

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

# ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (MHC)

### 3.1. Δομή MHC μορίων τάξης I

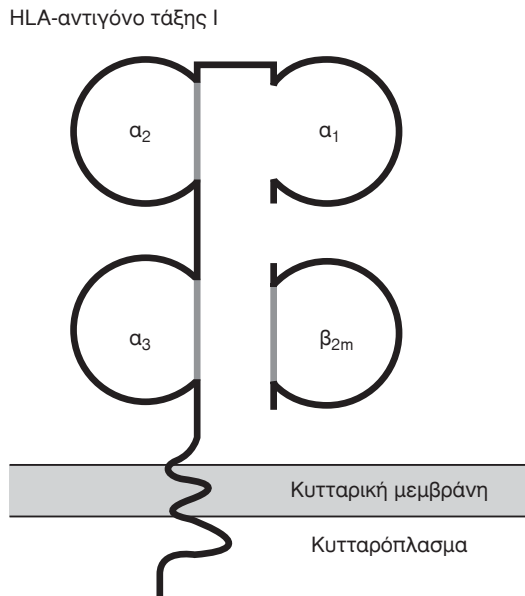
Οι δύο ξεχωριστές τάξεις μορίων του MHC που μπορούν να ανιχνευθούν στην επιφάνεια των κυττάρων διαφέρουν βιοχημικά με βάση τη δομή των υπομονάδων τους.

Τα μόρια της τάξης I του MHC (HLA-A, B και C αντιγόνα) βρίσκονται σ' όλα τα εμπύρηννα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Κυκλοφορούν στο πλάσμα και αποβάλλονται από τα ούρα. Τα σπερματοζωάρια έχουν μόνο έναν απλότυπο, ενώ στα ώριμα ερυθρά και στην τροφοβλάστη δεν υπάρχουν HLA αντιγόνα. Τα οστά, οι χόνδροι, τα νεύρα και ο κερατοειδής έχουν πολύ μικρή συγκέντρωση, σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα που έχουν τη μεγαλύτερη, γιατί και χρησιμοποιούνται σαν πηγή για τις διάφορες μελέτες των HLA-αντιγόνων (Schwartz, 1982).

Είναι γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούν το 1-2% των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης (Payne, 1977). Ανανεώνονται κάθε 6-8 ώρες. Κυκλοφορούν στο πλάσμα και αποβάλλονται από τα ούρα (Van Road και Van Leeuwen, 1974).

Τα HLA τάξης I μόρια αποτελούνται από δύο αλυσίδες, μια βαριά πολυπεπτιδική (α αλυσίδα), (MB 44.000 DL) που κωδικοποιείται από την HLA περιοχή και μια ελαφριά (MB 12000 DL) που είναι η β2-μικροσφαιρίνη, η οποία κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 15 και δεν εμφανίζει πολυμορφισμό. Οι δύο αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικό δεσμό. Χωρίς αυτή τη σύνδεση, το λειτουργικό τάξης I μόριο δεν είναι δυνατόν να εκφρασθεί στην κυτταρική επιφάνεια.

Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από 337 αμινοξέα και διαιρείται σε τρία τμήματα. Ένα εξωκυττάριο υδρόφιλο (αμινοξέα 1-281) ένα διαμεμβρανικό υδρόφοβο (αμινοξέα 282 έως 306) υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση του μορίου στη μεμβράνη και ένα ενδοκυττάριο (αμινοξέα 307-337) υδρόφιλο. Το εξωκυττάριο τμήμα διαιρείται σε τρεις περιοχές των 90,92 και 92 αμινοξέων, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως περιοχές α1, α2 και α3 και περιέχουν έναν εσωτερικό δισουλφιδικό δεσμό στις θέσεις 101-164, 203-259 των HLA τάξης I μορίων παρουσιάζεται στις α1 και α2 περιοχές, υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions. HVR). Οι N-τελικές α1 και α2 περιοχές παρουσιάζουν μεταξύ τους σημαντικό βαθμό ομοιότητα στις αλληλουχίες τους, ενώ η α3 εμφανίζει ομοιότητα



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση HLA-αντιγόνου I τάξης.

με τη β2 μικροσφαιρίνη αλλά και με τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών (Lopez de Castro 1989, Bjorkmom και Parham 1990) (Σχ. 1).

