

Epitopy globulin osocza krwi u owiec jako markery białek i genów w badaniach fizjologicznych, molekularnych i genetycznych

Piotr Krzyścin

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Przestrzenna budowa molekuly białka determinuje nie tylko jego funkcje biologiczne (jak np. transportowe, enzymatyczne, hormonalne czy odpornościowe), ale także określa występowanie, ilość i położenie miejsc aktywnych na cząsteczce, zwanych epitopami lub markerami (determinantami, znacznikami) antygenowymi. Determinantę antygenową tworzy zwykle od kilku do kilkunastu aminokwasów jednej nici polipeptydowej (epitop sekwencyjny) lub sąsiadujące ze sobą aminokwasy różnych łańcuchów polipeptydowych (epitop przestrzenny). Tych miejsc aktywnych nie da się wykryć żadną ze znanych metod czy technik fizykochemicznych; jedynie żywy organizm, wykorzystując swój układ odpornościowy, jest w stanie rozpoznać niektóre z nich (np. miejsca aktywne antygeny) i zareagować wytworzeniem specyficznych przeciwciał. Zdolność ta, jak również wysoka specyfika reakcji antygen-przeciwciało legły u podstaw rozwoju badań polimorfizmu antygenowego białek surowicy krwi u ludzi i zwierząt. Zmienność allotypów wykrywana jest poprzez analizę produktów genów warunkujących syntezę białek osocza – z zastosowaniem metod serologicznych i technik elektroforezy białek. Cechy te zalicza się do markerów genetycznych klasy I (O'Brien, 1992).

Pierwsze doniesienia o badaniach antygenowych markerów białek datują się na koniec lat sześćdziesiątych XX wieku. Dotychczas poznane epitopy są znacznikami szeregu zróżnicowanych białek, należących do frakcji alfa-, beta- i gammaglobulin oraz beta-lipoproteidów (tab. 1). W ciągu

kilkudziesięciu lat w różnych ośrodkach badawczych świata, m.in. w Stanach Zjednoczonych (Uniwersytety Wisconsin, Iowa, Texas), Włoszech (Uniwersytet w Neapolu) i w Polsce (Instytut Zootechniki w Balicach), prowadzono prace nad oznaczaniem kolejnych cech antygenowych białek surowicy, ich genetycznym uwarunkowaniem oraz charakterystyką fizyczno-chemiczną drobin, nośników tych cech (Skiba, 2002). Obecnie uwaga badaczy skupia się nad wykorzystaniem uprzednio uzyskanych i scharakteryzowanych markerów antygenowych jako użytecznych „narzędzi genetycznych”, przydatnych w wielu kierunkach badawczych. Jako markery genów mogą służyć do analizy ich ekspresji, sprzężeń i mapowania, a jako markery białek można je wykorzystać w badaniach fizjologicznych – do obserwacji procesów syntezy, absorpcji, czy katabolizmu tych związków. Determinanty antygenowe są też przydatne w kontroli pochodzenia owiec, badaniach genetycznej struktury populacji oraz jako markery ważnych cech produkcyjnych (Hein, 1995; Steppa, 1999).

Markery alfa-globulin

Pierwsze znaczniki antygenowe białek tej frakcji wykryto i opisano u owiec przed czterdziestu laty. Jak dotąd, zidentyfikowano u tego gatunku 11 cech antygenowych, niesionych przez drobinę o masie cząsteczkowej (m. cz.) około 70 kDa (kilodaltonów) lub wyższej (alfa₂-makroglobuliny, alfa-glikoproteidy i alfa₂-

globuliny). Analiza występowania poszczególnych epitopów w materiale rodzinnym umożliwiła badaczom określenie sposobu dziedziczenia kolejnych znaczników oraz wykrycie zależności genetycznych pomiędzy warunkującymi je genami. Bash i Milgrom (1972) wykorzystali wykryte antygeny (A, B, C, D, E, H) do obserwacji występowania tych cech u płodów oraz migracji cech przez łożysko do krwiobiegu. W badaniach zastosowania epitopów białek osocza w diagnozowaniu odporności na zapalenie wymion u owiec wykazano powiązanie znacznika antygenowego alfa₂-makroglobulin A₂mA1 z większą podatnością na stany *mastitis* (Krzyścin, 2007).

