

## Imunopredočavanje antigena limfocitima T u pokretanju imunskog odgovora

Zdenko Kovač

Zavod za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u  
Zagrebu, KBC Rebro

Izvorni znanstveni rad

UDK 616-005.9-097

Prispjelo: 25. svibnja 1989.

**Pokretanje imunskog odgovora limfocita T strane antigenom, predstavlja niz staničnih i molekularnih interakcija. Prvi korak u pokretanju imunskog reakcije je prerada strane molekule u imunopredočnim stanicama domaćina. Noviji pokusi su otkrili biokemijske detalje prerade antigena u imunopredočnim stanicama. Iako su većim dijelom rezultati dobiveni posrednim metodama stanične i molekularne analize, pokusi čvrsto ukazuju da su otkrivanje epitopa antigena i/ili povećano usjedanje u lipofilni medij membrane osnovni biokemijski zahtjevi u obradi antigena. Preradena molekula se potom veže na molekulu glavnog kompleksa tkivne snošljivosti (GSTS), koja time djeluje kao površinski stanični receptor. Molekule i**

**prvog i drugog razreda GSTS se ponašaju kao receptori za prerađene antigene. Stvaranje imunogeničnih kompleksa između antigenskih peptida i molekula tkivne snošljivosti događa se prije njihova prepoznavanja od strane limfocita T. To dvojno istodobno prepoznavanje receptorom osnova je fenomenologije GSTS-spregnutosti imunskog odgovora limfocita T. Također, vezivanje ili odsutnost vezivanja novonastalih peptida predstavlja jednu od razina funkcije gena imunskog odgovora (Ir-geni). Stoga su imunobiološki fenomeni sprengnutosti i Ir-genske funkcije prodiskutirani u svjetlu novih spoznaja o preradi i imunopredočavanju antigena.**

**Ključne riječi:** antigen, imunopredočavanje, limfocit T

Antigen po ulasku u organizam pokreće specifični imunski odgovor domaćina, koji, kada ostvari puni fiziološki izražaj, selektivno odstranjuje isti antigen iz organizma. Imunosni sustav organizma je istodobno tolerantan na vlastite molekule. Mehanizmi razlučivanja vlastitih od stranih molekula predstavljaju vrlo složenu biološku fenomenologiju, čije zakonitosti danas poznajemo samo djelomično. Osnovu imunskog odgovora čini niz staničnih i molekularnih interakcija, koje dovode do koordiniranog izražaja određenih gena u genomu. Genski izražaj i stanične interakcije su strogo uzajamno regulirane. Komunikacije između stanica ostvaruju se preko membranskih receptora, koji, vezivanjem sebi komplementarnog liganda, pokreću niz biokemijskih puteva u citoplazmi. Utjecaj kalcija u citoplazmu, aktivacija proteinske kinaze C, izmjena fosfoinozitolnog kruga i povišenje aktivnosti fosfataze<sup>47</sup> su mjerljive posljedice receptorske aktivacije. Te promjene pokreću u stanici izražaj nekih gena u genomu, kao gena za IL-4, IL-2, gama interferon, gena za receptore tih interleukina, onkogene, kao *c-fos* i *c-myc* i druge. Sve te promjene unutar stanice mogu rezultirati njihovom diferencijacijom i diobom, ili/i tolerancijom primljenog signala. Završni učinak na imunski sustav ovisi o kakvoći i količini signala.<sup>56</sup>

Pokrenuti imunski odgovor stvara potentni izvršni krak reakcije u obliku visokoafinitetnih protutijela, specifičnih citotoksičnih limfocita T i/ili drugih aktiviranih stanica, koje obavljaju svoju funkciju izlučivanjem efektornih limfokina. Svi oni efektivno razlučuju i odstranjuju stranu molekulu i time konzerviraju biokemijski unutarnji okoliš domaćina. Is-

to tako, stanica domaćina, zaražena unutarstaničnim parazitom, izaziva imunski odgovor domaćina i svoje odstranjenje iz organizma. Razlučivanje stranog od vlastitog je jedinstven homeostatski biološki mehanizam, koji je određen kako ontogenijom imunskog sustava tako i biokemijskom strukturom molekule antigena. Razlika u jednoj ili dvije aminokiseline u slijedu bjelančevine je dovoljna strukturna promjena koju limfociti T zamjećuju kao stranu i protiv takvog epitopa razvijaju jak imunski odgovor.<sup>7,57</sup> Primjerice, čovječji imunski sustav reagira na molekulu govedskog insulina kao stranu, iako je strukturna razlika prema humanom insulinu u samo dvije aminokiseline. Naime, umjesto treonina i izoleucina na pozicijama 8 i 10 alfa lanca supstituirani su alanin odnosno valin, što u nekih dijabetičkih bolesnika izaziva imunootpornost na govedski inzulin.<sup>14</sup> Tako visoka sposobnost razlučivanja osigurava i odstranjenje vlastitih promijenjenih stanica i molekula koje se pojavljuju kao posljedica mutacija/ili krupnijih induciranih promjena u strukturi makromolekula.<sup>34</sup> Time imunološki sustav obavlja stalni nadzor »svojih« stanica u organizmu. Upravo zbog tako visokog razlučivanja minimalnih strukturnih razlika razvijaju se reakcije odbacivanja pri transplantaciji čak vrlo srodnih presađaka, što je osnovna biološka zapreka presađivanju tkiva.<sup>37</sup>

Postoji izrazita razlika u mehanizmu prepoznavanja antigena između limfocita B i limfocita T.<sup>37,58</sup> Limfociti B prepoznaju nepromijenjeni antigen pomoću komplementarnog imunoglobulinskog receptora u svojoj membrani. Za njih je antigen neposredni ligand. Limfociti T svojim receptorom prepoznaju

imunogenični kompleks sastavljen od dva liganda: prerađenog stranog antigena i vlastite molekule glavnog sustava tkivne snosljivosti (GSTS) na membrani susjedne stanice.<sup>38</sup> Taj fenomen dvojnog istodobnog prepoznavanja naziva se GSTS-spregnutost (MHC-restriction, u engleskoj literaturi) prepoznavanja limfocita T. Stanice koje predočavaju antigen limfocitima T, nazivaju se imunopredodne stanice (Antigen Presenting Cells, APC, u engleskoj literaturi). Raznovrsni tkivni makrofagi, limfociti B i fibroblasti su histološki tipovi imunopredodnih stanica. Potencijalno i epiteloide stanice timusa mogu imunopredočavati antigen.<sup>43</sup> U posebnim eksperimentalnim i potencijalno patofiziološkim uvjetima neke druge stanice mogu obavljati imunopredodnu funkciju.<sup>15</sup> Pored interakcije receptora s imunogeničnim kompleksom, koja određuje specifičnost prepoznavanja, u aktivaciji limfocita T sudjeluju dodatno tri para molekula.<sup>10</sup> LFA-1 i ICAM-1; CD4, CD8 i monomorfni dio molekule GSTS; te CD2 i LFA-3, funkcioniraju kao ligandni receptor parovi, koji paralelno s GSTS-antigen sprengnutim receptorskim prepoznavanjem limfocita T čine molekularni polivalentni most između limfocita T i imunopredodnih stanica. Njihovi međusobni afiniteti pridonose sveukupnoj avidnosti međustaničnog prepoznavanja. Stvaranje takvog višemolekularnog mosta predstavlja za limfocite T biokemijski signal aktivacije. Izvanjskim dodavanjem protutijela protiv jedne molekule u paru može se zakočiti aktivacija limfocita T.<sup>6,23</sup> GSTS-spregnutost prepoznavanja antigena je odlika i regulatornih (pomoćnički i amplifikatorni) i izvršnih limfocita T.<sup>37,38</sup>

