa L). Związanie tych czterech jednostek odbywa się dzięki wiązaniom S-S między cysteinami położonymi w sekwencji aminokwasowej łańcuchów H niedaleko ich końców C.

U ryb chrzęstnoszkieletowych oraz u wszystkich wyższych od ryb grup kręgowców przestrzenna budowa cząsteczek IgM jest pentameryczna, to znaczy, że ich cząsteczka złożona jest z pięciu jednostek (każda z nich zbudowana z dwu łańcuchów H i L). Przyczyny wyjątkowej budowy tetramerycznej przeciwciał IgM u ryb kostnoszkieletowych są przedmiotem wielu hipotez i dyskusji. Uwagę wzbudza zwłaszcza pozycja cysteiny przy końcach C łańcuchów H. We wszystkich pentamerycznych IgM cysteina jest tam 627 aminokwasem (licząc od końca N łańcucha aminokwasowego), natomiast w tetramerycznych IgM u ryb kostnoszkieletowych zajmuje



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki przeciwciała ryb

Objaśnienia:

N i C – końce N i C aminokwasowych łańcuchów ciężkich i lekkich

V_L – zmienna domena łańcucha lekkiego (kolor zielony)

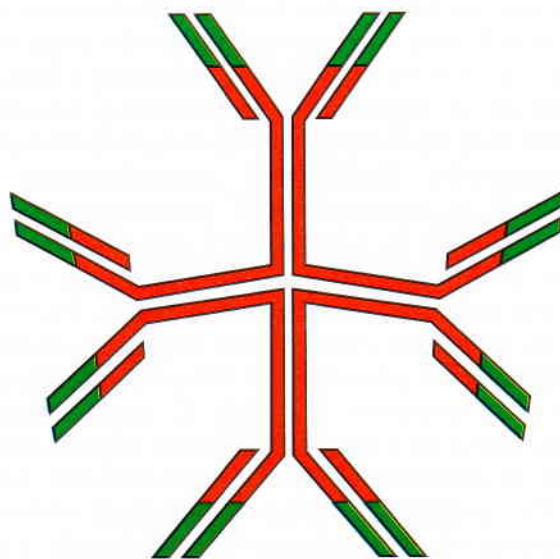
V_H – zmienna domena łańcucha ciężkiego (zielony)

W obu tych domenach ciemnymi polami zaznaczono trzy rejony nadzmiennie: CDR₁, CDR₂ i CDR₃

C_L – stała domena łańcucha lekkiego (kolor czerwony)

C_H – stała domena łańcucha ciężkiego (czerwony)

Czarne linie łączące H i L oznaczają mostki dwusiarczkowe S-S stabilizujące cząsteczkę przeciwciała



Ryc. 2. Schemat tetramerycznej budowy cząsteczki przeciwciała klasy IgM u ryb kostnoszkieletowych

Objaśnienia: Łańcuchy ciężkie oznaczono kolorem czerwonym, łańcuchy lekkie kolorem zielonym. Stabilizujące cząsteczkę mostki S-S nie są zaznaczone

ona pozycję 624. W związku z tym istnieją hipotezy mówiące o trudnościach, jakie może wywoływać taka pozycja cysteiny w powstawaniu przestrzennej struktury pentamerycznej. Nie udało się jednak dotychczas wiarygodnie wyjaśnić przyczyny innej przestrzennej budowy IgM u ryb kostnoszkieletowych w porównaniu do pozostałych grup kręgowców.

Różnicowanie przeciwciał

Wszystkie białka, a więc i przeciwciała są syntetyzowane w komórkach na rybosomach. Jak wiadomo kolejność aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych jest układana według informacji genetycznej, czyli zależnie od kolejności nukleotydów w nici DNA, na odcinku, przy którym powstaje łańcuch kwasu rybonukleinowego mRNA. Kwas mRNA mający sekwencję nukleotydów zależną od ich uszeregowania w matrycy DNA wędruje do rybosomów i tu przy pomocy innych kwasów rybonukleinowych (tRNA i rRNA), a także odpowiednich enzymów powstaje łańcuch aminokwasowy tworzący pierwszorzędową strukturę białka. Kolejność aminokwasów w nici białka jest więc ściśle determinowana przez odpowiedni odcinek DNA, który nazywa się genem.