Znaczniki beta-globulin

Wśród frakcji beta-globulin wykryto dotychczas 8 determinant antygenowych, w tym dwie związane z lipoproteidami. Nośnikami opisanych markerów są molekuly o zróżnicowanej masie cząsteczkowej. Również epitopy tej frakcji były wykorzystywane w badaniach przenikania drobin białkowych przez barierę łożyskową maciorek oraz detekcji beta-globulin we krwi owczych płodów (Bash i Milgrom, 1972). Markery pięciu kolejnych znaczników, wykrytych i opisanych w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Instytutu Zootechniki PIB, nazwanych BgA1, BgB1, BgC1, BmiA1 i BmgA1, wykorzystywano do badań selektywności wchłaniania jelitowego u jagniąt oraz ekspresji genów, warunkujących te cechy (Krzyścin i in., 2002 a, b; Węgrzyn i in., 2002). Determinanty te stosowano także do analizy występowania białek w osoczu i siarze owiec (Skiba i in., 2000). Wykazano też przydatność niektórych epitopów beta-globulin jako markerów podatności owiec na stany zapalne gruczołu mlekowego (Charon i in., 1996; Krzyścin, 2005, 2006). W badaniach tych stwierdzono współzależność pomiędzy występowaniem czterech epitopów beta-globulin (BgA1, BgB1, BmgA1 i BmgB1) a opornością / podatnością wymion na stany *mastitis* oraz stopniem zainfekowania mleka u owiec. Wskazano także możliwość wykorzystania pierwszego z wymienionych epitopów (BgA1) jako wskaźnika selekcyjnego oporności owiec na zapalenie wymion.

Epitopy gamma-globulin

W obrębie frakcji owczych gamma-globulin opisywano antygenowe markery części stałej łańcuchów ciężkich immunoglobulin klasy G z podklasami IgG1, IgG2 i IgG3 (Skiba i in., 2000). W 1993 r. w Instytucie Zootechniki PIB w Balicach wykryto i opisano trzy nowe determinanty antygenowe, oznaczone IghgA1, IghgA2 i IghmA2, będące znacznikami immunoglobulin klasy IgG (dwa pierwsze) i klasy IgM (trzeci znacznik) (Skiba i Węgrzyn, 1993). Dotychczasowe wyniki badań dowodzą, że epitopy IghgA1 i IghgA2 należą do markerów wspólnych trzech poznanych dotąd podklas IgG; obrazuje to przydatność znaczników antygenowych w klasyfikacji białek. Wykazano również, że geny *IGHG1* i *IGHGA2* są wobec siebie przeciwstawne, natomiast gen *IGHMA2*, warunkujący immunoglobulinę klasy IgM, jest ściśle sprzężony z genem *IGHGA2* i przeciwstawny wobec genu *IGHGA1* (Skiba i Węgrzyn, 1993).

Curtain (za: Skiba, 2002), dzięki obserwacjom obecności IgG1_A we krwi i siarze maciorek oraz w surowicy noworodków i młodych osobników wykazał, że jagnięta rozpoczynały produkcję własnych immunoglobulin dopiero w wieku 16 tygodni. Obserwacje te zapoczątkowały badania kształtowania się odporności jagniąt w początkowym okresie rozwoju w oparciu o analizę występowania znaczników antygenowych przeciwciał w organizmach. Prace tego typu prowadzili u owiec w Instytucie Zootechniki PIB Węgrzyn i in. (2001) oraz Krzyścin i in. (2002 a, b). Zaowocowały one m. in. wykazaniem olbrzymiego znaczenia jak najwcześniejszego podania siary oseskom, wobec opóźnionej (do drugiego lub trzeciego tygodnia życia w przypadku IgG i trzeciego lub czwartego tygodnia po urodzeniu w przypadku IgM) endosyntezy własnych przeciwciał. Zbadano także przebieg absorpcji i katabolizmu immunoglobulin siarowych oraz wiążący się z tym zagadnieniem problem niedoborów fizjologicznych przeciwciał u jagniąt (Krzyścin, 2004; Krzyścin i Korman, 2008). Najważniejszą zaletą użycia epitopów jest fakt, że pozwalają one na jednoczesną i niezależną detekcję u potomstwa ekspresji genów ojcowskich i matczynek, jak również na jednoczesną i niezależną obserwację przeciwciał, wytworzonych przez własne

Epitopy globulin osocza krwi u owiec

Tabela 1. Markery antygenowe alfa-, beta- i gammaglobulin oraz beta-lipoproteidów osocza krwi u owiec (wg Skiba i in., 2000)
 Table 1. Antigenic markers of alpha-, beta- and gammaglobulins and beta-lipoproteins in blood plasma of sheep (acc. to Skiba et al., 2000)