Kritične antigenične determinante na molekuli antigena nazivaju se epitopi. Oni predstavljaju diskretne topološke regije u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi antigena.<sup>7,32</sup> Minimalni peptidi koji još djeluju antigenično, to jest, oblikuju očekivani epitop promatranog antigena, su veličine sedam do jedanaest aminokiselina.<sup>18,72</sup> Iako kratki peptidi, te molekule stvaraju sekundarne konformacije, kao alfa uzvojnice i beta strukture. Oni redovito posjeduju amfifilna biofizička svojstva.<sup>7,8</sup> Diskretna topološka regija peptida služi kao ligandno mjesto za vezivanje na GSTS i naziva se agretop. Druga distinktna regija istog peptida (epitop) se veže na komplementarni dio receptora limfocita T (paratop). Budući da strana molekula u organizmu podliježe kataboličkim procesima u stanicama domaćina, pokretanje imunogenog odgovora nije samo protiv nascentne molekule antigena, kao u slučaju limfocita B. Naprotiv, strani antigen, da bi djelovao imunogenično za limfocite T, mora proći obradu antigena u stanicama domaćina (Antigen Processing Step, u engleskoj literaturi). Tim postupcima antigen bude preuđen za njegovu indukciju specifičnog klona limfocita T. Predmet ovog preglednog članka je obrada antigena u stanicama domaćina, koja se događa nezavisno o prisutnosti limfocita T, a koja je preduvjet pokretanja imunogenog odgovora. Antigenična molekula se razgrađuje na imunogenične peptide, koji se potom vežu na molekule GSTS. Afinitet vezivanja je manji od 100  $\mu\text{M}$ . Nastali molekularni kompleks služi kao ligand za receptor specifičnog klona limfocita T i time djeluje imunogenično. Otkriće molekularne razine imunopredočavanja antigena donijelo je definitivno razjašnjenje fenomena GSTS-spregnutosti prepoznavanja limfocita T. Oni također razjašnjavaju molekularnu razinu jednog dijela gena imunogenog odgovora. Neposrednim selektivnim vezivanjem antigenog peptida

na pojedini alomorf molekule GSTS dokazana je teorija selekcije antigenskih determinanata na razini imunopredočavanja. Vezivanje ili odsutnost vezivanja na pojedini alomorf određuje status reaktivnosti odnosno nereaktivnosti soja prema tom antigenu. Stoga su fenomeni imunospregnuća i funkcija gena imunogenog odgovora ukratko raspravljani u svjetlu molekularnih spoznaja o obradi i imunopredočavanju antigena u domaćinu.

Repertoar limfocita T nastaje u ontogeniji jedinke kao zbirni rezultat dviju sila, pozitivne selekcije klonova na molekularna GSTS epitelnih stanica timusa i istodobno negativnom selekcijom autoreaktivnih klonova uklanjaju se nepoželjni samorazorni klonovi.<sup>59,64</sup> Imunopredočavanje peptida-derivata vlastitih molekula može imati presudnu ulogu u oblikovanju reaktivnosti organizma prema stranim molekulama. Razvitak snosljivosti vlastitih molekula u vrijeme ontogenije limfocita T zahtijeva također imunopredočavanje antigenskih determinanata vlastitih proteina i drugih molekula. Budući da su samo fragmentarno poznati stanični i molekularni mehanizmi pri oblikovanju repertoara, analiza zakonitosti tih diferencijacijskih fenomena bi prešla okvire ovog teksta. Stoga je potrebno samo naglasiti da pored uloge u aktiviranju zrelih limfocita T, imunopredočavanje ima važnost i u oblikovanju repertoara, čime ono postaje važno i za razvojnu biologiju.

#### IMUNOPREDOČNE STANICE PRERAĐUJU ANTIGEN

Vrlo je temeljito dokazana funkcija imunopredodnih stanica u pokretanju odgovora limfocita T.<sup>52</sup> Rano je stvoren koncept imunopredočavanja kao nezabilaznog preduvjeta, koji se u organizmu događa prije stimulacije limfocita T.<sup>67</sup> Međutim, taj koncept je tek novijim otkrićima o preradi antigena u imunopredodnim stanicama dobio svoju molekularnu osnovu i time je općeprihvaćen kao važan biološki fenomen.<sup>38</sup> Imunopredočavanje se sastoji od slijedećih staničnih funkcija: prihvaćanje stranog antigena, endocitoza, strukturna promjena molekule, kemijsko vezivanje novonastalih peptida na molekule GSTS, čime se stvara imunogenični kompleks, izlaganje imunogeničnih kompleksa na staničnu površinu i, konačno, prepoznavanje tog kompleksa receptorom limfocita T. Eksperimentalni dokazi za te procese dolaze iz različitih vrsta pokusa. Denaturirani oblici antigena su podjednako imunogenični kao nativna molekula u testu odložene preosjetljivosti.<sup>29</sup> Nakon ulaska u stanicu zbog njegove unutarstanične sekvencije, antigen je otporan na protelitičku razgradnju enzima u mediju izvan stanice.<sup>60</sup> Budući da su novonastali peptidi različiti od ishodne molekule, protu-antigen protutijela su bez blokadnog učinka na proliferaciju limfocita T. Blokada se postiže samo u slučaju upotrebe protutijela koja prepoznaju prerađeni antigen sa dovoljno visokim afinitetom,<sup>25</sup> ili obradom imunopredodnih stanica enzimom koji djeluje protiv izloženog peptida.<sup>68</sup> Molekule drugog razreda GSTS kruže preko stanične površine u unutarstanične membranske strukture i nazad putem zajedničkih endocitoznih i egzocitoznih mehanizama.<sup>24</sup> Selektivni inhibitor serinskih i tiolnih esteraza, *leupeptin*<sup>63</sup> koji prerađuje mioglobina u imunopredodnim stanicama pri milimolarnim koncentracijama. Grupno specifični inhibitor cisteinske proteinaze koči proteolit-

sku razgradnju sintetskog antigena dinitro-fenil-L-lizina.<sup>19</sup> Takva upotreba zakočnih tvari enzima ukazuje na njihovu ulogu u preradi antigena, koja međutim, može biti posredna. Prerada antigena se može također zakočiti obradom imunopredočnih stanica paraformaldehidom i glutaraldehidom prije njihova kontakta sa antigenom.<sup>69</sup> Takva obrada ne otklanja imunopredočavanje već prerađenog antigena kao peptida.<sup>39,61,62</sup> Imunosupresivni lijek *ciklosporin A*, izaziva sličan učinak na imunopredočnu funkciju makrofaga.<sup>50</sup> Kinetički pokusi s antigenom, bakterijom *Listeria Monocytogenes*, ukazali su da se bakterija kao strani antigen ponaša kao vodotopive molekule.<sup>73</sup> Da bi djelovala imunogenično bakterija se mora fagocitirati i preraditi u makrofagu, što traje 30 do 60 minuta. Tu preradu može zakočiti *klorokvin* koji povišenjem pH unutarstaničnih odjeljaka smanjuje aktivnost hidrolaza. Iz toga se naslućuje da su ti enzimi u funkciji prerade stranih antigena. Za antibiotik, *cerulenin*, koji je inhibitor sinteze lipida, sterola i lipidnog preinačenja proteina, dokazano je da koči i obradu antigena u imunopredočnim stanicama.<sup>26</sup> Iako je nepoznata točna molekulska razina tog učinka, naslućuje se da pored proteolize potencijalno postoje i drugi biokemijski putevi koji određuju obradu antigena u imunopredočnim stanicama.

Razvikom novih bioloških metoda istraživanja omogućena je neposrednija analiza strukturnih promjena antigena u imunopredočnim stanicama. U **tablici 1.** sabrani su noviji eksperimentalni podaci o preradi antigena. Kritična promjena antigenične molekule kojom ona postaje antigenična i imunogenična za limfocite T, jest sterična promjena u tercijskim odnosima u strukturi molekule. Takvom strukturnom promjenom izlažu se na molekulsku površinu epitopi, koji su inače okrenuti prema unutrašnjosti molekule, zbog svojih lokalnih, unutarmolekulskih elektrostatskih i van der Waalsovih sila. Preradena molekula termodinamski lakše usjeda u lipidni dvosloj membrane. Otvaranjem molekule pokazuju se nove antigenične determinante, preko kojih antigen interagira s molekulama GSTS, staničnom membranom makrofaga i receptorom limfocita T.<sup>62</sup> Denaturacijom nekih antigena postižu se rečeni strukturni učinci.<sup>6</sup> Pokusi s molekulom citokroma c, kao antigenom, jasno podržavaju taj koncept.<sup>39</sup> Antigeni funkcijско-strukturni odnos je detaljno istražen za molekulu citokroma c goluba u mišjem eksperimentalnom modelu.<sup>38,58</sup> Upotrebom sintetskih analoga sa izoliranim zamjenama pojedinih aminokiselina u epitopnom području antigena, lizin 99 karboksikraja molekule je identificiran kao dominantni epitop. Postranični lanac tog lizina je ligand za receptor specifičnog klona limfocita T.<sup>39,58</sup> Lizin 99 u prirodnoj konformaciji molekule dolazi u neposredni kontakt i veže se svojim postraničnim aminokrajem na postranični karboksikraj glutaminske kiseline na poziciji 61. Tako stvoreni elektrostatski most služi za stabilizaciju strukture molekule citokroma c. Naime, i lizin 99 i glutaminska kiselina 61 su filogenetski sačuvani (ne variraju) na tim mjestima, čak u vrlo udaljenim vrstama, što navodi na zaključak o važnosti tog mosta za funkciju molekule.<sup>39</sup> Budući da je lizin 99 dominantni epitop molekule, postaje jasno zašto je potrebna prerada citokroma c. Otvaranjem elektrostatskog mosta, postranični lanac lizina 99 postaje slobodan i može se vezati na receptor limfocita T, čime se pokreće njegova aktivacija. Bilo koja promjena u strukturi citokroma c, koja oslobađa ε-amino grupu