Οι λεπτομερείς δομές των HLA αντιγόνων έχουν καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Σύμφωνα μ' αυτήν οι δύο α-έλικες σχηματίζουν τα πλευρικά τοιχώματα μιας μακριάς και βαθιάς σχισμής, ο πυθμένας της οποίας αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια. Έτσι δημιουργείται μια σχισμοειδής θήκη, όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο για να παρουσιασθεί στο CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρο. Τα εσωτερικά τοιχώματα της κοιλότητας της σχισμοειδούς θήκης δεν είναι ομαλά, αλλά σχηματίζονται από μια σειρά κοιλωμάτων (Pockets). Το αντιγονικό πεπτίδιο εισέρχεται μέσα στη θήκη, όπου μία ή περισσότερες από τις πλευρικές του αλυσίδες προσαρμίζονται μέσα στα κοιλώματά της, διαμορφώνοντας έτσι ένα μοριακό σύμπλεγμα ικανό να ανιχνευθεί από τον T κυτταρικό υποδοχέα. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί έξι κοιλώματα, τα A, B, C, D, E και F, τα οποία εντοπίζονται στη συμβολή της β-πτυχωτής επιφάνειας με την α-έλικα (κοιλώματα B, C, D, E) ή μεταξύ δύο α-ελίκων (κοιλώματα A και F) (Bjorkman και συν. 1987, Saper και συν. 1991, Garboczi και συν. 1992, Madden και συν. 1992, Stern και συν. 1994, Garboczi και συν. 1994, Ghosh και συν. 1995, Madden και συν. 1995, Dessen και συν. 1997, Smith και συν. 1998).

Ο πολυμορφισμός της τάξης I μορίων εντοπίζεται κυρίως στα τοιχώματα και τον πυθμένα της σχισμοειδούς θήκης. Κάθε HLA τάξης I μόριο διαθέτει τη δική του ειδικότητα για σύνδεση με αντιγονικά πεπτίδια, η οποία καθορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων στα τοιχώματα και τον πυθμένα της θήκης. Έτσι κάθε HLA τάξης I μόριο είναι δυνατόν να συνδεθεί με μεγάλο φάσμα πεπτιδίων, καθότι η σύνδεση αυτή δεν είναι τόσο ειδική, όσο αυτή των αντιγόνων από τα αντισώματα (Δανηλίδης, 1999).

### 3.2. Δομή MHC μορίων τάξης II

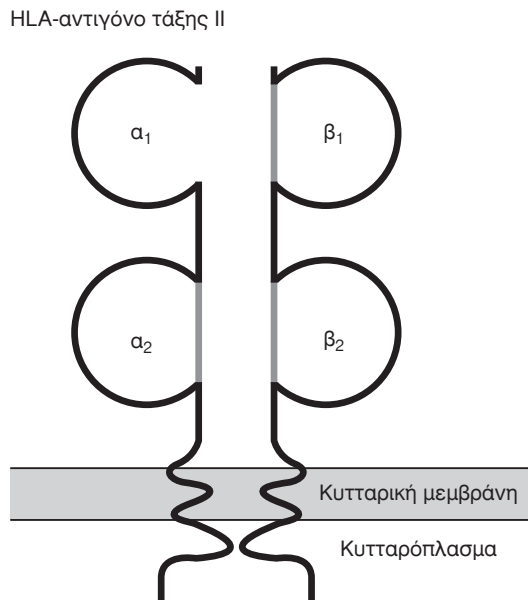
Τα HLA-αντιγόνα της IIης τάξης (HLA-D, DR, DQ, DP) και τα γονίδια ανοσιακής απάντησης (Ir-genes) υπάρχουν στα μακροφάγα, μονοκύτταρα, επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, σπερματοζωάρια, ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και γενικώς σε όλα τα κύτταρα που “παρουσιάζουν αντιγόνα” (Antigens Presenting Cells). Είναι γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούνται από δύο αλυσίδες, μια βαριά μοριακού βάρους 34.000 DL (α

άλυσσο) και μια ελαφριά  $\beta$  με μοριακό βάρος 29000 DL. Κάθε αλυσίδα περιλαμβάνει 230 αμινοξέα και αποτελείται από ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυττάριο τμήμα (Van Rood 1982, Schwartz 1984, Thorsby 1983).

