

Received: 2009.04.24  
Accepted: 2009.05.26  
Published: 2009.06.04

## Dlaczego u człowieka i małp wąskonosych nie ma epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal, którego obecność u zwierząt jest związana z odrzucaniem ksenoprzeszczepów u ludzi?\*

Why humans and Catarrhini lack the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope, related to xenograft rejection?

Anna Suchanowska<sup>1</sup>, Marcin Czerwiński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

<sup>2</sup> Wydział Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii, Politechnika Opolska

### Streszczenie

Epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R), którego synteza jest katalizowana przez  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę ( $\alpha$ 1,3GT), jest strukturą cukrową powszechnie występującą na powierzchni komórek większości ssaków z wyjątkiem wyższych naczelnych: małp człekokształtnych, małp makakowatych i ludzi. Organizmy gatunków, które nie mają epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal, wytwarzają naturalne przeciwciała skierowane przeciw antygenowi Gal $\alpha$ 1-3Gal. Obecność tych przeciwciał u ludzi jest główną przeszkodą w wykonywaniu przeszczepów odzwierzęcych. Brak antygeny Gal $\alpha$ 1-3Gal jest spowodowany inaktywacją genu kodującego  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę. W genomie człowieka i małp bezogoniastych obecny jest pseudogen o sekwencji homologicznej do sekwencji genu kodującego  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę, zawierający wiele mutacji punktowych oraz delecji, które zmieniają ramę odczytu. U człowieka występuje kilka wariantowych form mRNA tego genu, z których większość nie zawiera eksonu kodującego region katalityczny. Skutkiem tych zmian jest brak aktywnego białka.

Słowa kluczowe:

epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal •  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferaza • pseudogen • *GGTA1* • ksenoprzeszczep

### Summary

The Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R) is an oligosaccharide determinant present on the cell surface of most mammalian species with the exception of the higher primates, including Old World monkeys, apes, and humans. The synthesis of Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope is catalyzed by  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT). Inactivation of the  $\alpha$ 1,3GT gene in humans and the production of natural anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies against the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope has resulted in the formation of a unique immunological barrier that prevents the transplantation of tissues and organs from Gal $\alpha$ 1-3Gal-positive animals to humans. The gene encoding  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase in higher primates is inactive due to point mutations and deletions leading to a change of reading frame. The human transcript of this gene consists of several splicing variants, most of which does not contain an exon encoding the catalytic domain. Thus no active protein is produced.

Key words:

Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope •  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase • pseudogene • *GGTA1* • xenotransplant

\* Praca została przygotowana w ramach projektu grantowego nr N N302 118835 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=887414>

**Word count:** 2937

**Tables:** 1

**Figures:** 3

**References:** 43

**Adres autora:** doc. dr hab. Marcin Czerwiński, Zakład Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: [czerwinski@iitd.pan.wroc.pl](mailto:czerwinski@iitd.pan.wroc.pl)

**Wykaz skrótów:**  **$\alpha 1,3GT$**  –  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferaza; ***GGTA1*** – gen kodujący glikozylotransferazę UDP-Galaktozo:  $\beta$ -galaktozylo –  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę ( $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę); **UPG** – nieprzetworzony pseudogen; **PPG** – przetworzony pseudogen; **pz** – para zasad.

## WPROWADZENIE

Epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal (zwany też  $\alpha$ Gal; Gal $\alpha 1$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc-R) występuje u bakterii i pierwotniaków, a także u ssaków, w tym niższych naczelnych (*Strepsirrhini*, naczelnne zamieszkujące Madagaskar i Komory, np. lemur wari, maki złoty, galago), wykakowatych (*Tarsiidae*, drapieżne naczelnne zamieszkujące Azję Południowo-Wschodnią, np. wykak upiór) i małp Nowego Świata (*Platyrrhini*, małpy szerokonose występujące w Ameryce Południowej i Środkowej, np. kapucynka czubata, wyjec czarny). Epitop ten jest nieobecny u małp wąskonosych (*Catarrhini*), w tym u małp makakowatych, zwanych też ogoniastymi (*Cercopithecidae*, np. makak, pawian), małp człekokształtnych, zwanych też małpami Starego Świata lub bezogoniastymi (*Hominoidea*, np. szympan, goryl, orangutan, gibbon) i ludzi. Epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal występuje na glikolipidach i glikoproteinach erytrocytów, a także komórek nabłonka układu naczyniowego, błony śluzowej przewodu pokarmowego i narządu nosowo-leńmieszkowego [20]. Nieobecność tego epitopu jest skutkiem ewolucyjnych zmian, w wyniku których gen kodujący  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę (*GGTA1*) przestał kodować białko zdolne do biosyntezy epitopu Gal $\alpha 1$ -3Gal [12].