**TABLICA 1.**  
**STRUKTURNE PROMJENE ANTIGENA KAO MOLEKULSKA OSNOVA ANTIGENSKE PRERADE U IMUNOPREDOČNIM STANICAMA**

**TABLE 1.**  
**STRUCTURAL CHANGES OF ANTIGENS AS A MOLECULAR BASIS OF ANTIGEN PROCESSING IN ANTIGEN PRESENTING CELLS**

Antigen	Strukturna promjena koja proizvodi imunogeničnost	Literaturni izvor
Antigen	Structural change causing immunogenity	Literature source
Ovalbumin*	— denaturacija molekule	61, 62
Ovalbumin*	— molecular denaturation	
Inzulin #	— otvaranje petlje u α-lancu oksidacijom 7–11 disulfidnog veza	49
Insulin #	— opening of the loop in the α-chain by the oxydation of 7–11 disulphide bound	
Citokrom c	— kidanje elektrostatskog veza između Glu 61 i Liz 99, što omogućava vezivanje epitopa (lizina 99) na paratop receptora limfocita T	39
Cytochrome c	— breaking of electrostatic bond bet Glu 61 and Liz 99, which enables the binding of the epitope (lisine 99) to paratope receptor of T-lymphocyte	
Mioglobin	— denaturacija molekula	63
Myoglobine	— molecular denaturation	
Lizozim	— denaturacija molekule.	2
bjelanjka jajeta	Epitop je hidrofilan, te stoga mora imati pridružen hidrofobni dio da bi usjedao u membranu stanice	
Albumen lysosim	— molecular denaturation. The epitope is hydrophilous and therefore requiring a joined hydrophobic part for partition into the cell membrane	
Inzulin #	— preradeni antigen je pogodniji za usjedanje u membranu	27, 28
ovalbumin*		
Insulin #	— processed antigen is more snitable for partition into the membrane	
ovalbumin*		
Angiotenzin III	— bez strukturnih promjena	20
Angiothensin III	— no structural changes	

\* # Primjenom drugačije metode citirani radovi otkrivaju različite molekulske zahtjeve obrade istih antigena.

\* # In case different methods are applied, the cited references reveal different molecular requirements for processing of the same antigens.

lizina 99, a istodobno sačuva strukturu epitopa, praktički proizvodi imunogenični oblik molekule. Nekoliko tastiranih promjena u ovom radu dalo je očekivani sukladni odgovor.<sup>38,39</sup> Nedostupnost lizinskog postraničnog lanca na poziciji 99 u nativnoj molekuli je, dakle, osnovni molekulski razlog zbog kojega se citokrom c preraduje u imunopredočnim stanicama u pokretanju imunskog odgovora. Neposrednim mjerenjem afiniteta vezivanja antigena kao peptida ove molekule na molekulu II razreda GSTS, pokazan je identičan zahtjev.<sup>21</sup>

Pokusi opisani u radovima 2, 27 i 28 ukazuju na drugačiji zahtjev u preradi antigena. Antigen obradom stječe biofizička svojstva koja mu omogućavaju

usjedanje u dvosloj membrane. To usjedanje molekule u membranu smatra se nezaobilaznim krakom u predočavanju antigena. Potrebna amfifilnost molekule može se postići dodavanjem slijeda nepolarnih aminokiselina na antigen.<sup>2</sup> Slični učinak na usjedanje u membranu postiže se obradom membrane fosfolipazama.<sup>27,28</sup> Iako rezultati pokusa na to nedvojbeno upućuju, teško je ovaj koncept utkati u opću sliku o predočavanju antigena. Naime, novonastali antigenični peptidi kemijski se vežu na molekule GSTS, koje strše iz lipidnog dvosloja svojim izvanstaničnim domenama. Mjesto za vezivanje antigena, desetop, na molekuli GSTS nalazi se u brazdi na istaknutoj površini molekule, te bi stoga to mjesto bilo manje dostupno za peptide ukotvljene u membranu. Moguće je da gornji zahtjev za udjeljivanjem doprinosi kinetici vezivanja, budući da svojim usadivanjem u membranu antigen smanjuje prostornu difuziju i kreće se dvodimenzijski po membrani. To bi teorijski moglo pospješiti vezivanje antigena na desetop molekule GSTS. Tu pretpostavku nije moguće neposredno testirati današnjim metodama molekulske i stanične analize.

Svi radovi na koje se poziva tablica 1. suglasni su da nije potrebno skraćivanje molekule. Dužina molekule peptidnog lanca nije čimbenik ograničenja u predočavanju antigena. Zahtjevi za obradom antigena je sterična promjena strukture koja dovodi do pojačanog udjeljivanja u membranu, ili/i izlaganja skrivenih kritičkih epitopa molekule, ili oba učinka istodobno. Međutim, za očekivati bi bilo da neka prirodna peptidna molekula zadovoljava rečene zahtjeve u svojem nativnom obliku, da stoga ne podliježe procesima obrade u imunopredočavanju. Nonapeptid angiotenzin-III je takva molekula.<sup>20</sup> Imunopredočne stanice predočavaju ljudski angiotenzin-III klonu specifičnih stanica bez prethodne obrade. Ta činjenica podupire gornje pretpostavke o gornjim zahtjevima u imunopredočavanju antigena.

Međutim, ti postulati su građeni na posrednim eksperimentalnim pristupima staničnim i molekulskim procesima. Stoga, stvarna priroda obrade i predočavanja antigena nije dokazana. Moguće je pretpostaviti i druge puteve i procesne zahtjeve u obradi antigena, koje primijenjeni pokusni modeli ne zamjećuju. U radu 26 je opisan sasvim novi biokemijski slijed koji utječe na imunopredočavanje antigena. Konačna slika o antigenskoj preradi na molekulskoj razini unutarstaničnih procesa ostaje neizvjesna, budući da je takav analitički zahtjev izvan granica primijenjenih eksperimentalnih metoda. Upotrebom proteliznih inhibitora lizosomskih i nelizosomskih puteva proteinske unutarstanične razgradnje u modelu štakorskog hepatocita, utvrđeno je da i jedni i drugi mogu zakočiti razgradnju endogenih proteina,<sup>31</sup> što ukazuje na razgranatost unutarstaničnih kataboličkih puteva. Ostaje da se ispita da li i izvanjske bjelančevine, antigeni, prolaze slične, paralelne puteve razgradnje, ili je njihov katabolizam usmjeren.

Do potpuno oprečnih zaključaka je dovela izolirana grupa pokusa<sup>70</sup> upotrebom posebnog eksperimentalnog modela. Autori opisuju aktivaciju limfocita T bez sudjelovanja imunopredočnih stanica. Imunopredočne stanice su zamijenjene umjetno proizvedenim liposomima. Nativni antigen kemijski vezan za lipide u liposomu u koje su dodane molekule drugog razreda GSTS, stvaraju imunogenične komplekse koji mogu stimulirati limfocite T. Međutim, budući da

je neizvjesno što se događa s antigeničnom molekulom njezinim vezivanjem na lipide, zaključak je krivo postavljen. Naime, takva obrada antigena može dovesti do promjena u prostornoj strukturi antigena koja predstavlja osnovni razlog prerade molekule za taj antigen, kako je opisano u radu 32. Time bi umjetno stvoreni liposomi imunopredočavali prerađeni antigen, a ne nativni antigen. Toga i autori postaju svjesni u diskusiji svojeg drugog rada.<sup>71</sup>

### VEZANJE NOVONASTALIH PEPTIDA NA MOLEKULE DRUGOG RAZREDA GSTS

Mnogi posredni funkcijski pokusi su ukazivali da se antigen veže na molekule GSTS.<sup>38</sup> Međutim, takvo vezivanje je neposredno uspješno analizirano tek otkrićem prerade antigena i analizom nastalih peptida. Tehnikom ravnoteže dijalize, pokazano je da se imunogenični peptid veže specifično na molekule drugog razreda GSTS. Vezanje je pokazano za ovalbuminski peptid (323–339)-Tir, koji je imunogeničan u miševa Balb/c soja i čiji imunogeni odgovor je spregnut I-A<sub>d</sub> alomorfo.<sup>22</sup> Taj peptid se ne veže na I-E<sub>d</sub>, I-E<sub>k</sub> niti na I-A<sub>k</sub> alomorf GSTS. Vezanje je kompetitivno kočno neobilježenim peptidom (323–339)-Tir, ali ne imunogeničnim, strukturno sličnim, analogom (329–339)-Tir. Slični rezultati su dobiveni sa peptidom lizozima.<sup>4</sup> Utvrđena je konstanta disocijacije: 1.4 – 4.8 μM, za vezivanje lizozimskog peptida na spregnuti alomorf molekule GSTS. Kompetitivnim kočenjem vezivanja, strukturnim analogima, dokazana je eliminacija imunopredočavanja kao posljedica kompeticije na razini vezivanja.<sup>4</sup> Jedanaest od dvanaest testiranih peptida je pokazalo dominantno vezivanje na alomorf spregnuća. Samo u jednom slučaju dominantno vezivanje je bilo za molekulu na koju nije spregnut odgovor limfocita T za taj peptid. Mjerenja peptid-GSTS interakcije su pokazala sve oznake receptorskih vezanja. Vezivanje je specifično, može se zasititi višom koncentracijom liganda i može se zakočiti relevantnim strukturnim analogima. Uočena je opća tendencija da je disocijacijska konstanta interakcije imunogeničnog peptida i GSTS molekule redovito manja od 100 μM. To je preduvjet dostatnog stvaranja imunogeničnih kompleksa. Slična vrijednost ravnotežne konstante je dobivena nezavisnim kinetičkim mjerenjima u gel filtracijskoj metodi.<sup>71</sup> Svaka GSTS molekula oblikuje samo jedno vezno mjesto.<sup>21</sup> Stvoreni imunogenični kompleksi su za 20 tisuća puta potentniji od ekvimolarne koncentracije istog otopljenog antigena u stimulaciji proliferacije limfocita T. Taj podatak ukazuje na potencijalnu biološku značajnost vezanja novonastalih antigenskih peptida na GSTS.

Budući da se peptidi iz ishodne antigenske molekule proizvode *in vivo* enzimskim cijepanjem, potencijalni imunogenični peptidi se pojavljuju *in loco* vezivanje stohastički, kao funkcija strukturne molekule i aktivnosti dostupnih enzima. Stoga dostupni peptidi ne moraju nužno biti najpovoljniji za vezivanje na GSTS molekule. Na razini vezivanja se događa selekcija peptida prema njihovom relativnom afinitetu i koncentracijama. Teorijski se može pretpostaviti da neke druge konformacije mogu biti povoljnije od ponuđenih, to jest, da imaju veći afinitet za GSTS. Za nukleoproteinski epipod 147–158 virusa influenze pokazano je da taj epipod postaje oko 1000 puta potentniji ako se iz njegove strukture izbaci arginin na

poziciji 156.<sup>54</sup> Tako promijenjeni peptid, peptid 156(147–158 R<sup>-</sup>), oblikuje isti epitop, ali se veže sa mnogo većim afinitetom vezivanja na GSTS molekule. Zaključak je izveden indirektno, na osnovi količine peptida i vremena potrebnog za proizvodnju ciljnih stanica u citotoksičnom testu. Također, zamjena treonina glicinom na poziciji 157 je imala sličan potencirajući učinak.<sup>54</sup> Ovakva funkcijsko-strukturna analiza peptida ukazuje na novu dimenziju imunopredočavanja. Diskretnim promjenama antigenskog peptida može se pojačati imunogeničnost i time potencirati imunosni odgovor, što može biti relevantno za proizvodnju cjepiva. Umjetnim pojačanjem odgovora limfocita T može se potencirati izvršni krak imunosnog odgovora i time potencijalno preduprijeti patogenezu stanja uzrokovanog istim zaraznim čimbenikom.

### STRUKTURNA SLIČNOST RAZNORODNIH PEPTIDA

Otkriće da se na jedan alomorf molekule GSTS može vezati i funkcijski kompitirati veći broj raznorodnih peptida, upućuje na pomisao da bi ti različiti peptidi morali imati zajedničko svojstvo. Usporedbom 57 različitih epitopa poznate strukture, utvrđena je interesantna pravilnost u primarnom slijedu tih bjelančevina.<sup>54,71</sup> Epitop se sastoji od četveročlanog slijeda aminokiselina sa slijedećim obrascem strukture: 1 = polarna (hidrofilna) aminokiselina ili glicin, 2 i 3 = nepolarne (hidrofobne) aminokiseline i 4 = polarna aminokiselina ili glicin (brojke označavaju redoslijed aminokiseline). Nevažna je i amino-karboksi orijentacija peptida. Nevažna je i koja polarna odnosno nepolarna aminokiselina je na tim položajima, što objašnjava fenomenologiju da se potpuno nesrodni peptidi vežu na isti receptor — istu molekulu GSTS. Iako postoje izvjesna odstupanja u nekih od poznatih epitopa, učestalost takvog četveročlanog slijeda je statistički veća u odnosu na slučajne slijedove ( $P < 0.001$  u  $\chi$ -kvadratnom testu). Studirani peteročlani slijed nije bio zastupljeniji od slučajnih slijedova. Analizirani peptidi se začudo nisu razlučili po njihovu vezivanju na molekule prvog odnosno drugog razreda GSTS. Također nije utvrđena veća značajnost u segregaciji peptida prema reaktivnim alomorfima, što ukazuje na ograničenja takve analize. Naime, podtipovi gornjeg obrasca, koji bi bili specifični za određeni alomorf, nisu dali visoku statističku značajnost segregacije. Autori pretpostavljaju da bi hidrofobni dio opisanog obrasca mogao služiti kao »pokretač« vezivanja agretopa na desetop molekule GSTS. Kolikogod suglasan sa teorijskim modelima, gornji obrazac ignorira ranije spoznaje, dobivene nezavisnim postupcima. Minimalna veličina antigeničnog peptida iznosi 7–12 aminokiselina, a funkcijski taj peptid sadrži najmanje dva dijela: epitop i agretop. Teorijska analiza fizičkih i kemijskih svojstava pojedinih dijelova molekule, koja određuju proteinsku antigeničnost, pokazala je da veći epitopa potječe iz odsječaka nativne molekule koje normalno prepoznaju protutijela.<sup>7</sup> Istodobno ti dijelovi molekule oblikuju alfa uzvojnice u nativnoj konfiguraciji, i/ili imaju sposobnost preoblikovanja u amfipatske uzvojnice.<sup>8</sup> Četveročlani obrazac je sukladan amfipatskoj uzvojnici.<sup>53,54</sup> Autori navode opću tendenciju da su samo stabilne amfipatske uzvojnice dobri kandidati za epitope limfocita T.<sup>8</sup> Druga svoj-

stva peptida, kao segmentna amfipatičnost i sklonost oblikovanju zavoja, nisu pokazala značajnu korelaciju prema imunogeničnosti.