Pierwszorzędowa struktura łańcuchów H i L przeciwciał jest również determinowana przez geny. Liczba różnych antygenów atakujących komórki kręgowców (w tym i ryb) może być ogromna, a każdy z nich powoduje syntezę specyficznej immunoglobuliny, co jest poprzedzone uaktywnieniem odpowiednich genów DNA i przeniesieniem (poprzez mRNA) informacji genetycznej do rybosomów dojrzających limfocytów B. Stwierdzono, że w genach limfocytów B odpowiedzialnych za kodowanie ciężkich i lekkich łańcuchów przeciwciał oraz ich domen zmiennych i stałych można wyróżnić odpowiednie segmenty nukleotydowe sprawujące te funkcje. W genie kodującym łańcuch ciężki H wyróżnia się trzy segmenty: VH, DH i JH odpowiedzialne za kodowanie domeny zmiennej V, a w niej rejonów nadzmiennych CDR₁ – CDR₃. W genie kodującym łańcuch lekki L istnieją tylko dwa segmenty oznaczane jako VL i JL, które decydują o sekwencji aminokwasowej domeny V tego łańcucha (w tym jej trzech rejonów nadzmiennych CDR).

Należy zaznaczyć, że segmenty VH, których jest u ryb około 100, nie są wszystkie jednakowe. Stwierdzono, że np. u pstrąga tęczowego jest wśród nich co najmniej dziewięć różniących się kolejnością nukleotydów. Podobne zjawisko dotyczy również segmentów VL, których może być około 200, a wśród nich stwierdzono kilka różniących się kolejnością nukleotydów. O segmentach DH i JH oraz JL w DNA ryb mamy dotychczas niewiele danych, ale wiadomo, że również i w nich można rozróżnić po kilka odmiennych sekwencji nukleotydowych. Wszystkie te szczegóły mają podstawowe znaczenie w pro-

cesie różnicowania przeciwciał, jest on bowiem uzależniony od przemian odbywających się w segmentach DNA kodujących zmienne domeny V przeciwciał.

Wobec ogromnej różnorodności antygenów nie jest możliwe aby każdemu rodzajowi przeciwciała odpowiadał odrębny gen. Geny kodujące przeciwciała zajmowałyby bowiem tak znaczną długość łańcucha DNA, że zabrakłoby jej na inne funkcje regulowane przez pozostałe geny tego kwasu. Dlatego też musi istnieć mechanizm, który wykorzystując stosunkowo niewielką liczbę segmentów VH, DH i JH w DNA kodujących zmienną część łańcuchów ciężkich oraz niewielką liczbę segmentów VL i JL w DNA kodujących tę część łańcuchów lekkich – pozwoli na kodowanie licznych i bardzo zróżnicowanych przeciwciał. Jak dziś wiadomo, odbywa się to dzięki zjawisku rekombinacji wewnątrzgenowej czyli przemieszczaniu się w nici DNA i zbliżaniu do siebie segmentów VH, DH i JH oraz VL i JL. Proces ten jest regulowany odpowiednimi enzymami pozwalającymi na przecinanie łańcucha DNA w odpowiednich miejscach i wstawianie do niego przemieszczonych segmentów. Powstają w ten sposób zespoły segmentów o nowym uszeregowaniu nukleotydowym. Ponieważ (jak podano wyżej) liczba segmentów DNA kodujących zmienne domeny V łańcuchów ciężkich i lekkich liczy się w setkach, a kolejność nukleotydów w nich może się różnić – dzięki procesowi rekombinacji liczba syntetyzowanych w limfocytach B rodzajów przeciwciał może być bardzo duża. U ssaków ten sam mechanizm różnicowania przeciwciał umożliwia produkcję różnych ich rodzajów w liczbie 10^{11} . U ryb nie dokonano tego rodzaju obliczeń, ale należy sądzić, że liczba ta jest podobna.

Ostateczna synteza przeciwciał odbywa się w potomnych komórkach limfocytów B zwanych komórkami plazmatycznymi. Jest ona poprzedzona szeregiem znanych nam przemian z udziałem białek aktywujących odpowiednie geny oraz regulujących przebieg rekombinacji genetycznej. Mechanizm tych procesów jest bardzo skomplikowany i nie będzie omówiony w niniejszym artykule.

Proces syntezy i różnicowania immunoglobulin jest jedynie niewielkim fragmentem w porównaniu do ogromnej liczby rodzajów innych przemian, jakie toczą się w żywej komórce. Złożony przebieg produkcji i funkcjonowania przeciwciał przekonuje jak bardzo są skomplikowane procesy życiowe intensywnie odbywające się w komórkach i całych organizmach. Są skomplikowane, ale równocześnie zadziwiająco uporządkowane.

Piśmiennictwo

1. *Pilstrom L., Bengtén E.*: Fish and Shellfish Immunology 6, 243, 1996.

Adres autorki: prof. dr hab. Maria Prost, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin