

## ZNACZENIE PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL\*

### THE SIGNIFICANCE OF ANTI-GAL ANTIBODIES

Marcin KLEJMAN, Joanna BERETA

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

**Streszczenie:** Surowice człowieka, naczelnych i małp wąskonosych zawierają unikalne przeciwciała anti-Gal skierowane przeciwko epitopowi Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc ( $\alpha$ -gal). Przeciwciała o takiej specyficzności stanowią najpowszechniejszą grupę przeciwciał w surowicach tych gatunków. Przeciwciała anti-Gal zaangażowane są w szereg procesów związanych z obroną organizmu, mogą jednak również uczestniczyć w patogenezie niektórych chorób. Anti-Gal mogą potencjalnie stanowić pierwszą linię obrony przeciwko niektórym pasożytom, wirusom i bakteriom; aktywować kaskadę dopełniacza na powierzchni niektórych komórek nowotworowych; regulować usuwanie starych i nieprawidłowych erytrocytów. Podniesiony poziom anti-Gal wykazano w szeregu chorób autoimmunologicznych, między innymi w chorobie Gravesa-Basedowa, gdzie przeciwciała te aktywują komórki pęcherzykowe tarczycy. Przeciwciała anti-Gal są również pierwszą przeszkodą w przeprowadzeniu udanej transplantacji człowiekowi organów takich ssaków, jak świnia, gdyż większość przeciwciał odpowiedzialnych za nadostre odrzucenie takich przeszczepów to anti-Gal.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 159–170*)

**Słowa kluczowe:** epitop  $\alpha$ -gal, przeciwciała naturalne, dopełniacz, transplantacja

**Summary:** Human, ape and Old World monkey sera contain unique anti-Gal antibodies directed against Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc epitope ( $\alpha$ -gal). It is the most common antibody specificity within the sera of these animals. Anti-Gal antibodies are involved in many processes of immune defence but they might be also involved in pathogenesis of some disorders. Anti-Gal might be the first line of defence against some parasites, viruses and bacteria. They activate complement cascade on the surface of some cancer cells and regulate senescent or pathological erythrocytes clearance. Elevated levels of anti-Gal antibody were shown in many autoimmune disorders. For example in Graves' disease anti-Gal antibodies activate thyrocytes. Anti-Gal antibodies are also the most important barrier to successful transplantation of organs obtained from mammals such as pig to human. Most common xenoreactive antibodies responsible for hyperacute organ rejection are in fact anti-Gal antibodies.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 159–170*)

**Keywords:** epitope ( $\alpha$ -gal), natural antibodies, complement, transplantation

\*Praca dofinansowana z projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych 4P05A 027 11

Przeciwciała anti-Gal<sup>1</sup> skierowane przeciwko końcowej reszcie galaktozy występującej w łańcuchach oligosacharydów opisano i wyizolowano na początku lat osiemdziesiątych [1, 2]. Specyficzność względem epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc ( $\alpha$ -gal) (rys. 1) została określona dzięki wiązaniu się przeciwciał anti-Gal do glikolipidów o zdefiniowanej strukturze pochodzących z erytrocytów królika [3]. Wykazano również, że przeciwciała anti-Gal mają ściśle określoną swoistość względem epitopu  $\alpha$ -gal, nie wiążą się zaś lub wiążą słabo do naturalnych lub syntetycznych oligosacharydów o podobnej strukturze [4, 5].

Zidentyfikowano również szereg glikoprotein zwierzęcych, które wykazują znaczną zawartość łańcuchów oligosacharydowych o strukturze  $\alpha$ -gal. Dla przykładu tyreoglobulina bydłęca ma 11 cząstek tego epitopu na jedną cząsteczkę białka, tyreoglobulina świńska ok. 6 [6], zaś mysia laminina 50–70 [7]. Analogiczne białka ludzkie nie mają  $\alpha$ -gal.

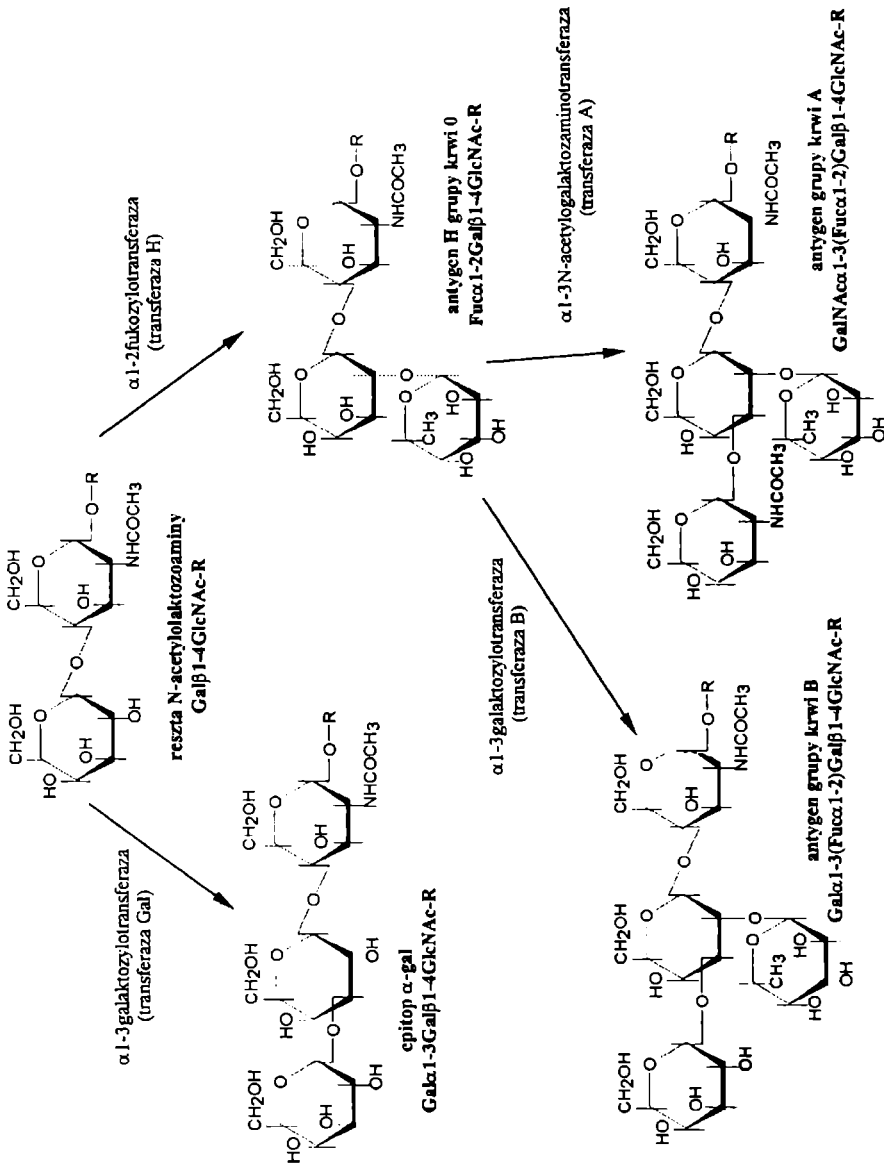
Analiza występowania przeciwciał anti-Gal oraz występowania epitopu  $\alpha$ -gal w glikolipidach i glikoproteinach wielu ssaków, w tym człowieka, wykazała ich unikalną dystrybucję gatunkową. Wszystkie badane małpy wąskonosy, naczelnie i człowiek nie syntetyzują epitopu  $\alpha$ -gal, natomiast ich surowica zawiera wysokie stężenie przeciwciał anti-Gal. Małpiatki, małpy szerokonosy i pozostałe ssaki syntetyzują epitop  $\alpha$ -gal, a w ich surowicy nie występuje przeciwciało anti-Gal [8].

## PRZECIWCIAŁA ANTY-GAL JAKO PRZECIWCIAŁA „NATURALNE”

Przeciwciała anti-Gal zaliczane są do grupy przeciwciał „naturalnych”. Grupę tę tworzą obok przeciwciał skierowanych przeciwko  $\alpha$ -gal, izohemaglutyniny układu grupowego ABO krwi oraz część autoprzeciwciał, czyli immunoglobulin skierowanych przeciwko antygenom własnym organizmu (fosfatydyloserynie, cholesterolowi, aktynie, DNA, przeciwciałom i wielu innym) [9, 10].

Przez długi czas uważano, iż wszystkie przeciwciała „naturalne” występują w surowicy bez poprzedzającej stymulacji antygenem. W przypadku przeciwciał anti-Gal wykazano jednak, że wysokie stężenie tych przeciwciał w surowicy jest wynikiem stałej immunizacji. Opisano obecność  $\alpha$ -gal w lipopolisacharydach wielu rodzajów bakterii – między innymi *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia* [cyt. za 11]. Dodatkowo wykazano, że przeciwciała anti-Gal i izohemaglutyniny grup krwi wiążą się do antygenów bakterii jelitowych lub bakterii izolowanych z krwi ludzi w stanie szoku septycznego. Co więcej, niektóre bakterie naturalnej flory jelit można wyznakować przeciwciałami anti-Gal nie po lizie, ale wprost w rosnących koloniach

<sup>1</sup>Stosowane skróty:  $\alpha$ 1-3GT – UDP-Gal:Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\alpha$ 1-3galaktozylotransferaza;  $\alpha$ -ga I – epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc; antiGal – przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi  $\alpha$ -gal.



RYСУNEK 1. Struktura epitopu  $\alpha$ -gal i antygenów grup krwi oraz schemat ich biosyntezy

[11]. Te właśnie bakterie mogą być odpowiedzialne za ciągłą immunizację epitopem  $\alpha$ -gal *in vivo*. Również przeciwciała układu grupowego AB0 występują w surowicy ludzkiej w wysokim stężeniu. W klasycznym doświadczeniu wykazano, że podawanie ludziom bakterii *E. coli* powoduje podniesienie poziomu przeciwciał układu AB0 [12]. Potwierdza to teorię pojawiania się przeciwciał „naturalnych” w wyniku immunizacji.

## STĘŻENIE PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL W SUROWICY LUDZKIEJ

W surowicy ludzkiej występują przeciwciała anty-Gal klas IgG i IgM, natomiast IgA znajdowane są głównie w wydzielinach surowiczośluzowych [2, 13, 14]. Są to najbardziej powszechne przeciwciała ludzkiej surowicy, a ich stężenie jest nieporównywalnie wyższe niż jakichkolwiek innych przeciwciał „naturalnych”. Anty-Gal klasy IgG stanowią około 1% (0–2,5%) wszystkich IgG surowicy [2, 15], natomiast anty-Gal IgM – 1–10% krążących IgM [14]. Charakterystyczne jest to, iż stężenie przeciwciał anty-Gal u różnych ludzi może wahać się od wartości nieznacznych do bardzo dużych. Jak dotąd nie określono u ludzi zdrowych zależności między stężeniem poszczególnych klas tych przeciwciał względem siebie, jak i nie stwierdzono wpływu jakiegokolwiek niepatogenego czynnika zewnętrznego na ich poziom.

Immunoglobuliny anty-Gal pojawiają się w surowicy niemowląt wraz z pojawianiem się odpowiednich klas przeciwciał. Oznacza to, iż w surowicy noworodka znajdują się przeciwciała anty-Gal klasy IgG pochodzące od matki, zaś poziom anty-Gal IgM jest początkowo bardzo niski. W ciągu kilku pierwszych miesięcy życia stężenie przeciwciał anty-Gal zarówno klasy IgM, jak i IgG osiąga wartości typowe dla organizmów dorosłych. Statystycznie, poziom anty-Gal utrzymuje się w zasadzie na niezmiennym poziomie we wszystkich grupach wiekowych, a ich aktywność zaczyna obniżać się dopiero około 70–75 roku życia [16].

## SPECYFICZNOŚĆ PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL

Przeciwciała anty-Gal są heterogenne, a więc w surowicy istnieją różne populacje tych przeciwciał o różnej charakterystyce wiązania  $\alpha$ -gal. Jest to bezpośrednim wynikiem produkcji anty-Gal przez różne klony limfocytów B.

Różnice w specyficzności przeciwciał anty-Gal zostały wykazane w interesującym doświadczeniu. Epitop  $\alpha$ -gal (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) jest bardzo podobny do determinanty grupy krwi B człowieka (Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc); różni się od niej jedynie brakiem pojedynczej reszty fukozy (rys. 1). Mimo tak niewielkiej różnicy między tymi epitopami, u ludzi z grupą krwi B lub AB nie ma oczywiście

w obrębie całej puli przeciwciał anti-Gal takich, które rozpoznawałyby jednocześnie antygen B. Natomiast u ludzi z grupą krwi A lub 0 występują przeciwciała anti-Gal, które rozpoznają również antygen grupy krwi B. Co ciekawe, stwierdzono, że większość przeciwciał reagujących z antygenem B wiąże się także do epitopu  $\alpha$ -gal, nie są to więc przeciwciała ze specyficznością ograniczoną do antygeny B [17]. Przeciwciała anti-Gal u ludzi z grupą krwi B lub AB są więc bardziej swoiste w stosunku do epitopu  $\alpha$ -gal niż przeciwciała anti-Gal u ludzi z grupą krwi A lub 0.

Innym epitopem rozpoznawanym przez anti-Gal jest rzadko występujący glikolipid  $x_2$  (GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc-Cer). Anti-Gal wiążą ten epitop 50 razy słabiej niż  $\alpha$ -gal [5], tym niemniej wiązanie anti-Gal do glikolipidu  $x_2$  może mieć znaczenie fizjologiczne (opisane niżej). Ponadto anti-Gal wiążą się do peptydów występujących w ludzkich mucynach. Wyjaśnia to fakt wiązania się anti-Gal do komórek ludzkiego raka sutka [18] wykazujących ekspresję mucyn.

Oprócz istotnych różnic w poziomie przeciwciał anti-Gal w surowicach ludzi zdrowych, istnieją również znaczące różnice w ich powinowactwie do  $\alpha$ -gal. Obserwuje się duże różnice w wiązaniu się przeciwciał anti-Gal pochodzących z surowic różnych osób, zarówno do antygenów immobilizowanych jak i antygenów w roztworze, nawet wówczas, gdy poziom przeciwciał anti-Gal w badanych surowicach jest podobny. Stałe powinowactwa  $K_a$  określające oddziaływanie, wyizolowanych z surowic dwóch różnych osób, przeciwciał anti-Gal z epitopem  $\alpha$ -gal wynosiły  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  oraz  $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , a więc różniły się 30-krotnie [19]. Warto zauważyć, że powinowactwo anti-Gal do  $\alpha$ -gal jest stosunkowo niskie w porównaniu z powinowactwem typowych przeciwciał wiążących peptydy.

Wielkością, która lepiej charakteryzuje oddziaływanie przeciwciał z antygenami obecnymi na powierzchni komórek, jest funkcjonalna zachłanność (ang. *functional avidity*) mierzona z użyciem immobilizowanego ligandu. Funkcjonalna zachłanność wyrażona jako stała dysocjacji dla oddziaływania ludzkich anti-Gal IgM z antygenami obecnymi na komórkach śród błonka świni oznaczana w temp.  $37^\circ\text{C}$  wynosiła  $1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$  [14]. Wartość ta była co najmniej o rząd wielkości niższa niż określona dla przeciwciał klasy IgG, co związane jest z większą zachłannością poliwalentnych IgM. Rozbicie anti-Gal IgM na monomery i dimery znacząco osłabia ich wiązanie do  $\alpha$ -gal [14].

## ZNACZENIE PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL

### Znaczenie przeciwciał anti-Gal w transplantologii

Od dawna postuluje się, iż jednym z najbardziej oczywistych źródeł organów do przeszczepów są zwierzęta. Poza naczelnymi i małpami wąskonosymi, których hodowla jest powolna i droga, naturalnym dawcą może być świnia, gdyż ma ona

organy o zbliżonej wielkości i anatomii do ludzkich. Niestety, próby przeszczepów unaczynionych narządów świńskich kończą się zawsze ich nadostrym odrzuceniem, czyli występującym w czasie minut od przeszczepu. Spowodowane jest to nagłą aktywacją kaskady dopełniacza na powierzchni śródbłonna naczyń przeszczepianego organu prowadzącą do jego zniszczenia. Dowiedziono, że ponad 80% ludzkich „naturalnych” przeciwciał ksenoreaktywnych wiążących się do komórek świńskiego śródbłonna to przeciwciała anty-Gal [14].

Jednocześnie wykazano, iż to anty-Gal klasy IgM są u zdrowego człowieka odpowiedzialne za aktywację klasycznej drogi dopełniacza na komórkach zwierzęcych mających ekspresję epitopu  $\alpha$ -gal. Anty-Gal klasy IgG nie tylko nie aktywują dopełniacza, ale w niektórych doświadczeniach mogą wręcz hamować jego odkładanie. Wyjaśnieniem zjawiska braku aktywacji dopełniacza przez anty-Gal IgG może być to, iż są one u zdrowych ludzi w większości podklasy IgG2 [15]. Przeciwciała tej podklasy nie aktywują wydajnie klasycznej drogi dopełniacza, a ponadto charakteryzują się niższą zachłannością.

Po stymulacji antygenem, tak jak to ma miejsce na przykład po zewnętrznym włączeniu nerki świni w obieg krwi naczelnych, następuje odpowiedź organizmu związana z przełączeniem klas przeciwciał i silnym wzrostem poziomu anty-Gal IgM, a następnie IgG o zwiększonym powinowactwie do  $\alpha$ -gal. Podnosi się znacznie ilość przeciwciał podklasy IgG1, które, odmiennie od IgG2, efektywnie aktywują dopełniacz [20].

Do tej pory przeprowadzono wiele badań mających doprowadzić do rozwiązania problemu nadostrego odrzucania przeszczepów. Jak się wydaje, jedynie organy świni transgenicznej, która posiadałaby ekspresję genów „uczłowieczających” jej komórki, stanowiłyby pożądanym materiałem do przeszczepów ksenogenicznych. Ze względu na brak odpowiedniej linii komórek embrionalnych świni, prace prowadzące do uzyskania zwierząt tego gatunku z wyłączonym (*knock-out*) genem np. kodującym  $\alpha$ 1-3galaktozylotransferazę odpowiedzialną za syntezę epitopu  $\alpha$ -gal, nie były możliwe. Podjęto więc prace zmierzające do modyfikacji szlaku syntezy łańcuchów oligosacharydowych przez wprowadzenie do komórek genów kodujących dodatkowe enzymy. Wykazano, że koekspresja w komórkach świńskich  $\alpha$ -galaktozydazy usuwającej końcową resztę galaktozy oraz  $\alpha$ 1-2fukozylotransferazy (transferazy H), syntetyzującej na tak powstałym rdzeniu antygen grupy krwi 0 (rys. 1), zapobiega odkładaniu się na powierzchni komórek anty-Gal i chroni je przed lizą [21]. Przy dodatkowym wprowadzeniu ludzkich genów kodujących białka inaktywujące dopełniacz, jak np. DAF (CD55), czy HRF20 (CD59), można byłoby prawdopodobnie efektywnie zapobiegać nadostrej fazie odrzucania przeszczepu [22].

Ostatnie doniesienia o sklonowaniu świni z użyciem jąder zróżnicowanych komórek jako donorów DNA mogą świadczyć o zbliżającej się fazie intensywnych testów nad przeszczepianiem zmodyfikowanych świńskich organów. Nie należy jednak zapominać o trudnościach w eliminacji m.in. ostrej (opóźnionej) fazy od-

rzucania związanej z późniejszą odpowiedzią komórkową i humoralną organizmu biorcy oraz z ewentualnymi niebezpieczeństwami transmisji groźnych odzwierzęcych wirusów.

## ZNACZENIE ANTY-GAL I $\alpha$ -GAL W PROCESACH OBRONNYCH ORGANIZMU

Przeciwciała anty-Gal są potencjalnie jedną z pierwszych linii obrony przeciwko różnym patogenom. Antygeny wielu bakterii izolowanych z ludzkich jelit i krwi są rozpoznawane przez anty-Gal [11]. Wiadomo, że budowa ściany poszczególnych szczepów bakterii wpływa na zdolność anty-Gal do indukcji zabijania. Nie wykazano jednakże prostej zależności między odkładaniem się anty-Gal na powierzchni komórek bakteryjnych i aktywacją dopełniacza, a podatnością bakterii na zabicie [11]. Potrzebne są szersze badania ze szczególnym zwróceniem uwagi na różne klasy przeciwciał, aby ustalić znaczenie anty-Gal w obronie przed infekcjami bakteryjnymi.

Kolejnym ważnym procesem, w którym mogą brać udział przeciwciała anty-Gal, jest ochrona przed wirusami odzwierzęcymi. Wykazano, iż większość wirusów, które namnożyły się w komórkach ssaków produkujących  $\alpha$ -gal jest efektywniej niszczone przez dopełniacz surowicy ludzkiej [23] niż wirusy namnażane w komórkach niesyntetyzujących tego epitopu. Ma to również implikacje terapeutyczne: konstruując wektory wirusowe służące do terapii genowej *in vivo* należy brać pod uwagę ekspresję  $\alpha$ -gal w komórkach służących do namnażania wirusa.

Przeciwciała anty-Gal wiążą się również do powierzchni pasożytów zakażających człowieka. Wykazano, iż świdrowiec *Trypanosoma cruzi*, który powoduje chorobę Chagasa objawiającą się często zapaleniem mięśnia sercowego, ma na swej powierzchni wysokie stężenie epitopu  $\alpha$ -gal [24]. W związku z tym u większości chorych obserwuje się znacznie podniesiony poziom anty-Gal. Stwierdzono, że przeciwciała te uczestniczą w zabijaniu komórek świdrowca i ograniczaniu choroby [25]. Wiciowce *Leishmania* również mają epitop  $\alpha$ -gal [24], a chorzy często wykazują duże stężenie anty-Gal, choć brak dowodów na zdolność anty-Gal do lizy tych pasożytów. Lista pasożytów, z którymi przeciwciała anty-Gal mogą oddziaływać, ciągle rośnie. Anty-Gal stanowią potencjalnie ważny element obrony przed rozwojem zakażeń powodowanych przez niektóre z nich.

## WIĄZANIE ANTY-GAL DO KOMÓREK LUDZKICH

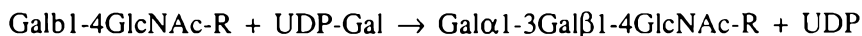
Epitop  $\alpha$ -gal nie występuje w strukturze żadnych ludzkich glikolipidów lub glikoprotein. Może być więc zaskakujące, iż przeciwciała anty-Gal wiążą się do niektórych typów komórek człowieka, głównie w stanach patologicznych. Jak na ironię, pierwsze doniesienia o przeciwciałach anty-Gal były wynikiem wiązania się ich

do patologicznych erytrocytów ludzi cierpiących na  $\beta$ -talasemię [1]. Następne doniesienia mówiły o wiązaniu się tych przeciwciał do starych (ang. *senescent*) erytrocytów zdrowych ludzi [26] oraz do erytrocytów ludzi z anemią sierpowatą [27]. Obecnie panuje pogląd, że za wiązanie przeciwciał anty-Gal do patologicznych lub starych erytrocytów jest odpowiedzialny, opisywany wcześniej i występujący u ludzi, glikolipid  $x_2$ . W stanach patologicznych lub podczas starzenia się erytrocytu może być on prawdopodobnie eksponowany na tyle, aby anty-Gal mogły się z nim wiązać. Postuluje się, iż odkładanie anty-Gal na powierzchni starych erytrocytów jest jednym z mechanizmów ich fizjologicznego usuwania z ustroju [26].

Nieznanym jest również epitop wiążący anty-Gal do powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy ludzi cierpiących na autoimmunologiczną chorobę Gravesa-Basedova. U chorych występują autoprzeciwciała specyficzne w stosunku do sekwencji aminokwasowej fragmentu receptora dla tyreotropiny, powodujące niekontrolowaną aktywację komórek pęcherzykowych. W surowicy chorych stwierdza się również znacznie podniesiony poziom przeciwciał anty-Gal, które także reagują z powierzchnią komórek tarczycy, aktywując je podobnie do znanych wcześniej autoprzeciwciał. Usunięcie anty-Gal z surowic pochodzących od pacjentów obniża aktywację komórek pęcherzykowych o ponad 50%. Jednocześnie surowice chorych nie wywierają żadnego efektu na komórki pęcherzykowe tarczycy zdrowych ludzi, co świadczy o ekspresji specyficznego epitopu rozpoznawanego przez anty-Gal na powierzchni komórek ludzi chorych [28]. Natura tego epitopu nie została poznana; można więc jedynie spekulować, czy jest to znany glikolipid  $x_2$ , peptyd podobny do tych występujących w mucynach, czy też może jakaś inna struktura.

## GEN DLA $\alpha$ 1-3GALAKTOZYLOTRANSFERAZY ( $\alpha$ 1-3GT) I JEGO EWOLUCJA

Enzym UDP-Gal:Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\alpha$ 1-3galaktozylotransferaza ( $\alpha$ 1-3GT), (EC 2.4.1.87), katalizuje reakcję przeniesienia reszty galaktozy na resztę N-acetylotktozamin w przedziale *trans* aparatu Golgiego:



Niższe kręgowce nie mają prawdopodobnie aktywnego genu kodującego  $\alpha$ 1-3GT, a więc nie zachodzi w ich komórkach synteza  $\alpha$ -gal. Ekspresja genu kodującego  $\alpha$ 1-3GT, a co za tym idzie, ekspresja epitopu  $\alpha$ -gal obserwowana jest dopiero u ssaków. Rozkład ekspresji genu  $\alpha$ 1-3GT u ssaków jest bardzo charakterystyczny – enzym ten występuje u wszystkich małpiatek, małp szerokonosych (Nowego Świata) i gatunków mniej niż małpy zaawansowanych ewolucyjnie. Zwierzęta te mają więc na powierzchni swych komórek epitop  $\alpha$ -gal, natomiast w ich surowicy brak przeciwciał anty-Gal. U małp wąskonosych (Starego Świata), naczelnych i człowieka



nie ma ekspresji genu kodującego  $\alpha 1$ -3GT. Dzięki temu możliwe jest występowanie w ich surowicy wysokiego stężenia anty-Gal [8]. Oligosacharydy wchodzące w skład glikolipidów i glikoprotein tych ssałów są najczęściej zakończone resztą kwasu sjałowego.

Inaktywacja genu  $\alpha 1$ -3GT u wszystkich badanych małp wąskonosych, w odróżnieniu od małp Nowego Świata, dowodzi, iż proces ten nastąpił już po geograficznym rozdzieleniu się tych dwóch populacji. Po sklonowaniu genu kodującego  $\alpha 1$ -3GT stało się możliwe zbadanie jego ewolucji. U gatunków z nieaktywną  $\alpha 1$ -3GT wykryto pseudogen; brak ekspresji genu jest spowodowany prawdopodobnie mutacjami w obrębie promotora. U naczelnych i człowieka występują także mutacje typu przesunięcia ramki odczytu w eksonie kodującym domenę katalityczną enzymu.