### IMUNOSNI ODGOVOR NA UNUTARSTANIČNE PARAZITE

Virusna infekcija pokreće snažan citološki izvršni krak imunosnog odgovora. Istodobno, protiv nekih virusnih epitopa se stvaraju protutijela. Virus specifični citotoksični limfociti T obuhvaćaju dvije funkcijske grupe: CD8 pozitivne, spregnute prvim razredom molekula GSTS i CD4 pozitivne, spregnute drugim razredom GSTS molekula.<sup>3,42</sup> Virus *Herpes simplex* i virus ospica dominantno induciraju citotoksični odgovor CD4 pozitivnih limfocita T spregnutih drugim razredom.<sup>35,55</sup> Virus influenze pokreće i jedan i drugi tip limfocita T.<sup>42</sup> U pokretanju antiviralnih i drugih citotoksičnih odgovora, antigen primarno podliježe procesima razgradnje u imunopredočnim stanicama. Budući da su antigeni tečajem patogeneze sadržani u unutarstaničnim i izvanstaničnim odjeljcima organizma (kao virus, unutarstanične bakterije, klamidije), mehanizmi za preradu antigena i njihovog izražaja na površini inficirane i drugih imunopredočnih stanica donekle su različiti od puteva za izvanjske vodotopive proteinske antigene. Iako ne uvijek neposrednim mjerenjima, eksperimentiranja s virusnim antigenima, utvrđena su tri distinktna katabolička puta u stanici.<sup>42</sup> Prvo, vodotopivi izvanjski antigeni endocitozom kroz endosomski i egzocitični put kruženja stvaraju peptide koji se redovito vežu na molekule drugog razreda GSTS molekula.<sup>42,44</sup> Taj put gotovo nikada ne dovodi do imunopredočavanja antigena kroz molekule prvog razreda.<sup>44</sup> Striktno razdjeljivanje vezanja novostvorenih peptida na ponudene GSTS molekule-receptore vjerojatno odražavaju dostupnost odnosnih molekula u unutarstaničnim odjeljcima gdje se događa cijepanje antigena. Drugi imunopreradni put prolaze endogeni proteini sintetizirani na endoplazmatskoj zrnatoj mrežici prije njihova ukotvljenja u membranu. Različitim biokemijskim i morfološkim tehnikama taj katabolički put se razlučuje od vanjskog degradativnog puta.<sup>41</sup> Razgradnja se događa na membranskim strukturama Golgijeva tjelešca. Nastali peptidi se vežu na molekule prvog razreda GSTS.<sup>42</sup> Ponovnim kruženjem mogu dospjeti i na molekule drugog razreda.<sup>45</sup> Vezivanje novonastalih peptida na molekule prvog razreda GSTS nije analizirano neposrednim kemijskim metodama, već posrednim postupcima kočenja imunopredočavanja.<sup>1,30</sup> Takva funkcijska analiza ne daje afinitetnu konstantu reakcije već samo njene potencijalne posljedice. Treći mehanizam je prerada virusnih antigena i njihovo udruživanje s molekulama GSTS.<sup>42,65</sup> Peptidni derivati virusne čestice se udružuju s molekulama i prvog i drugog razreda. Stoga samo kvantitativni i regulatorni mehanizmi određuju koji će oblik imunosti biti dominantan kod pojedinog virusa. I humoralni i stanični izvršni krak imunosnog odgovora započinju imunopredočavanjem.

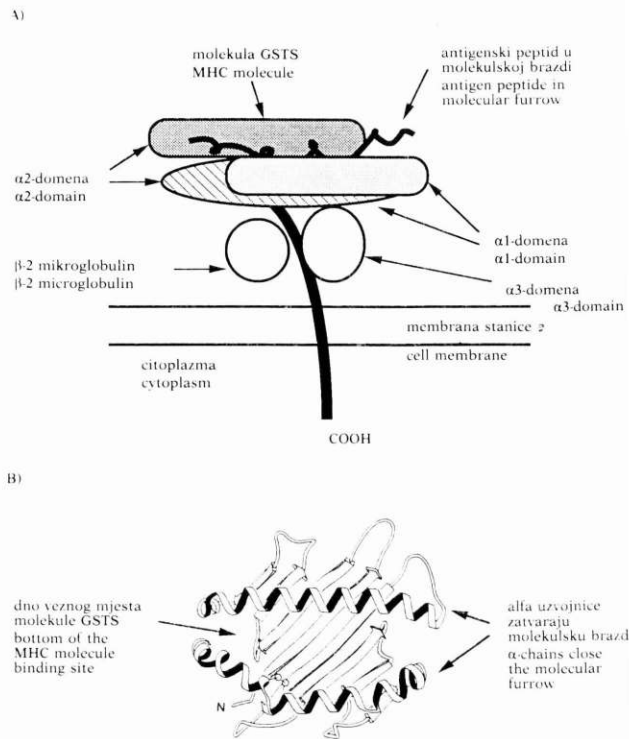
Razumijevanjem imunopredočavanja molekula, znanost je odgonetnula jedan od bioloških mehanizama prepoznavanja i razlučivanja makromolekula. Molekule glavnog sustava tkivne snošljivosti djeluju kao površinski stanični receptori za brojne derivate unutarstaničnog katabolizma raznorodnih molekula. Specifičnost vezivanja osigurava molekulski struk-

turni obrazac novonastalih antigenskih peptida (vidi ranije). Na njima se događa primarna selekcija peptida koji oblikuju ili ne oblikuju imunogenične komplekse. Imunopredočavanje imunogeničnih kompleksa započinje imunosni odgovor, čiji izvršni odgovor (citotoksični CD8+, citotoksični CD4+, humoralni, limfokinski i potencijalno drugi) može biti različito potentan. Sumjerna »biološka snaga« odgovora na pojedine antigene i time njegova relevantnost u prirodnom tečaju infekcije su nemjerljive suvremenim analitičkim postupcima.

### TRODIMENZIJSKA STRUKTURA MOLEKULA GSTS

Molekule prvog razreda GSTS (kod čovjeka HLA-A, HLA-B, HLA-C) su sazidane od dva polipeptidna lanca. Teški lanac, relativne molekulske mase 44000 daltona, je integralni membranski glukoprotein, sa karboksikrajem u citoplazmi stanice.<sup>66</sup> Njemu je nekvalentno pridružen  $\beta$ 2-mikroglobulin, relativne molekulske mase 12000 daltona. Izvanstanični dio molekule oblikuje tri domene,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3, pri čemu svaka obuhvaća oko 90 aminokiselina.<sup>25</sup> Gustoća molekula po stanici je 10 do 100 tisuća. Svaka stanica u organizmu izražava molekule prvog razreda GSTS, bez obzira na svoju tkivnu pripadnost i izražavanje drugih gena u genomu. Trodimenzijska struktura molekule HLA-A2 je određena rendgenskom kristalografijom s razinom razlučivanja 3,5 angstroma.<sup>11</sup> Na osnovi topografskih koordinata pojedinih atoma u molekuli utvrđeno je da  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domene jednim svojim dijelom oblikuju zaravan, sačinjen od beta-konformacija. Ta zaravan nosi na sebi dvije pravilne alfa-uzvojnice, koje su izgrađene od ostalih dijelova  $\alpha$ 1 odnosno  $\alpha$ 2 domene. Uzvojnice se nalaze na rubovima zaravni, tako da se prostorno oblikuje molekulska brazda, otvorena prema van, koja služi kao vezno mjesto za antigenski peptid. **Slika 1.** shematizirano prikazuje karakteristične detalje molekule. Veličina tog isturenog dijela molekule je približno 50x40 angstroma. Izračunate dimenzije veznog mjesta približno iznose: dužina 25, širina 10 a dubina oko 11 angstroma.  $\alpha$ 3 domena i  $\beta$ 2-mikroglobulin ne sudjeluju u izgradnji veznog mjesta i nalaze se bliže membrani stanice. Transmembranskim i citoplazmatičkim karboksikrajem molekula je usidrena u membrani stanice. Vezno mjesto za antigen je udaljeno od stanične membrane i usmjereno prema izvanstaničnom prostoru. Aminokiselinski postranični lanci na pozicijama 9, 62, 65, 66, 67, 70, 71, 77 i 80 u  $\alpha$ 1 domeni i 95, 97, 114, 116, 156 i 162 u  $\alpha$ 2 domeni su usmjereni prema brazdi.<sup>12</sup> Oni najvjerojatnije pridonose energiji vezanja peptida na GSTS, to jest, djeluju kao desetop. Izvanjski i rubni postranični lanci alfa uzvojnice  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domene su ligandi za receptor limfocita T. Pojedinačne aminokiseline na pozicijama 62, 65 i 163 su kandidati za dominantnu ulogu interakcije s receptorom limfocita T.<sup>11,12</sup> Time GSTS molekula osigurava dvojni kontakt, receptorski peptidnom ligandu i ligandni receptoru limfocita T. Takva dvojna uloga molekule je osnova oblikovanja trimolekulskog kompleksa kao preduvjeta aktivaciji limfocita T.

