

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 Oocchama („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 wiedzano 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 śródbłonna 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 śródbłonkiem naczyńniowym. Do nadrodziny immunoglobulin należą adhezyny CD2 oraz LFA2, występujące na limfocytach T i APC i reagujące ze sobą na zasadzie receptor—ligand. Innę 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 ANTYPGEN (ANTYPGEN 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 antygeny 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 antygeny przypisywano wyłącznie makrofagom i komórkom pokrewnym, wywodzącym się ze wspólnej komórki prekursorowej w szpiku kostnym.

Rola komórki prezentującej antygen polega na wchłonięciu antygeny, 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. Odmienne 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

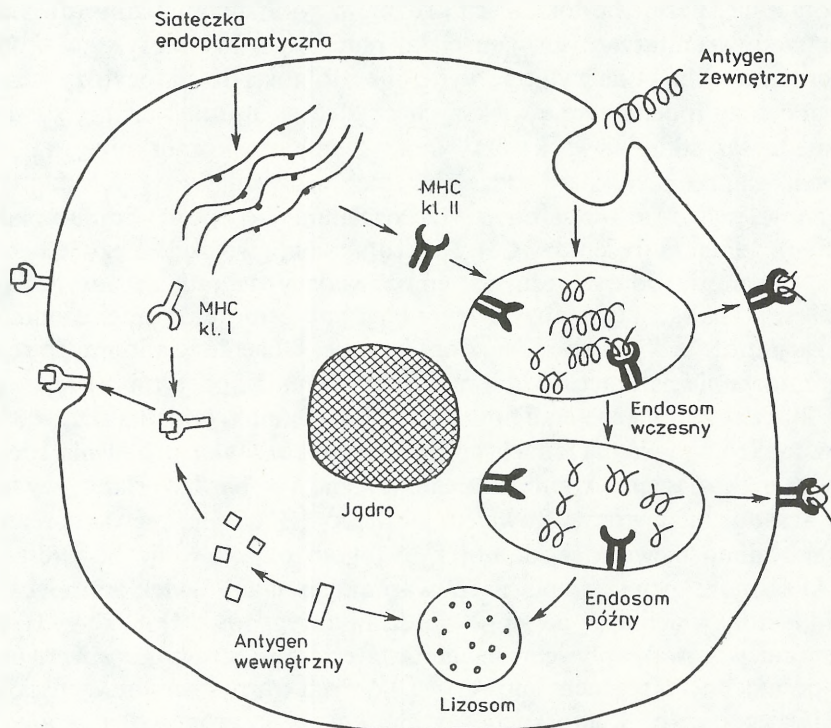
makrofagi niezależnie od lokalizacji i różnic w typie metabolizmu (np. makrofagi narządów limfatycznych, jam ciała, płuc, wątroby, skóry, tzw. komórki Langerhansa). Mają one wybitnie wyrażone zdolności do endocytozy, szczególnie fagocytozy (pochłanianie większych cząsteczek np. bakterii), co związane 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 funkcje 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 antygeny 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 antygeny 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 — katepsynę 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 повторно

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.

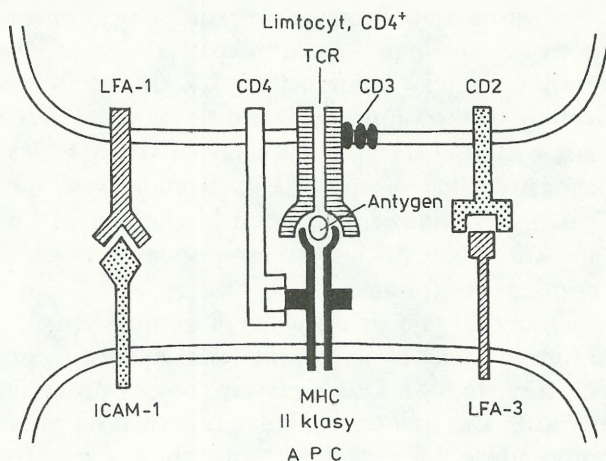
Antygeny endogenne ulegają degradacji enzymatycznej na kilku alternatywnych drogach, z których najważniejszą jest trawienie przez proteazy (enzymy rozkładające białka) znajdujące się w cytosolu komórkowym. Jak wspomniano wyżej, antygenem endogennym może być każde białko znajdujące się w cytoplazmie komórki, 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 antygeny przez limfocyty T

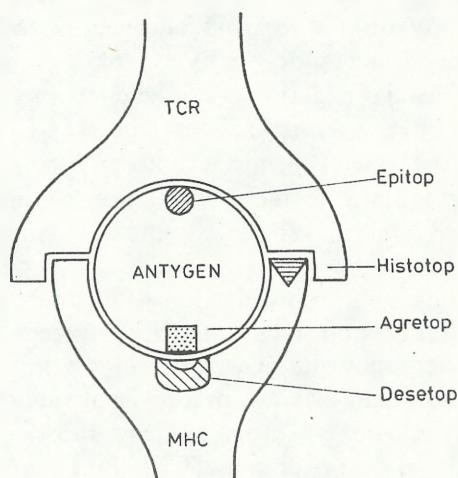
Połączenie receptorów powierzchniowych limfocytów T z ligandami na komórce APC jest warunkiem rozpoznania antygeny. Antygenowo-swoisty receptor TCR-CD3 limfocyta CD4 rozpoznaje antygen na komórce APC w kontekście antygeny MHC klasy II. Antygen różnicowania (koreceptor) CD4 wiąże się z antygenem MHC klasy 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 recyklicacji 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 antygeny 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 antygeny 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 antygeny 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 antygeny klasy I i II jest połączona z fragmentami antygeny własnych i tak eksportowana na powierzchnię komórki. W zasadzie, ponieważ układ immunologiczny nie rozpoznaje antygeny 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 recykliczacji tej ulega w ciągu godziny 25–30% antygeny 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 cząstką 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 (**D**eterminant **s**election, **t**opos, gr. = miejsce). Wiążąca się z MHC struktura peptydu stanowi AGRE-TOP (**A**ntigen **r**ecognition). 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 odmienne 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 limfocyt 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 limfocyt 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 jakkolwiek 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

S u m m a r y

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.