Istnieją dwie hipotezy tłumaczące powszechny brak ekspresji  $\alpha 1$ -3GT u wyższych małp. Pierwsza mówi, że małpy wąskonosy mogły zostać poddane presji ewolucyjnej, na skutek której gen  $\alpha 1$ -3GT uległ inaktywacji [artykuł przeglądowy 29]. Jednym z powodów mogło być pojawienie się na obszarze Afryki groźnych patogenów, które miały na swej powierzchni epitop  $\alpha$ -gal. Następstwem tego była pozytywna selekcja takich osobników, u których doszło do wyłączenia ekspresji genu dla  $\alpha 1$ -3GT, dzięki czemu mogły pojawić się, bez wywoływania procesów autoimmunologicznych, przeciwciała anty-Gal chroniące przed zakażeniem. Istnienie patogenów mających na powierzchni  $\alpha$ -gal jest udokumentowane [24], natomiast udowodnienie takiej hipotezy jest niezwykle trudne.

Innym potencjalnym stymulatorem takiej presji ewolucyjnej mógłby być wirus lub bakteria, dla których  $\alpha$ -gal na powierzchni komórek zwierzęcych byłby receptorem wymaganym do zakażenia lub receptorem dla toksyn bakteryjnych. Taki przypadek wykorzystania epitopu  $\alpha$ -gal przez współczesne bakterie jest znany [30]. Ocena okresu, w jakim doszło do inaktywacji  $\alpha 1$ -3GT, na podstawie ilości i tempa mutacji oraz porównania sekwencji genu u różnych małp wskazywać może, iż to wydarzenie zaszło już po oddzieleniu się małp Starego Świata od naczelnych (około 28 milionów lat temu) niezależnie w tych dwóch grupach. Co ciekawsze, badania paleontologiczne wykazują, iż naczelne były bardzo rozpowszechnione w Afryce około 20 milionów lat temu. Ilość znajdowanych szczątków naczelnych pochodzących z późniejszych okresów jest jednak niewielka, zaś obecna liczba gatunków jest bardzo mała. Powszechny brak ekspresji  $\alpha 1$ -3GT u wszystkich małp Starego Świata może świadczyć o masowym wyginięciu małp kilkanaście milionów lat temu i odrodzeniu się populacji z małej ilości osobników.

Hipoteza alternatywna [31] postuluje, że pojedyncza mutacja powodująca pojawienie się kodonu stop w genie dla  $\alpha 1$ -3GT jeszcze przed oddzieleniem się naczelnych od małp wąskonosych jest przyczyną braku epitopu  $\alpha$ -gal u wszystkich wąskonosych. Kolejne mutacje w regionie promotorowym spowodowały zaś zaniknięcie nieaktywnego transkryptu dla  $\alpha 1$ -3GT. Podstawą tego rozumowania jest analiza sekwencji zduplikowanych pseudogenów  $\alpha 1$ -3GT u człowieka [32]. Po-

parciem dla tej hipotezy jest obserwacja podobnej punktowej mutacji (typu przesunięcia ramki odczytu) w genie kodującym glikozylotransferazę systemu grup krwi ABO, która spowodowała pojawienie się grupy 0. Podobne są też korzyści, jakie pojawiły się w wyniku mutacji obydwu glikotransferaz – nastąpiło zwiększenie we krwi różnorodności przeciwciał skierowanych przeciwko oligosacharydom potencjalnych patogenów.

Mimo kilkunastoletnich badań nad funkcją przeciwciał anti-Gal, nadal wiele pozostaje do wyjaśnienia. Tym niemniej, rola przeciwciał anti-Gal w takich ważnych procesach, jak: autoimmunizacja, obrona przeciwbakteryjna, czy odrzucanie przeszczepów ksenogenicznych, już teraz zaczyna być doceniana.

## LITERATURA

- [1] GALILI U, KORKESH A, KAHANE I, RACHMILEWITZ EA. Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells. *Blood* 1983; **61**: 1258–1264.
- [2] GALILI U, RACHMILEWITZ EA, PELEG A, FLECHNER I. A unique natural human IgG antibody with anti- $\alpha$ -galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; **160**: 1519–1531.
- [3] GALILI U, MACHER BA, BUEHLER J, SHOHET SB. Human natural anti- $\alpha$ -galactosyl IgG. II. The specific recognition of  $\alpha(1-3)$ -linked galactose residues. *J Exp Med* 1985; **162**: 573–582.
- [4] GALILI U, BASBAUM CB, SHOHET SB, BUEHLER J, MACHER BA. Identification of erythrocyte Gal $\alpha$ 1-3Gal glycosphingolipids with a mouse monoclonal antibody, Gal-13. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4683–4688.
- [5] TENEBERG S, LONNROTH I, TORRES LOPEZ JF, GALILI U, HALVARSSON MO, ANGSTROM J, KARLSSON KA. Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4 GlcNAc $\beta$ -binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti- $\alpha$ -galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 1996; **6**: 599–609.
- [6] SPIRO RG, BHOYROO VD. Occurrence of  $\alpha$ -D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units. *J Biol Chem* 1984; **259**: 9858–9866.
- [7] ARUMUGHAM RG, HSIEH TC, TANZER ML, LAINE RA. Structures of the asparagine-linked sugar chains of laminin. *Biochim Biophys Acta* 1986; **883**: 112–126
- [8] GALILI U, SHOHET SB, KOBRIN E, STULTS CL, MACHER BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of  $\alpha$ -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17755–17762.
- [9] CASALI P, NOTKINS AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 1989; **10**: 364–368.
- [10] COUTINHO A, KAZATCHKINE MD, AVRAMEAS S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 812–818.
- [11] GALILI U, MANDRELL RE, HAMADEH RM, SHOHET SB, GRIFFISS JM. Interaction between human natural anti- $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 1988; **56**: 1730–1737.
- [12] SPRINGER GF AND HORTON RE. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. *J Clin Invest* 1969; **48**: 1280–1291.
- [13] HAMADEH RM, GALILI U, ZHOU P, GRIFFISS JM. Anti- $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM in human secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; **2**: 125–131.