Frakcja białkowa <i>Protein fraction</i>	Nazwa epitopu <i>Name of epitope</i>	Charakterystyka drobin z epitopem <i>Characteristics of molecules with epitope</i>	Autorzy <i>Authors</i>	Rok publikacji <i>Year of publication</i>
alfa-globuliny <i>alpha-globulins</i>	Ap(1), Ap(2), C, E, H	alfa ₂ -makroglobuliny o m. cz. ponad 200 kDa <i>alpha₂-macroglobulins with m.w. over 200 kDa</i>	Curtain	1971
	A, B	alfa ₁ -glikoproteidy o m. cz. poniżej 160 kDa <i>alpha₁-glycoproteins with m.w. below 160 kDa</i>	Bash i/and Milgrom	1972
	D	alfa ₂ -globulina o m. cz. poniżej 160 kDa <i>alpha₂-globulin with m.w. below 160 kDa</i>		
	Gs1	alfa ₂ -globulina <i>alpha₂-globulin</i>	Rapacz i in./et al.	1972
	A ₂ mA1	alfa ₂ -makroglobulina o m. cz. ponad 200 kDa <i>alpha₂-macroglobulin with m.w. over 200 kDa</i>	Skiba i/and Węgrzyn	1976
	A1, A2	glikoproteidy o m. cz. poniżej 160 kDa <i>glycoproteins with m.w. below 160 kDa</i>	Iannelli i/and de Benedictis	1978, 1979
beta-globuliny <i>beta-globulins</i>	F	beta-makroglobulina o m. cz. powyżej 200 kDa <i>beta-macroglobulin with m.w. over 200 kDa</i>	Bash i/and Milgrom	1972
	BgA1	beta-globuliny o m. cz. ok. 160 kDa <i>beta-globulins with m.w. about 160 kDa</i>	Skiba i/and Węgrzyn	1976
	BgB1, BgC1		Skiba i in./et al.	1977
	B1	beta-globulina o m. cz. ok. 160 kDa, cecha wspólna owiec i bydła <i>beta-globulin with m.w. about 160 kDa, trait shared by sheep and cattle</i>	de Benedictis	1979
	BmgA1 BmiA1	beta-makroglobulina o m. cz. ponad 200 kDa <i>beta-macroglobulin with m.w. over 200 kDa</i> beta-mikroglobulina o m. cz. ok. 100 kDa <i>beta-microglobulin with m.w. about 100 kDa</i>	Skiba i in./et al.	1994
	BmgB1	beta-makroglobulina o m. cz. ponad 200 kDa <i>beta-macroglobulin with m.w. over 200 kDa</i>	Skiba i/and Węgrzyn	1999
beta-lipoproteidy <i>beta-lipoproteins</i>	Lps1	lipoproteid o niskiej gęstości <i>low-density lipoprotein</i>	Rapacz i in./et al.	1972
	Lp(1)	lipoproteid o m. cz. powyżej 200 kDa <i>lipoprotein with m.w. above 200 kDa</i>	Curtain	1971
	G	lipoproteid o m. cz. poniżej 160 kDa <i>lipoprotein with m.w. below 160 kDa</i>	Bash i/and Milgrom	1972
gamma-globuliny <i>gamma-globulins</i>	IgG1 _A Ig1(1), Ig1(2) Ig2(1)	immunoglobulina podklasy IgG1 _A , Fc subclass IgG1 _A , Fc immunoglobulin <i>immunoglobulins class IgG1, Fc immunoglobulins subclass IgG2 immunoglobulin</i>	Curtain	1969
	A1	immunoglobulina podklasy IgG3 subclass IgG3 immunoglobulin	Capparelli i in./et al.	1982
	IghgA1 IghgA2	immunoglobuliny klasy IgG <i>class IgG immunoglobulin</i>	Skiba i/and Węgrzyn	1993
	IghmA2	immunoglobulina klasy IgM <i>class IgM immunoglobulin</i>		

systemy obronne jagniąt, jak też zaabsorbowanych z siary (Węgrzyn, 1978).

Badania prowadzone w Instytucie Zootechniki PIB objęły również określenie zależności pomiędzy występowaniem antygenowych markerów immunoglobulin osocza a wrażliwością na zapalenia gruczołu mlekowego u macio-

rek owcy żelaźnieńskiej (Charon i in., 1996) oraz linii plenno-mlecznej (Krzyścin, 2007). Wykazano korelację występowania dwóch epitopów IgG (IghgA1, IghgA2) z korzystnym stanem zdrowotnym wymion, co wskazuje na możliwość uznania tych markerów za wskaźniki niewrażliwości owiec na *mastitis*.