Το εξωκυττάριο τμήμα της  $\alpha'$  αλυσίδας αποτελείται από δύο τμήματα  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  με 85 και 93 αμινοξέα αντίστοιχα. Το διαμεμβρανικό από 23 αμινοξέα και το ενδοκυττάριο από 15 αμινοξέα. Το εξωκυττάριο τμήμα της  $\beta'$  αλυσίδας επίσης αποτελείται από δύο τμήματα  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  με 91 και 100 αμινοξέα περίπου το καθένα. Ανακαλύφθηκε και ένα τρίτο τμήμα  $\beta_3$  της  $\beta'$  αλυσίδας, το οποίο δεν εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια (Thorsby 1983, Schwartz 1984, Giles και Capra 1985) (Σχ. 2).

Στα HLA-αντιγόνα II τάξης ο πολυμορφισμός επικεντρώνεται στις περιοχές μακριά από την κυτταρική μεμβράνη, στην  $\alpha_1$  για τα DQ και DP, και στη  $\beta_1$  για τα DR, DQ και DP. Ο πολυμορφισμός των DR αλληλίων εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές 9-13, 27-33 και 67-74 περιοχές, οι οποίες αποτελούν και τους στόχους των διαφόρων μεθόδων τυποποίησης με τις νεότερες μοριακές τεχνικές (Bodmer και Bodmer 1984, Wood 1990).

Στην επιφάνεια του κυττάρου τα αντιγόνα II τάξης αποτελούνται



Σχήμα 2. Σχηματική παράσταση HLA-αντιγόνου II τάξης.

από τις  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες, οι οποίες στο εσωτερικό συνδέονται προσωρινά με μια τρίτη αλυσίδα τη  $\gamma$  ή  $It$ . Μετά τη σύνθεσή τους στα ριβοσώματα οι τρεις αλυσίδες ενώνονται αμέσως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρονται σαν σύμπλεγμα στη συσκευή Golgi όπου η  $\gamma$  αποχωρίζεται από τις  $\alpha$  και  $\beta$  που μόνες τους φτάνουν στην επιφάνεια. Η ανάλυση του DNA απέδειξε ότι από τις τέσσερις εξωτερικές περιοχές οι  $\alpha 3$  και  $\beta 2$  μικροσφαιρίνη για τα τάξης I μόρια και οι  $\alpha 2$  και  $\beta 2$  περιοχές για τα τάξης II είναι όμοιες με τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών και ότι αντιστοιχούν δισουλφιδικές γέφυρες στις τρεις από τις τέσσερις εξωκυττάρια περιοχές.

Με την κρυσταλλογράφηση μελετήθηκε η τρισδιάστατη δομή των HLA-IIης τάξης. Σύμφωνα μ' αυτή οι  $\alpha 1$  και  $\beta 1$  περιοχές είναι όμοιες με τις  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  των τάξης I, σχηματίζοντας μια σχισμή όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την κρυσταλλογράφηση του HLA-DR1 αντιγόνου. Και στις δύο τάξεις των HLA αντιγόνων, οι απομακρυσμένες από τη μεμβράνη περιοχές, οι περιοχές  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  της τάξης I και οι  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  της τάξης II συμπλέκονται μαζί για να σχηματίσουν μια μακριά αύλακα. Οι παραμένουσες εξωκυττάρια περιοχές αναπτύσσουν μία δομή όμοια περιοχής ανοσοσφαιρίνης. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των δύο τάξεων των MHC μορίων η  $\alpha 3$  περιοχή της τάξης I αντιστοιχεί στη  $\beta 2$  περιοχή της τάξης II και η  $\beta 2$  μικροσφαιρίνη αντιστοιχεί στη θέση της  $\alpha 2$  περιοχής της τάξης II. Επίσης αποδείχτηκε ότι οι πολυμορφικές θέσεις της  $\beta$  αλυσίδας των HLA-DR, στην τριτοταγή δομή του μορίου, εντοπίζονται στα τοιχώματα και τον πυθμένα της σχισμής. Ο πολυμορφισμός των HLA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της θέσης σύνδεσης με το αντιγονικό πεπτίδιο, καθότι καθορίζει την ειδικότητα της σύνδεσης (Brown και συν. 1993). Οι παράγοντες του συμπληρώματος C2, C4 και BF που οι γονιδιακές τους θέσεις βρίσκονται μεταξύ των θέσεων των αντιγόνων της Iης και IIης τάξης αποτελούν τα αντιγόνα IIIης τάξης.