- [14] PARKER W, BRUNO D, HOLZKNECHT ZE, PLATT JL. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* 1994; **153**: 3791–3803.
- [15] YU PB, HOLZKNECHT ZE, BRUNO D, PARKER W, PLATT JL. Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies. *J Immunol* 1996; **157**: 5163–5168.
- [16] XU H, EDWARDS N, CHEN JM, DONG X, MICHLER RE. Age-related development of human anti-pig xenoantibody. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; **110**: 1023–1029.
- [17] GALILI U, BUEHLER J, SHOHET SB, MACHER BA. The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 1987; **16**: 693–704.
- [18] CASTRONOVO V, COLIN C, PARENT B, FOIDART JM, LAMBOTTE R, MAHIEU P. Possible role of human natural anti-Gal antibodies in the natural antitumor defense system. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 212–216.
- [19] GALILI U, MATTA KL. Inhibition of anti-Gal IgG binding to porcine endothelial cells by synthetic oligosaccharides. *Transplantation* 1996; **62**: 256–262.
- [20] YU PB, PARKER W, EVERETT ML, FOX IJ, PLATT JL. Immunochemical properties of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies after sensitization with xenogeneic tissues. *J Clin Immunol* 1999; **19**: 116–126.
- [21] OSMAN N, MCKENZIE IF, OSTENRIED K, IOANNOU YA, DESNICK RJ, SANDRIN MS. Combined transgenic expression of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal $\alpha$ (1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14677–14682.
- [22] FODOR WL, WILLIAMS BL, MATIS LA, MADRI JA, ROLLINS SA, KNIGHT JW, VELANDER W, SQUINTO SP. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11153–11157.
- [23] WELSH RM, O'DONNELL CL, REED DJ, ROTHER RP. Evaluation of the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses. *J Virol* 1998; **72**: 4650–4656.
- [24] AVILA JL, ROJAS M, GALILI U. Immunogenic Gal $\alpha$ 1-3Gal carbohydrate epitopes are present pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Immunol* 1989; **14**: 2828–2834.
- [25] GALILI U, FLECHNER I, KNYSZYNSKIA, DANOND, RACHMILEWITZ EA. The natural anti- $\alpha$ -galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *Br J Haematol* 1986; **62**: 317–324.
- [26] ALMEIDA IC, MILANI SR, GORIN, PA, TRAVASSOS, LR. Complement mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies. *J Immunol* 1991; **146**: 2394–2400.
- [27] GALILI U, CLARK MR, SHOHET SB. Excessive binding of natural anti- $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. *J Clin Invest* 1986; **77**: 27–33.
- [28] WINAND RJ, DEVIGNE JW, MEURISSE M, GALILI U. Specific stimulation of Graves' disease thyrocytes by the natural anti-Gal antibody from normal and autologous serum. *J Immunol* 1994; **153**: 1386–1395.
- [29] GALILI U. Evolution of  $\alpha$ 1,3galactosyltransferase and of the  $\alpha$ -Gal epitope. *Subcell Biochem* 1999; **32**: 1–23.
- [30] KRIVAN HC, CLARK GF, SMITH DF, WILKINS TD. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal(1-3Gal(1-4GlcNAc. *Infect Immun* 1986; **53**: 573–581.
- [31] JOZIASSE DH, SHAPER JH, SHAPER NL. The 1,3-galactosyltransferase gene. *Subcell Biochem* 1999; **32**: 25–48.

- [32] JOZIASSE DH, SHAPER JH, JABS EW, SHAPER NL. Characterization of an 1-3-galactosyl-transferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6991–6998.

*Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków*  
*e-mail: joannab@mol.uj.edu.pl*