Literatura

- Bash J.A., Milgrom F. (1972). Studies on allotypes in sheep. *Int. Arch. Allergy*, 42: 196–214.
- Charon K., Lipecka C., Siudek T., Świderek W., Skiba E. (1996). Relationship between transferrin and globulin antigen polymorphism and sheep resistance to *mastitis*. *J. Appl. Genet.*, 37 (2): 161–172.
- Hein W.R. (1995). Sheep as experimental animals for immunological research. *The Immunologist*, 3/1: 12–18.
- Krzyścin P. (2004). Antygenowe markery immunoglobulin jako wskaźniki fizjologicznych niedoborów przeciwciał u jagniąt. *Zesz. Nauk. PTZ, Prz. Hod.*, 72 (3): 9–14.
- Krzyścin P. (2005). Antigenic markers of blood plasma globulins for diagnosing mastitis resistance in sheep. *Med. Wet.*, 61, 35.
- Krzyścin P. (2006). Antigenic markers of sheep plasma globulins in predicting resistance to mammary gland infections. *Ann. Anim. Sci.*, 6, 2: 239–248.
- Krzyścin P. (2007). Epitopes of blood serum proteins as indicators of sheep susceptibility to mastitis. *Ann. Anim. Sci., Suppl.*, 1: 63–67.
- Krzyścin P., Korman K. (2008). Two epitopes of blood serum immunoglobulins as indicators of physiological antibody deficiency in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 9, 1: 27–33.
- Krzyścin P., Skiba E., Węgrzyn W. (2002 a). Epitopes in beta-globulin absorption and BGA1 and BMIA1 gene expression studies in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 2 (2): 51–58.
- Krzyścin P., Skiba E., Węgrzyn W. (2002 b). Expression of IgG immunoglobulin heavy chain *IGHGA1* and *IGHGA2* genes and absorption and catabolism of these proteins in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 2 (1): 101–111.
- O'Brien S. J. (1992). Mammalian genome mapping: Lessons and prospects. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1: 105–111.
- Skiba E. (2002). Ekspresja genów alfa-globulin, beta-globulin i łańcuchów ciężkich immunoglobulin klasy IgG oraz synteza, absorpcja i katabolizm tych białek u cieląt. *Rozpr. hab., Instytut Zootechniki, Kraków*, 16; 56 ss.
- Skiba E., Węgrzyn J. (1993). IgG and IgM antigenic markers in sheep. *Gen. Pol.*, 34: 345–355.
- Skiba E., Węgrzyn J., Żaba D., Kaczor U., Krzyścin P. (2000). The use of antigenic markers for analysing the occurrence of proteins in sheep blood and colostrum. *Ann. Anim. Sci.*, 27 (2): 19–26.
- Steppa R. (1999). Dystans genetyczny pomiędzy matczynymi liniami owiec. *Zesz. Nauk. PTZ*, 43: 315–321.
- Węgrzyn J. (1978). Występowanie immunoglobulin podklasy IgG1 u cieląt. *Rozpr. hab., Instytut Zootechniki, Kraków*; 52 ss.
- Węgrzyn J., Skiba E., Kaczor U. (2001). Expression of IgM immunoglobulin heavy chain *IGHMA2* gene and absorption and catabolism of these proteins in lambs. *Ann. Anim. Sci.*, 1 (2): 45–52.
- Węgrzyn J., Skiba E., Krzyścin P. (2002). Ekspresja genów *BGB1*, *BGC1* i *BMGA1* oraz synteza beta-globulin i beta-makroglobulin z epitopami BgB1, BgC1 i BmgA1 u jagniąt. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 29, 2: 39–48.

EPITOPES OF BLOOD PLASMA GLOBULINS IN SHEEP AS MARKERS OF PROTEINS AND GENES IN PHYSIOLOGICAL, MOLECULAR AND GENETIC RESEARCH

Summary

Epitopes – the active sites on protein molecules – are class I antigenic markers that stimulate the immune system to produce an immune response. This ability as well as the highly specific nature of the antigen-antibody reaction provided a basis for the development of research on the antigenic polymorphism of blood serum proteins. Over the past several dozen years, this research involved the determination of successive plasma antigens in sheep by investigating the genetic background and physicochemical characteristics of the molecules carrying these markers. Current focus is on the use of antigenic determinants as “genetic tools” useful, e.g. in analysis of expression, linkages, mapping of genes that determine proteins, and their relationships with the genes controlling major production traits (as gene markers), as well as in physiological studies for observation of globulin synthesis, absorption and catabolism, or their physiological deficiency (as protein markers) early in the life of lambs.



fot. B. Borys