## $\alpha 1,3$ -GALAKTOZYLOTANSFERAZA

Epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal jest syntetyzowany przez  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę (UDP-Galaktozo:  $\beta$ -galaktozylo- $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę,  $\alpha 1,3GT$ , EC 2.4.1.151). Enzym ten katalizuje przeniesienie reszty galaktozy z UDP-Gal na glikosfingolipidy lub glikoproteiny zawierające końcowe reszty Gal $\beta 1$ -4GlcNAc-R, przyłączając ją wiązaniem  $\alpha 1$ -3 [2] (ryc. 1).  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferaza zaliczana jest do rodziny szóstej glikozylotransferaz (GT6).

Enzymy należące do tej rodziny przenoszą resztę galaktozy lub N-acetylogalaktozaminy z urydylofosforanu na łańcuchy cukrowe z utworzeniem wiązania  $\alpha 1$ -3 [15].  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferaza zaliczana jest do transferaz zachowujących („retaining”) konfigurację anomeryczną reszty cukrowej związanej z nukleotydem. W tym przypadku enzym zachowuje konfigurację, która jest obecna w cząsteczce UDP-D-galaktozy.

$\alpha 1,3$ -galaktozylotransferaza, podobnie jak inne glikozylotransferazy, jest białkiem transmembranowym typu II. Zbudowana jest z krótkiego N-końcowego odcinka cytoplazmatycznego, domeny transmembranowej i części

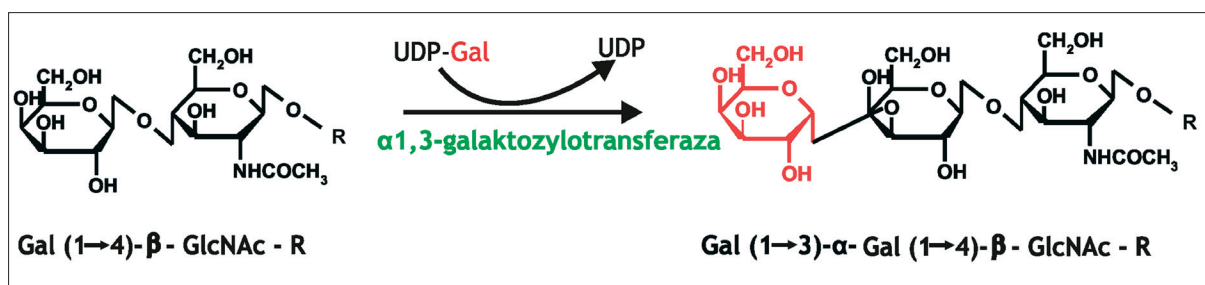
C-końcowej zawierającej centrum aktywne enzymu, skierowanej do światła aparatu Golgiego [29].

## KLINICZNE ZNACZENIE ANTYGENU $\alpha$ GAL I PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL

Ssaki naczelnne, których komórki nie mają na powierzchni epitopu Gal $\alpha 1$ -3Gal, wytwarzają naturalne przeciwciała skierowane przeciwko tej determinancie. Stanowią one około 1% przeciwciał IgG występujących w osoczu ludzi [10]. Przeciwciała te powstają w wyniku kontaktu z drobnoustrojami, a prawdopodobnie także z żywnością [28]. Wykazują one podobieństwo do izoaglutynin anty-A i anty-B występujących u ludzi w przypadku nieobecności determinanty A lub B (antygenów układu grupowego ABO). Wykazano, że u osób chorych na choroby pasożytnicze, takie jak choroba Chagasa, leishmanioza lub malaria, występuje podwyższone stężenie przeciwciał anty-Gal $\alpha 1$ -3Gal, co sugeruje rolę tych przeciwciał w obronie przed pasożytami [1,33].