### **3.3. Αντιγονική σύνδεση των μορίων τάξης I και τάξης II του MHC**

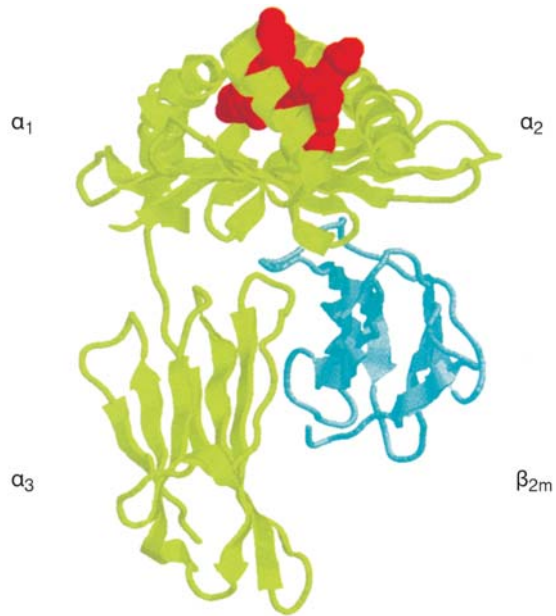
Ενώ οι συνολικές δομές των μορίων τάξης I και τάξης II είναι παρόμοιες, υπάρχει ένας αριθμός μικρών διαφορών που έχουν σημαντική

επίδραση στον τρόπο με τον οποίο αυτά τα μόρια αλληλεπιδρούν με τα πεπτιδικά αντιγόνα.

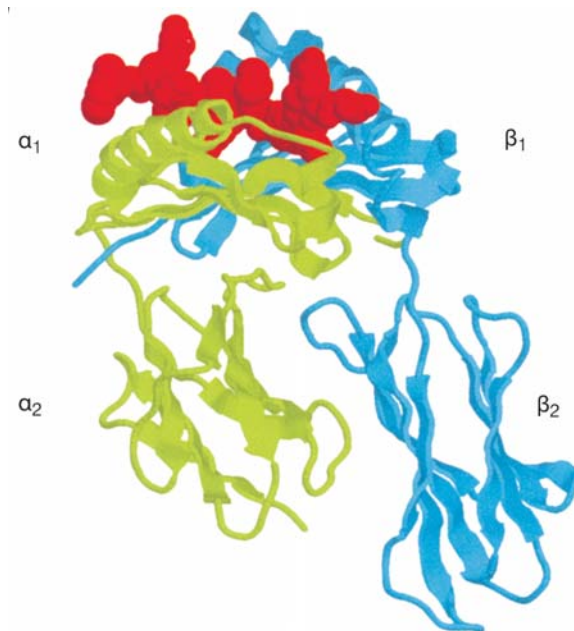
Τα αντιγόνα που συνδέονται με τα μόρια της τάξης I και της τάξης II του MHC υπάρχουν με τη μορφή σχετικά μικρών πεπτιδικών τμημάτων. Και στις δύο περιπτώσεις εφαρμόζεται η ίδια γενική αρχή, παρόλο που οι μικρές λεπτομέρειες του τρόπου σύνδεσης των πεπτιδίων διαφέρουν μεταξύ των δύο τάξεων των μορίων (Madden 1995). Τα MHC μόρια συνδέονται με τα πεπτίδια αρχικά μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ σταθερών υπολειμμάτων στο MHC μόριο και του κεντρικού τμήματος (backbone) του πεπτιδίου. Επιπρόσθετα αυτών των αλληλεπιδράσεων που είναι ανεξάρτητες της αλληλουχίας του συνδεδόμενου πεπτιδίου, οι πλευρικές αλυσίδες του πεπτιδίου ενώνονται σε ειδικές εσοχές (Pockets) που κατανέμονται κατά μήκος της σχισμής σύνδεσης του πεπτιδίου (peptide-binding cleft). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επιτρέπουν στα μόρια του MHC το διαχωρισμό των πεπτιδίων, συνδέοντας κάποια, αλλά αποκλείοντας κάποια άλλα.