U molekulskoj veznoj brazdi molekule HLA-A2 kristalografijom je otkrivena dodatna elektronska gustoća, koja nije pripadala niti jednom dijelu same



**SLIKA 1.**  
Molekula prvog razreda GSTS (kod čovjeka HLA-A, HLA-B, HLA-C) su sazidane od dva polipeptidna lanca. Teški lanac, relativne molekulske mase 44000 daltona, je integralni membranski glukoprotein, sa karboksikrajem u citoplazmi stanice.<sup>66</sup> Njemu je nekvalentno pridružen  $\beta$ 2-mikroglobulin, relativne molekulske mase 12000 daltona. Izvanstanični dio molekule oblikuje tri domene,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3, pri čemu svaka obuhvaća oko 90 aminokiselina.<sup>25</sup> Gustoća molekula po stanici je 10 do 100 tisuća. Svaka stanica u organizmu izražava molekule prvog razreda GSTS, bez obzira na svoju tkivnu pripadnost i izražavanje drugih gena u genomu. Trodimenzijska struktura molekule HLA-A2 je određena rendgenskom kristalografijom s razinom razlučivanja 3,5 angstroma.<sup>11</sup> Na osnovi topografskih koordinata pojedinih atoma u molekuli utvrđeno je da  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domene jednim svojim dijelom oblikuju zaravan, sačinjen od beta-konformacija. Ta zaravan nosi na sebi dvije pravilne alfa-uzvojnice, koje su izgrađene od ostalih dijelova  $\alpha$ 1 odnosno  $\alpha$ 2 domene. Uzvojnice se nalaze na rubovima zaravni, tako da se prostorno oblikuje molekulska brazda, otvorena prema van, koja služi kao vezno mjesto za antigenski peptid. **Slika 1.** shematizirano prikazuje karakteristične detalje molekule. Veličina tog isturenog dijela molekule je približno 50x40 angstroma. Izračunate dimenzije veznog mjesta približno iznose: dužina 25, širina 10 a dubina oko 11 angstroma.  $\alpha$ 3 domena i  $\beta$ 2-mikroglobulin ne sudjeluju u izgradnji veznog mjesta i nalaze se bliže membrani stanice. Transmembranskim i citoplazmatičkim karboksikrajem molekula je usidrena u membrani stanice. Vezno mjesto za antigen je udaljeno od stanične membrane i usmjereno prema izvanstaničnom prostoru. Aminokiselinski postranični lanci na pozicijama 9, 62, 65, 66, 67, 70, 71, 77 i 80 u  $\alpha$ 1 domeni i 95, 97, 114, 116, 156 i 162 u  $\alpha$ 2 domeni su usmjereni prema brazdi.<sup>12</sup> Oni najvjerojatnije pridonose energiji vezanja peptida na GSTS, to jest, djeluju kao desetop. Izvanjski i rubni postranični lanci alfa uzvojnice  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domene su ligandi za receptor limfocita T. Pojedinačne aminokiseline na pozicijama 62, 65 i 163 su kandidati za dominantnu ulogu interakcije s receptorom limfocita T.<sup>11,12</sup> Time GSTS molekula osigurava dvojni kontakt, receptorski peptidnom ligandu i ligandni receptoru limfocita T. Takva dvojna uloga molekule je osnova oblikovanja trimolekulskog kompleksa kao preduvjeta aktivaciji limfocita T.

**FIGURE 1.**

I class molecule of the main histocompatibility complex. A) Schematic profile. The molecule is inserted into the membrane by cytoplasmic carboxy-tail. B) Computer schematic presentation of the molecule, as seen from above. An antigen binding site forms between two parallel  $\alpha$ -chains. N denotes the amino-terminal end of the molecule.

molekule. Kristal molekule je sadržavao dodatnu malu molekulu, za koju autori misle da je preradeni antigenski peptid, vezan za molekulu GSTS.<sup>11,12</sup> Ovaj nalaz je prva vizualizacija kokristaliziranog kompleksa peptid-GSTS. Podatak da je taj peptid ostao u molekuli GSTS, usprkos svim postupcima pročišćavanja i kristaliziranja, ukazuje na posebna svojstva kinetike interakcije ovih molekula, sukladno funkcijskim podacima dobivenim neposrednim biokemijskim mjerenjima.

Molekule drugog razreda GSTS (kod čovjeka HLA-DR, HLA-D, HLA-DP, HLA-DQ i druge) su integralni membranski proteini. One se sastoje od dva polipeptidna lanca,  $\alpha$  i  $\beta$ . Svaki od njih oblikuje po dvije izvanstanične domene. Kristalografska trodimenzijska struktura nije još određena. Na osnovi sličnosti u primarnom slijedu aminokiselina, genomskoj organizaciji molekula prvog i drugog razreda GSTS, kao i činjenici da ponekad isti receptor može vezati obje molekule, sazdan je hipotetski model trodimenzijske strukture molekule drugog razreda GSTS.<sup>16</sup> Prema tom modelu postoji velika sličnost u općoj trodimenzijskoj strukturi tih molekula.

Valjanost zaključaka baziranih na modelu testiranih se različitim analitičkim i funkcijskim postupci-

ma. Primjenom ovakve razine analize odnosa strukture i funkcije bioloških fenomena, biološke znanosti ulaze u zreliju fazu. Imunobiološki fenomeni, kao spregnutost prepoznavanja i aktivacije limfocita T, funkcija gena imunosnog odgovora, dobivaju svoje definitivno razjašnjenje.

### GSTS-SPREGNUTOST I FUNKCIJA GENA IMUNOSNOG ODGOVORA U SVJETLU IMUNOPREDOČAVANJA ANTIGENA

Brojni funkcijski pokusi su čvrsto ustanovili da se svaki odgovor limfocita T događa istodobnim prepoznavanjem antigena i molekule GSTS na imunopredočnim stanicama.<sup>37,38</sup> Ta spregnutost je prisutna na razini pomoćnički limfocit T — imunopredočna stanica, citotoksični limfocit T — ciljna stanica, i također, na razini pomoćnički limfocit — B limfocit. Otkrićima molekulske razine imunopredočavanja antigena u imunopredočnim stanicama, fenomenologija spregnutosti postaje logična posljedica molekularskih događaja. Molekule GSTS djeluju kao površinski receptori koji vežu raznorodne peptidne derivate antigena. To vezivanje se događa prije susreta s receptorom limfocita T. Jednom stvoreni imunogenični kompleks je osnova udruživanju u trimolekulski kompleks s receptorom limfocita T. Aktivacija nastaje kada se stvori dovoljan broj trimolekulskih kompleksa u interakciji limfocit T — imunopredočna stanica. Gore opisani pokusi su stvorili solidnu molekularsku bazu za objašnjenje GSTS-spregnutosti.<sup>18,19,27,32,38,39</sup> Molekulsko objašnjenje zadovoljava većinu fenomenoloških zakona GSTS-spregnutosti.<sup>36</sup>

Imunosni odgovor na većinu jednostavnih antigena je pod kontrolom gena koji su smješteni u GSTS kompleksu. Ti geni se nazivaju genima imunosnog odgovora (Ir-geni). Pojedini antigen limfociti T prepoznaju u kontekstu jednog alomorfa GSTS, dok u kontekstu drugog alomorfa nema imunosnog odgovora na taj antigen. Jedinka s prvim alomorfofom je reaktivac, a druga nereaktivac na rečeni antigen. U genetskom križanju reaktivnost se segregira po Mendelovim zakonima. Otkrićem molekulske razine imunopredočavanja jedna od tri teorije Ir-genske funkcije je neposredno dokazana. Teorija izbira determinirana pretpostavlja da je fenomenološka nereaktivnost na zadani antigen posljedica nevezivanja antigena na molekulu GSTS. Biokemijska mjerenja vezanja antigenskih peptida, i posredni kompeticijski testovi su ukazali da vezanje ili odsutnost vezanja dobro korelira s imunogeničnošću. Stoga bi nereaktivnost na antigen bila posljedica selekcije epitopa na razini imunopredočavanja. Alomorf GSTS je proteinska razina Ir-genskog izražaja. Treba naglasiti da ovim nisu isključeni drugi mehanizmi Ir-genske funkcije. Delecija klonova u repertoaru i supresijski mehanizmi mogu biti odgovorni za druge Ir-genske fenomene.<sup>37</sup> Funkcija gena imunosnog odgovora može istodobno nezavisno biti na sve tri razine: imunopredočavanju, repertoaru limfocita T i kao aktivna supresija imunosnog odgovora na neki antigen.<sup>40</sup>