Inaktywacja genu kodującego  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę u ludzi oraz wytwarzanie naturalnych przeciwciał rozpoznających determinantę Gal $\alpha 1$ -3Gal tworzą barierę immunologiczną, która jest główną przeszkodą w wykonywaniu przeszczepów odzwierzęcych, ponieważ przeciwciała anty-Gal $\alpha 1$ -3Gal są odpowiedzialne za ostre odrzucanie ksenoprzeszczepów pochodzących od dawców Gal $\alpha 1$ -3Gal-pozytywnych [6]. Odrzucenie ksenoprzeszczepu jest wynikiem lizy komórek w wyniku aktywacji dopełniacza oraz niszczenia komórek przez makrofagi i komórki NK w wyniku cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity) [29]. Medyczne i etyczne powody uniemożliwiają użycie organów pochodzących od innych naczelnnych, dlatego też prowadzi się badania pozwalające na transplantację organów pochodzących od świni. Zwierzęta te są potencjalnie najlepszymi dawcami organów ze względu na podobny do ludzkich rozmiar narządów [34]. Obecność u ludzi przeciwciał anty-Gal $\alpha 1$ -3Gal, które rozpoznają epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal obecny na powierzchni komórek świni wywołuje ostrą odpowiedź układu odpornościowego i prowadzi do odrzucenia przeszczepionego narządu [9].

Podejmowane są próby tworzenia zwierząt transgenicznych przez zablokowanie genu kodującego  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę. Sharma i wsp. wykazali, że komórki homozygotycznej świni, pomimo inaktywacji genu *GGTA1*, mają na powierzchni epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal, co świad-



Ryc. 1. Schemat reakcji katalizowanej przez  $\alpha 1,3$ -galaktotransferazę (glikozylotransferazę UDP-Galaktozo:  $\beta$ -galaktotyl- $\alpha 1,3$ -galaktotylotransferazę, EC 2.4.1.151)

Tabela 1. Geny kodujące  $\alpha 1,3$ -galaktotransferazę

| Gen          | Alternatywna nazwa | Lokalizacja | Obecność intronów | GenBank   | Ensembl      |
|--------------|--------------------|-------------|-------------------|-----------|--------------|
| <i>GGTA1</i> | <i>UPG</i>         | 9q33-q34    | tak               | AL359644  | ENSG00000020 |
| <i>GGA1P</i> | <i>PPG</i>         | 12q14-q15   | nie               | NG_002767 | —            |

czy o tym, że  $\alpha 1,3$ -galaktotransferaza nie jest jedynym enzymem zdolnym do syntezy epitopu Gal $\alpha 1$ -3Gal [35]. Enzymem, który prawdopodobnie odpowiada za syntezę połączenia Gal $\alpha 1$ -3Gal u zwierząt z inaktywowanym genem *GGTA1*, jest syntaza glikosfingolipidu iGb3, która również należy do rodziny szóstej glikozylotransferaz [30]. Izoglobozyd iGb3 jest neutralnym glikosfingolipidem o wzorze strukturalnym GalNAc $\beta 1$ -3Gal $\alpha 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc $\beta 1$ -Ceramid. U człowieka enzym ten jest nieaktywny w wyniku mutacji obecnych w regionie katalitycznym [5].

#### GENY KODUJĄCE $\alpha 1,3$ -GALAKTOZYLOTANSFERAZE

W genomie człowieka występują dwa homologiczne geny kodujące  $\alpha 1,3$ -galaktotransferazę, umiejscowione na chromosomach 9 i 12. Oba zawierają kilka mutacji zmieniających ramę odczytu i powodujących powstanie przedwczesnego kodonu stop oraz wiele mutacji, które powodują zmianę reszt aminokwasowych. Gen umiejscowiony na chromosomie 9 (9q33-q34) wykazuje taką samą organizację ekson-intron jak aktywny gen  $\alpha 1,3$ -galaktotransferazy. Gen ten nazywany jest *GGTA1*, *HGT-10* lub *UPG* (unprocessed pseudogene, nieprzetworzony pseudogen). Gen na chromosomie 12 (12q14-q15) powstał w wyniku przekształcenia pozbawionej intronów cząsteczki mRNA kodującej  $\alpha 1,3$ GalT w cDNA, a następnie wbudowania tej cząsteczki do chromosomu 12. Gen ten zawiera wszystkie eksony występujące w genie *GGTA1* u gatunków, które mają epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal i nazywany jest *GGTA1P* lub *PPG* (processed pseudogene, przetworzony pseudogen) [18]. Podsumowanie danych na temat genów kodujących  $\alpha 1,3$ -galaktotransferazę umieszczono w tabeli 1.

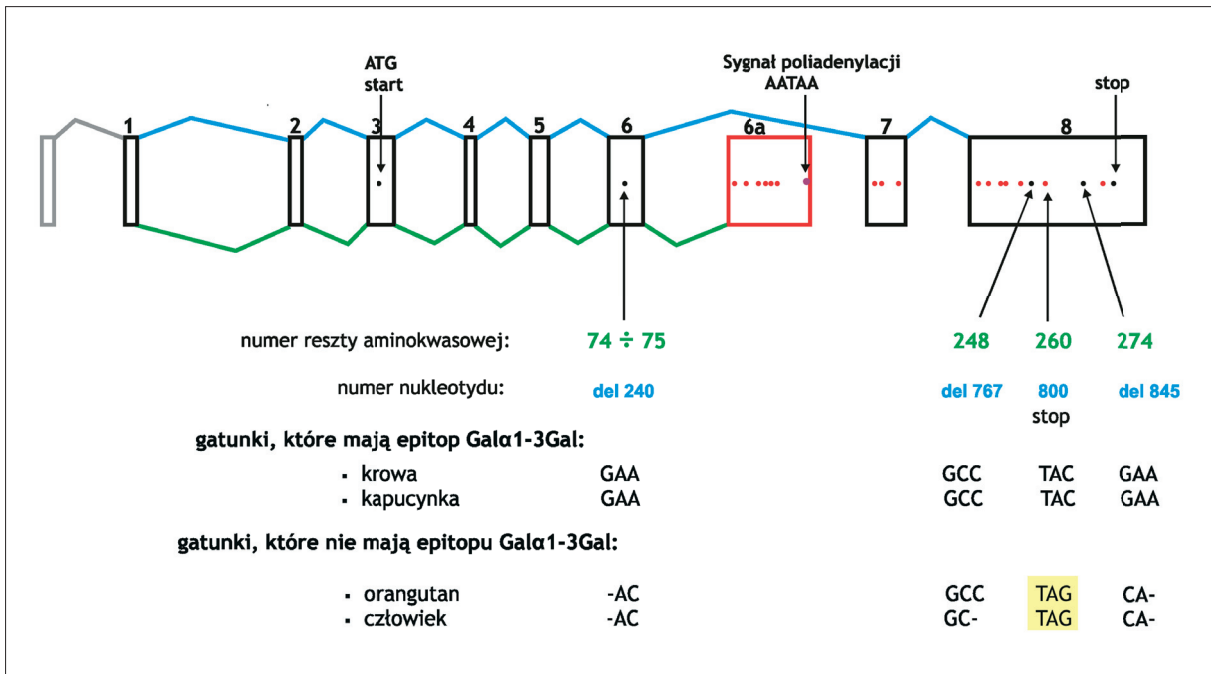
Numeracja sekwencji genu *GGTA1* u różnych gatunków jest trudna, ponieważ geny człowieka i małp wąskosnych zawierają insercje, które są nieobecne w genach kodujących aktywne białka. Dlatego w niniejszej pracy zastosowano numerację reszt aminokwasowych taką jak w genie krowy (standardowy gen kodujący aktywne białko), natomiast nukleotydy numerowane są tak jak w genie ludzkim. Należy zwrócić uwagę, że podział intronów i ekso-

nów w sekwencji zamieszczonej w bazie danych Ensembl jest taki jak w publikacji Lanteri i wsp. [22].

#### MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA GENU *GGTA1*

U gatunków, u których występuje epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal, gen kodujący  $\alpha 1,3$ -galaktotransferazę składa się z dziewięciu eksonów, z których pierwsze trzy nie ulegają translacji. Ekson 9 koduje największą część regionu katalitycznego enzymu. U gatunków, które nie mają epitopu Gal $\alpha 1$ -3Gal, ekson 1 nie występuje. Długość łańcucha polipeptydowego u gatunków, które mają epitop Gal $\alpha 1$ -3Gal, wynosi około 370 reszt aminokwasowych. Homologia sekwencji aminokwasowych części katalitycznej genów kodujących aktywne enzymy wynosi około 70% [41].

Mutacje w eksonie 6 i 8, a zwłaszcza przedwczesna terminacja łańcucha polipeptydowego, są głównymi przyczynami powodującymi utratę aktywności enzymu [23]. Największe znaczenie mają delecje; w porównaniu do genu krowy, który koduje aktywne białko, u człowieka, goryla i szympansa znajdują się trzy jednonukleotydowe delecje, a u orangutana dwie [22]. Jeżeli przyjmiemy jako początek genu pierwszy nukleotyd z kodonu ATG, to delecje te są umiejscowione w pozycji 240 (ekson 6) oraz 767 i 845 (ekson 8; numeracja według sekwencji genu człowieka). Delecja w pozycji 240 znajduje się we fragmencie eksonu 6, który nie ma odpowiednika w eksonie krowy; fragment ten jest insertem znajdującym się między 74 a 75 resztą aminokwasową genu krowy. Następne delecje odpowiadają resztom aminokwasowym 248. i 274. w sekwencji genu krowy (ryc. 2) [22]. Delecje w pozycjach 240, 767 i 845 występują u człowieka i szympansa, natomiast u orangutana nie ma delecji 767. Delecja w pozycji 240 zmienia ramę odczytu, co prowadzi do inaktywacji domeny katalitycznej białka [23] oraz powoduje pojawienie się trzech kolejnych kodonów stop w pozycjach 106, 108 i 139 (ekson 7) oraz dalszych pięciu w pozycjach 156, 184, 208, 211, 247 (ekson 8). Dodatkowo w eksonach 6, 7 i 8 obecne są liczne mutacje, które powodują zmianę reszt aminokwasowych, z tym że nie mają one znaczenia z powodu wcześniejszej



Ryc. 2. Schemat budowy ludzkiego genu *GGTA1* wraz z wariantami splicingowymi i delecjami powodującymi zmianę ramy odczytu. Czerwonymi kropkami zaznaczono przedwczesne kodony stop. Zaznaczono też kodon stop w pozycji 260, który był prawdopodobną przyczyną utraty aktywności białka kodowanego przez gen *GGTA1*. U gatunków, które nie mają epitopu Galα1-3Gal, występuje dodatkowy ekson niepodlegający translacji, zaznaczony szarym kolorem. Dodatkowy ekson 6a, obecny u ludzi i małp wąskonosych, zaznaczono czerwonym kolorem. Numeracja nukleotydów według genu człowieka, numeracja reszt aminokwasowych według genu krowy

zmiany ramy odczytu. Wszystkie te mutacje powodują, że transkrypt zawierający wszystkie eksony nie może kodować białka o aktywności enzymatycznej. Sekwencja nukleotydowa 5'-fragmentu eksonu 8 o długości 370 pz człowieka wykazuje jedną różnicę w stosunku do sekwencji odpowiedniego genu szympansa, 10 różnic w stosunku do sekwencji orangutana, 23 różnice w stosunku do sekwencji wyjca i 46 różnic w stosunku do sekwencji krowy [12]. Istnieje teoria, że gen *GGTA1* przestał kodować aktywne białko w wyniku pojawienia się kodonu stop w pozycji 260 w eksonie 8 (nukleotyd 800 u człowieka) [17].