Στην περίπτωση των μορίων τάξης I του MHC, τα πεπτίδια που συνδέονται είναι κατά κύριο λόγο μικρά, συνήθως οκταμερή και εννιαμερή, παρόλο που μπορούν να συνδεθούν και μακρύτερα πεπτίδια. Το πεπτίδιο συνδέεται και με τα δύο άκρα του, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του MHC μορίου και του N- και C- τελικού άκρου του πεπτιδίου (Matsumura και συν. 1992). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι ουσιαστικές για την ικανότητα του μορίου της τάξης I να συνδέσει το πεπτίδιο. Ανάλογα των αντιγονικών πεπτιδίων με τροποποιημένες τις αμινο- και καρβοξυ-τελικές μονάδες αποτυγχάνουν να σχηματίσουν σταθερά συμπλέγματα με τα MHC μόρια τάξης I (Bouvier και Wiley 1994, Collins και συν. 1994, Bouvieur και συν. 1998). Επιπρόσθετα των τελικών και κεντρικών αλληλεπιδράσεων, που θα είναι ίδιες ανεξάρτητα του πεπτιδίου που συνδέεται, τα μόρια του MHC αλληλεπιδρούν επίσης με τις πλευρικές αλυσίδες του πεπτιδίου και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι αυτές οι αλληλεπιδράσεις που δίνουν στα διαφορετικά MHC μόρια τις διαφορετικές ειδικότητες (Garrett και συν. 1989, Matsumura και συν. 1992, Young και συν. 1994, Strominger και Wiley 1995) (Σχ. 3).

Η σύνδεση του πεπτιδίου με τα μόρια της τάξης II διαφέρει από πολλές απόψεις από τη σύνδεση με την τάξη I. Η πιο προφανής διαφορά είναι το μήκος των πεπτιδίων που συνδέονται (Chicz και συν. 1992). Η



*Σχήμα 3. Κρυσταλλογράφηση HLA-αντιγόνου τάξης I σε σχέση με πεπτίδιο.*



*Σχήμα 4. Κρυσταλλογράφηση HLA-αντιγόνου τάξης II σε σχέση με πεπτίδιο.*

πλειονότητα των πεπτιδίων που συνδέονται με τα μόρια της τάξης II είναι μεγαλύτερα από 13 αμινοξέα σε μήκος και δεν υπάρχει, κατ' αρχάς, ανώτερο όριο για το μήκος του πεπτιδίου που μπορεί να συνδεθεί, με την προϋπόθεση, ότι το τμήμα του πεπτιδίου που αλληλεπιδρά με το μόριο της τάξης II είναι και "ξειδιπωμένο" και προσιτό. Αυτό το χαρακτηριστικό απορρέει από δύο σημαντικές διαφορές στη δομή της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου με το μόριο της τάξης II σε σύγκριση με αυτή των μορίων της τάξης I (Stern και συν. 1994, Strominger και Wiley 1995). Αντί το αμινοτελικό τμήμα του πεπτιδίου να εισέρχεται μέσα στη σχισμή, στα μόρια της τάξης II μια εκτεταμένη περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σχηματίζει ένα μικρό κομμάτι παράλληλου β στρώματος (sheet) με ένα τμήμα του κεντρικού τμήματος του πεπτιδίου της τάξης II. Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί την έλξη προς τα πάνω του πεπτιδίου και επιτρέπει στο αμινοτελικό του άκρο να επεκτείνεται πέρα από το τέλος της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου. Στο καρβοξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου, αντί το πεπτίδιο να έλκεται προς τα πάνω, το άκρο της α1 περιοχής έλκεται προς τα κάτω από την κοντινή προς τη μεμβράνη α2 περιοχή. Αυτό επιτρέπει στο τελικό άκρο του πεπτιδίου να προεξέχει πέρα από το τέλος της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου. Τα πεπτίδια αλληλεπιδρούν με τα MHC μόρια τάξης II κατά το μήκος τους (Stern και συν. 1994) (Σχ. 4).

Όπως και με τα μόρια της τάξης I, οι πλευρικές αλυσίδες του πεπτιδίου αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες εσοχές στα μόρια τάξης II. Καθώς τα πεπτίδια που συνδέονται με τα μόρια τάξης II επεκτείνονται σε διάφορα μήκη και στα δύο άκρα της αύλακας, είναι εύκολο να οριστεί μια ενιαία ονοματολογία για τις πεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες που αλληλεπιδρούν με το μόριο τάξης II. Τα T-κύτταρα μπορούν να διακρίνουν τα συμπλέγματα τάξης II-πεπτιδίου περισσότερο με βάση την αλληλουχία του πεπτιδίου και λιγότερο με βάση τη διαμόρφωσή του.