### IMUNOPREDOČAVANJE ANTIGENA I CJEPIVA

Funkcija pomoćnih limfocita T je fiziološki regulator odgovora limfocita T. Isto tako, sami pomoćnički limfociti T mogu posredovati i izvršne funkcije

kao sekrecije izvršnih limfokina ili citotoksična funkcija. Budući da, za razliku od protutijela i limfocita B, limfociti T prepoznaju i reagiraju na mali broj epitopa proteina, nereaktivnost prema nekom obliku antigena jest redovito posljedica nereaktivnosti limfocita T. Stoga je za uspješnu preimunizaciju potrebno osigurati aktivaciju limfocita T. Razumijevanjem imunopredočavanja otkriva se nova dimenzija cijepljenja kao najbolje metode prevencije bolesnog stanja. Naime, identifikacijom dominantnog epitopa limfocita T patogenog čimbenika, taj se epitop može ugraditi u cjepivo kao njegov dio.<sup>8,9</sup> Tim postupkom bi se osigurao *a priori* zahtjev da cjepivo mora biti imunogenično za limfocite T. Sva ranija cjepiva su proizvedena empirijski, na osnovi pokušaja i pogrešaka. Antigeni su testirani bez znanja relativnog udjela pojedinih epitopa u imunosnom odgovoru. Konstrukcija cjepiva, sintetskog i rekombinantnog, treba se osnivati na poznavanju kritičnih epitopa patogenog čimbenika. Iako to danas može izgledati prezahtjevno, budući da su rijetki primjeri gdje se to zna, skora budućnost će vrlo vjerojatno koristiti ovu spoznaju ekstenzivno. Početna iskustva sa VPI epitopom u »foot-and-mouth« bolesti stoke,<sup>17</sup> sporoizotnim i mezoizotnim epitopima u prevenciji malarije,<sup>51</sup> te cjepiva protiv virusa stečene imunoneдостatnosti i virusa hepatitisa B<sup>33</sup> su ohrabrujuća. Poznati epitopi u cjepivu su doprinijeli boljoj preimunizaciji. Pored kritične važnosti da cjepivo sadrži epitop stanične imunosti, ono, da bi bilo efektivno *in vivo*, mora biti dostupno imunosnom sustavu. Upotrebom DNA-rekombinantne tehnologije moguće je ugraditi željeni gen (onaj koji programira željeni epitop) u nepatogeni nosač, koji bi u cijepljenom organizmu osigurao pravilnu imunizaciju. Virus vakcinije je prikladan nosač i novi metodološki pristup cijepljenju.<sup>46,48</sup> Realna primjenljivost i učinak takve metode danas je još neizvjestan.

### SKRAĆENICE U TEKSTU

IL-4: Interleukin-4. Čimbenik rasta limfocita B.  
IL-2: Interleukin-2. Čimbenik rasta limfocita T i drugih stanica koje posjeduju receptor za taj interleukin.  
GSTS: Glavni sustav tkivne snosljivosti. To je hrvatski sinonim za MHC u engleskoj literaturi.  
MHC: Major Histocompatibility Complex. Engleski sinonim za GSTS.  
Gama IFN: Gama interferon. Limfokin s protuviralnim i protuproliferativnim djelovanjem kojeg po aktivaciji izlučuju pomoćnički Th1 limfociti.  
*c-myc*: Jedan od staničnih onkogeni.  
*c-fos*: Jedan od staničnih onkogeni.  
APC: Antigen Presenting Cells. Engleski sinonim za imunopredočne stanice.  
HLA: Human Leukocyte Antigen. Internacionalizirani naziv za čovječiji GSTS. Molekule A, B i C čine prvi razred. Molekule D, DR, DP, DQ i druge čine drugi razred.  
HLA-A2: A2 je jedan od alomorfa molekule HLA-A.  
DNA: Deoksiribonukleinska kiselina.

### LITERATURA

1. Adorini L, Muller S, Gardinaux F, Lehmann PV, Falconi F, Nagy Z. In vivo competition between self peptides and foreign antigens in T-cell activation. *Nature* 1988; 334:623–5.
2. Allen PM, Strydom DJ, Unanue ER. Processing of macrophage: Identification of the determinant recognized by two T-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:2489–93.
3. Allen PM. Antigen processing at the molecular level. *Immunol Today* 1987; 8:270–3.
4. Babbitt BP, Matsueda G, Allen PM, Haber E, Unanue ER. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985; 317:359–61.