Transkrypt genu *GGTA1* u człowieka powinien zawierać 8 eksonów, jednak transkryptu takiego nie udało się sklonować z mRNA człowieka ani małp Starego Świata [19,22]. Sklonowano natomiast i zbadano sekwencję transkryptu, który zawiera eksony 1–6 oraz dodatkowy region na 3'-końcu o długości 801 nukleotydów. Sekwencja tego regionu jest homologiczna do środkowej części intronu 6 (od 4262 do 5063 nukleotydów), którą na potrzeby tej pracy można nazwać eksonem 6a [22]. Ten fragment genu zawiera konsensusowy sygnał poliadenylacji (AATAA, od pozycji 5039), w wyniku czego następuje przyłączenie ogona poly (A) do 3'-końca jądrowego mRNA, natomiast sekwencja splicingowa na 5'-końcu nie jest kanoniczna (AGCT). Wydaje się, że do terminacji transkryptu α1,3GalT dochodzi w wyniku działania wewnątrzintronowego sygnału poliadenylacji, który jest obecny w intronie siódmym. Następnie środkowy fragment tego intronu (od 4361 do 5163 nukleotydów) jest dołączany do eksonu szóstego [22]. Ekson 6a zawiera kodon stop (TGA) w pozycji 4265, czyli na 5'-końcu. Schemat wszystkich eksonów genu *GGTA1* wraz z możliwymi formami splicingu, delecjami i kodonami stop przedstawiono na ryc. 2.

W bazie danych GenBank UniGene EST (Expressed Sequence Tag) znajdują się sekwencje 49 transkryptów homologicznych do genu *GGTA1* człowieka. Większość z tych sekwencji zawiera eksony 1–6a, a tylko dwie zawierają eksony 1–8. Sugeruje to, że w czasie alternatywnego składania powstają oba typy mRNA, w skład których wchodzi eksony 1–8 i 1–6a, z tym że transkrypt 1–8 zostaje zdegradowany, prawdopodobnie w wyniku procesu degradacji mRNA niosącego przedwczesny kodon stop (NMD – nonsense-mediated mRNA decay). Jest to proces kontroli jakości mRNA, który powoduje zniszczenie cząsteczek mRNA zawierających przedwczesne kodony stop (PTC – premature termination codon). Dzięki temu mechanizmowi z transkryptów zawierających PTC nie powstają skrócone białka, które mogłyby być szkodliwe dla komórki [8]. Za przedwczesny kodon stop uważa się taki kodon stop, który znajduje się 50 pz lub dalej od miejsca splicingu na 3' końcu ostatniego eksonu [25].

Uważa się, że w procesie NMD za rozpoznanie przedwczesnych kodonów stop odpowiadają białka kompleksów połączeń między eksonami (EJC – exon junction complex) oraz białka rodziny UPF, które aktywują mechanizm degradacji mRNA. Białka EJC w czasie składania transkryptu umiejscawiają się nieco powyżej każdego miejsca łączenia eksonów i opuszczają jądro razem z mRNA. Rybosom, przesuując się po mRNA w czasie translacji, usuwa takie kompleksy. Jeżeli kodon stop pojawi się w eksonie, który nie jest ostatni, kompleks EJC nie zostanie usunięty z mRNA po pierwszej rundzie translacji, w wyniku czego nastąpi przyłączenie czynników UPF [24]. Jeżeli jednak kodon stop występuje w ostatnim eksonie, ale pojawi się zbyt wcześnie, to długi nieulegający translacji fragment 3'

może spowodować wiązanie czynników UPF, a w konsekwencji destabilizację i degradację mRNA. W tym przypadku NMD jest przede wszystkim skutkiem przedwczesnego uwolnienia rybosomów z mRNA, a czynnikiem, który może do tego nie dopuścić jest szybka recykulacja podjednostek rybosomów oraz czynników uwalniających. To z kolei jest możliwe tylko wtedy, kiedy kodon stop jest położony niedaleko od ogona poli-A [3].

W przypadku ludzkiego genu *GGTA1*, transkrypt składający się z eksonów 1–8 zawiera przedwczesny kodon stop w eksonie 7 (który jest przedostatni), co w świetle powyższych uwag może uruchomić mechanizm NMD i spowodować degradację takiego transkryptu. W tej sytuacji większość wykrywalnych transkryptów genu *GGTA1* byłaby jego alternatywnie złożoną formą, składającą się z eksonów 1–6 oraz dodatkowego eksonu 6a. Zależność między alternatywnym składaniem i NMD omówili Moore i Proudfoot [31]. Warunkiem, który musi być spełniony, aby alternatywne składanie mogło zaistnieć, są słabe (niekanoniczne) sygnały splicingowe i długość intronu: im intron dłuższy, tym większe prawdopodobieństwo, że zostanie z niego „wykrojony” dodatkowy ekson [40]. W przypadku genu *GGTA1*, sygnał splicingowy na 5'-końcu eksonu 6a jest niekanoniczny; ponadto intron 6 ma długość 7822 pz, jest więc dłuższy niż przeciętny ludzki intron, którego długość wynosi około 3400 pz [7]. Można zaryzykować hipotezę, że degradacja mRNA genu *GGTA1* zawierającego eksony 1-8 wpływa na spowolnienie transkrypcji, co z kolei umożliwia rozpoznanie słabych sygnałów splicingowych, a tym samym włączanie eksonu 6a. Sygnałem, który prawdopodobnie spowalnia transkrypcję, mogą być fragmenty mRNA [42]. Takie sprzężenie zwrotne między translacją, transkrypcją i składaniem mRNA było już wcześniej sugerowane [14,16]. Przykładem wpływu przedwczesnego kodonu stop na zmianę formy alternatywnego slicingu może być iduronidaza, enzym biorący udział w degradacji siarczanu heparanu. Mutacje w genie kodującym ten enzym powodują mukopolisacharydozę typu I (chorobę Hurlera). Wykazano, że usunięcie przedwczesnego kodonu stop powoduje pojawienie się w transkrypcie dodatkowego eksonu, który zawiera ten kodon [26].

Powstaje pytanie, dlaczego transkrypt zawierający eksony 1–6a nie ulega degradacji, mimo że w eksonie 6a znajduje się kodon stop, który można nazwać przedwczesnym według przedstawionych wyżej kryteriów. Prawdopodobnie główną rolę odgrywa tu sygnał poliadenylacji, który powoduje, że transkrypt kończy się na eksonie 6a, a tym samym wszystkie kompleksy EJC zostają usunięte przez rybosom. Dość duża odległość między tym sygnałem i kodonem stop (około 800 pz) najwyraźniej nie powoduje w tym przypadku uruchomienia mechanizmu NMD. Należy zauważyć, że w bazie danych sekwencji EST krowy wśród 70 transkryptów nie ma ani jednego transkryptu zawierającego ekson 6a, co sugeruje, że w tym przypadku do alternatywnego splicingu nie dochodzi.