5. *Babbitt BP, Matsueda G, Haber E, Unanue ER, Allen PM.* Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4509–13.
6. *Benacerraf B, Falo LD, Rock KL.* Processing of native antigen by accessory cells and presentation of membrane bound MHC-associated antigen to specific T-cells. U: *Processing and presentation of antigens.* Ured. B. Pernis, SC Silverstein, HJ Vogel. Academic Press, New York 1988; 3–11.
7. *Berzofsky JA.* Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* 1985; 229:932–40.
8. *Barzofsky JA, Kempf B, Cornette JL, Spenge JL, Margalita H, Berkower JF, Good MT, Miller LH, DeLisi C.* Protein antigen structure recognised by T-cells: Potential applications to vaccine design. *Immunol Rev* 1987; 98:9–52.
9. *Berzofsky JA.* Features of T-cell recognition and antigen structure useful in the design of vaccines to elicit T cell immunity. *Vaccine* 1988; 6:89–93.
10. *Bierer BE, Burakoff SJ.* T-cell adhesion molecules. *FASEB J* 1988; 2:2584–90.
11. *Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1988; 329:506–11.
12. *Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC.* The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1988; 329:512–8.
13. *Bodmer HC, Pemberton RM, Rothbard JB, Asconas BA.* Enhanced recognition of a modified peptide antigen by cytotoxic T cells specific for influenza nucleoprotein. *Cell* 1988; 52:253–8.
14. *Bottazzo GF, Todd I, Mirakian R, Bellioli A, Pujol-Borrell R.* Organ specific autoimmunity: A 1986 Overview. *Immunol Rev* 1986; 94:138–69.
15. *Breathnach SM, Shimada S, Kovač Z, Katz SI.* Immunologic aspects of acute cutaneous graft-versus-host disease: Decreased density of antigen presenting function of Ia+ Langerhans cells and absent antigen presenting function of Ia+ keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1986; 86:226–34.
16. *Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC.* A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332:845–50.
17. *Brown F.* Use of peptides for immunisation against foot-and-mouth disease. *Vaccine* 1988; 6:180–7.
18. *Buus S, Sette A, Grey HM.* The interaction between protein derived immunogenic peptides and Ia. *Immunol Rev* 1987; 98:115–41.
19. *Buus S, Wenderlin O.* A group specific inhibitor of lysosomal cysteine proteinases selectively inhibits both proteolytic degradation and presentation of the antigen dinitrophenyl-poly-L-lysine by guinea pig accessory cell to T cells. *J Immunol* 1986; 136:452–9.
20. *Buus S, Wenderlin O.* Oligopeptides of the angiotensin lineage compete for presentation by paraformaldehyde treated cells to T cells. *J Immunol* 1986; 236:459–65.
21. *Buus S, Sette A, Colon S, Jenis DM, Grey HM.* The relationship between major histocompatibility complex (MHC) restriction and capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 1987; 235:1353–8.
22. *Buus S, Colon S, Smith C, Freed JH, Miles C, Grey HM.* Interaction between a «processed» ovalbumin peptide and Ia molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 83:3968–71.
23. *Corradin GP, Engars HD.* Inhibition of antigen induced T cell clone proliferation by antigen specific antibodies. *Nature* 1964; 208:547–9.
24. *Cresswell P.* Intercellular class II HLA antigen are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalised by receptor mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8188–92.
25. *Cresswell P, Turner MJ, Strominger JL.* Papain solubilised HLA antigen from cultured leukocytes contain two peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:1603–7.
26. *Falo LD, Benacerraf B, Rothstein L, Rock KL.* Cerulenin is a potent inhibitor of antigen processing by antigen presenting cells. *J Immunol* 1987; 139:3918–23.
27. *Falo DL, Haber SIO, Hermann S, Benacerraf B, Rock KL.* Characterisation of antigen association with accessory cells. Specific removal of processed antigens from the cell surface by phospholipases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:522–6.
28. *Falo DL, Benacerraf B, Rock KL.* Phospholipase treatment of accessory cells that have been exposed to antigen selectivity inhibits antigen specific Ia restricted but not allospecific stimulation of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 84:6994–7.
29. *Gell PGH, Benacerraf B.* Studies on hypersensitivity. II Delayed hypersensitivity of denatured proteins in guinea pigs. *Immunology* 1959; 2:64–71.
30. *Grey HM, Buus S, Sette A.* The interaction between immunogenic peptide and Ia. U: *Processing and presentation of antigen.* Ured. Pernis B, SC Silverstein, HJ Vogel. Academic Press New York 1988; 201–14.
31. *Grindle B, Seglen O.* Differential effects of proteinase inhibitors and amines on the lysosomal and nonlysosomal pathways of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Acta* 1980; 632:73–86.
32. *Guillet JG, Lai MZ, Briner JJ, Buus S, Sette A, Smith JA, Gefter M.* Immunological self, nonself discrimination. *Science* 1987; 235:865–70.
33. *Hilleman MR.* Hepatitis B and AIDS and the promise for their control by vaccine. *Vaccine* 1988; 6:175–9.
34. *Hollinshead AC.* Biological markers of breast cancer. A Review *Cancer Invest* 1987; 5:581–91.
35. *Jacobson S, Richert JR, Biddison WE, Satinsky A, Hartzmann RJ, McFarland HF.* Measles virus specific T4+ human cytotoxic T cell clones are restricted by class II HLA antigens. *J Immunol* 1984; 133:754–7.
36. *Klein J, Marušić M, Nagy ZA.* The seven rules of MHC restriction. *Transpl Proceedings* 1982; 14:581–3.
37. *Kovač Z.* Biološka osnova aloreaktivnosti. Zbornik radova XVII stručnog sastanka internista Slavonije, Osijek. Ured. I Candrić 1985; 430–6.
38. *Kovač Z.* The molecular aspect of antigen presentation to T lymphocytes. *Period Biol* 1988; 90:3–10.
39. *Kovač Z, Schwartz RH.* The molecular basis of the requirement for antigen processing of pigeon cytochrome c prior to T cell activation. *J Immunol* 1985; 134:3233–40.
40. *Kovač Z, Schwarz RH.* The nature of the immune response (Ir) gene defect for pigeon cytochrome c in (Blo.A(4R)XBlo.PL) F1 mice: A comparison between thymic selection and antigen presentation. *Internat Immunol* 1989; 1:1–10.
41. *Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD.* Degradation from the endoplasmic reticulum: Disposing of newly synthesised proteins. *Cell* 1988; 54:209–20.
42. *Long EO, Jacobson S.* Pathways of viral antigen processing and presentation to CTL: Defined by the mode of virus entry. *Immunol Today* 1989; 10:45–8.
43. *Lorenz RG, Allen PM.* Thymic cortical epithelial cells can present self-antigen in vivo. *Nature* 1989; 337:560–2.
44. *Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ.* Induction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 1988; 54:777–85.
45. *Morrison LA, Braciale VL, Braciale TJ.* Distinguishable pathways of viral antigen presentation to T lymphocytes. *Immunol Res* 1988; 3:294–304.
46. *Moss B, Fuerst TR, Flexner C, Hugin A.* Roles of vaccinia virus in the development of new vaccines. *Vaccine* 1988; 6:161–3.
47. *Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH.* Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:445–80.
48. *Murray K.* Application of recombinant DNA Techniques in the development of viral vaccine. *Vaccine* 1988; 6:164–74.
49. *Nasquet P, Ellis J, Singh B, Hodes RS, Delovich TL.* Processing and presentation of insulin. I Analysis of immunogenic peptides and processing requirements for insulin A-loop-specific T cells. *J Immunol* 1987; 139:3955–9.
50. *Pallay DA, Cluff CW, Wentworth PA, Ziegler HK.* Cyclosporine inhibits macrophage mediated antigen presentation. *J Immunol* 1986; 136:4348–53.
51. *Perlmann T, Brzius K, Perlmann H, Trove-Blomberg M, Wahlgren M, Wahlin B.* Malaria vaccines: Immunogen selection and epitope mapping. *Vaccine* 1988; 6:187–93.
52. *Robertson M.* Present state of recognition. *Nature* 1985; 317:768–71.
53. *Rothbard JB, Taylor WR.* A sequence pattern common to T cell epitope. *The EMBO Journal* 1988; 7:93–100.
54. *Rothbard JB, Lechler RI, Howland K, Bal V, Eckels D, Sekaly R, Long EO, Taylor WR, Lamb JR.* Structural model of HLA-DR1 restricted T cell antigen recognition. *Cell* 1988; 52:515–23.
55. *Schmid DS.* The human MHC-restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD4+, CD8- T cells and restricted to the DR region of MHC complex. *J Immunol* 1988; 140:3610–6.
56. *Schwartz RH.* Acquisition of immunologic self tolerance. *Cell* 1989; (u tisku).
57. *Schwartz RH.* The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions. U: *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, urednik WE Paul. 1984; 379–540.
58. *Schwartz RH.* The role of histocompatibility molecules in T cell activation. *Ann Rev Immunol* 1985; 3:329–40.
59. *Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russel JH, Loh DY.* Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988; 336:73–6.
60. *Shevach EM, Rosenthal AS.* Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II Role of the macrophages in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 1973; 138:1213–29.
61. *Shimonkevitz RJ, Colon S, Kappler JW, Marrack P, Grey HM.* Antigen recognition by H-2 restricted T cells. II A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol* 1984; 133:2067–74.
62. *Shimonkevitz RJ, Marrack P, Grey HM.* Antigen recognition by H-2 restricted T cells. I Cell free antigen processing. *J Exp Med* 1983; 158:303–10.



63. Streicher HZ, Berkower JJ, Bush FR, Gurd N, Berzofsky JA. Antigen conformation determines processing requirements for T cell activation. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:6831–4.
64. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Blüthmann von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the  $\alpha\beta$  T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cell. Nature 1988; 335:229–33.
65. Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahader G, Wraith D, McMichael AJ. The epitops of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes. Cell 1986; 44:959–68.
66. Tragardh L, Rask L, Wiman K, Fohlman J, Peterson PA. Amino acid sequence of an immunoglobulin-like HLA antigen heavy chain domain. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:5839–42.
67. Unanue ER. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. II Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. Adv Immunol 1981; 31:1–136.
68. Unanue ER, Cerottini JC. The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. J Exp Med 1970; 131:711–9.
69. Unanue ER. Antigen presentation function of macrophages. Ann Rev Immunol 1984; 2:395–428.
70. Walden P, Nagy ZA, Klein J. Induction of regulatory T lymphocyte response by liposomes carrying major histocompatibility complex molecules and foreign antigen. Nature 1985; 315:327–9.
71. Walden P, Nagy ZA, Klein J. Antigen presentation by liposomes: Inhibition with antibodies. Eur J Immunol 1986; 16:717–20.
72. Watts TH, McConnell HM. High affinity fluorescent peptide binding to I-Ad in lipid membranes. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:9660–4.
73. Ziegler K, Unanue ER. Identification of macrophages antigen processing event required for I region restricted antigen presentation to T lymphocytes. J Immunol 1981; 127:1869–72.

## Abstract

### ANTIGEN PRESENTATION TO T-LYMPHOCYTE IN THE INDUCTION OF IMMUNE RESPONSE

Zdenko Kovač

Department of Pathophysiology, Medical Faculty, University of Zagreb

Activation of the T lymphocyte response by a foreign antigen comprises a set of cellular and molecular interactions. Recently published experiments have revealed the biochemical basis of antigen processing and presentation by antigen presenting cells. The exposition of the epitope and/or an increased partition into the lipid membrane are considered minimal biochemical requirements of antigen processing. Processed antigenic peptide binds to a major histocom-

patibility molecule, which therewith acts as a cell surface receptor. This holds for both class one and class two MHC restricted responses. The formation of immune complexes between the processed peptide and major histocompatibility molecule takes place before their recognition by the T cell receptor, and it is independent of its presence. Cognate antigen-MHC molecule recognition by the cell receptor is a molecular foundation of the phenomenology of MHC-restricted T cell responses, and it functions as one level of the immune response (Ir) gene function. These phenomena are therefore briefly discussed in the context of our contemporary understanding of antigen processing and presentation.

**Key words:** antigen-presenting cells, T cells

**Received:** 25th May, 1990