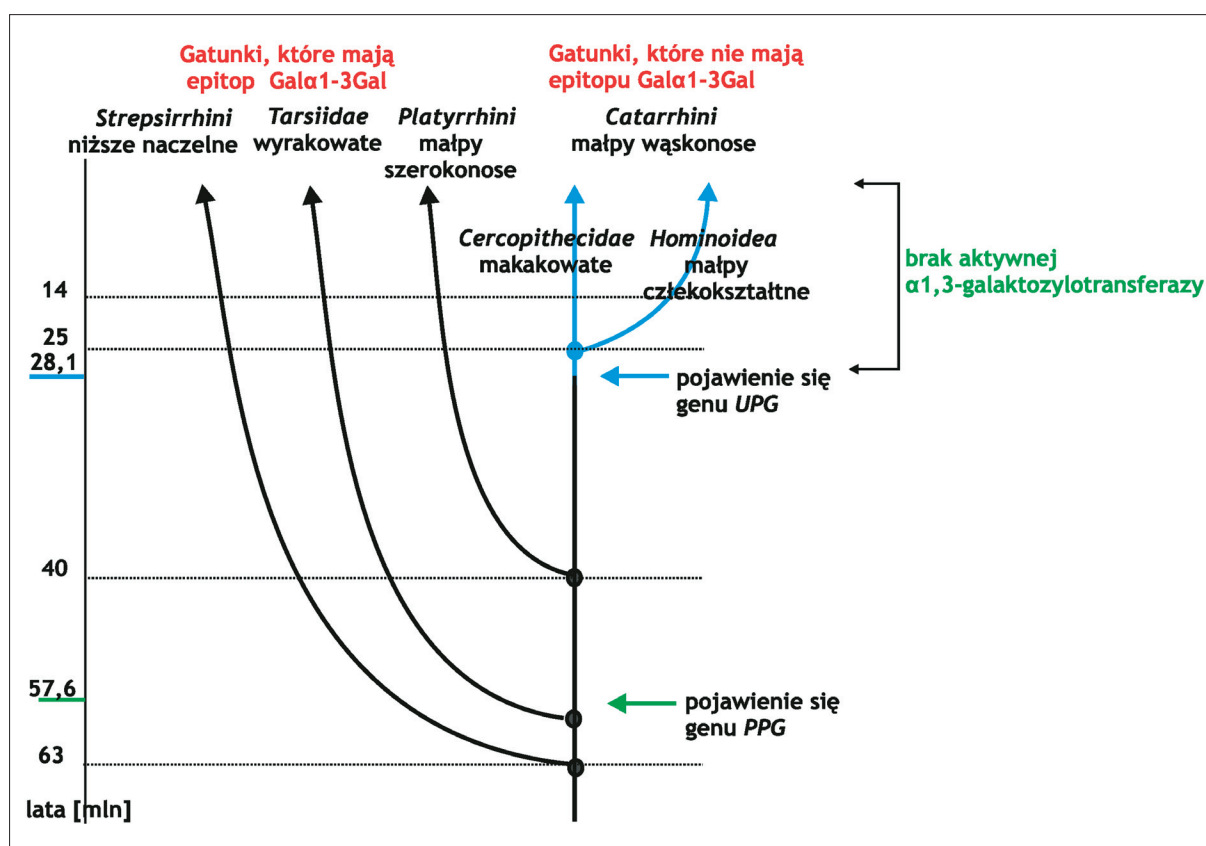
W genomie człowieka znajduje się pseudogen homologiczny do genu *GGTA1*, który również koduje enzym należący do rodziny 6 glikozyłotransferaz. Jest to gen kodujący syntetazę Forssman, która katalizuje przyłączenie N-acetylogalaktozamininy do N-acetylogalaktozamininy z utworzeniem wiązania  $\alpha$ 1–3 [43]. Taka struktura cukrowa

obecna na glikolipidach, nazywana antygenem Forssman, występuje na powierzchni komórek wielu gatunków kręgowców (np. kura, szczur, pies). Struktura antygeny Forssman to GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Ceramid. U człowieka oraz małp wąskonosych antygen ten nie występuje, a przyczyną są wielokrotne mutacje punktowe obecne w genie kodującym syntetazę Forssman. U człowieka gen ten składa się z 7 eksonów; przy czym (w przeciwieństwie do genu *GGTA1*) w transkrypcie obecne są wszystkie eksony [4]. Kodon stop znajduje się w eksonie 7, w miejscu homologicznym do kodonu stop w genie psa, nie ma natomiast dodatkowych kodonów stop ani delecji powodujących zmianę ramy odczytu [43]. W bazie danych GeneBank UniGene EST znajdują się sekwencje 98 transkryptów homologicznych do genu kodującego syntetazę Forssman, z czego większość zawiera eksony 1–7. Sugeruje to, że w komórkach obecny jest pełny transkrypt genu, który może pełnić jakąś rolę biologiczną [4]. Można więc wysunąć hipotezę, że w tym przypadku alternatywny splicing oraz mechanizm NMD nie występują, a przyczyną jest brak przedwczesnego kodonu stop.

### EWOLUCJA GENU *GGTA1*

Epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal nie jest obecny u ryb, płazów, gadów i ptaków. Uważa się, że struktura ta pojawiła się około 125 milionów lat temu, zanim nastąpiła dywergencja torbaczy i ssaków łżyskowych (obie te grupy mają epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal) [29]. Strukturalne podobieństwo między genem *GGTA1* i genem *ABO*, który koduje antygeny grupowe krwi A i B wskazuje, że oba te geny powstały w wyniku duplikacji jednego genu [17,36]. Ewolucyjną historię genu kodującego  $\alpha$ 1,3-galaktozyłotransferazę zaproponowali Koike i wsp. [20]. Zgodnie z ich hipotezą, gen *GGTA1* zachował funkcjonalność u niższych naczelnych (*Strepsirrhini*) i małp szerokonosych (*Platyrrhini*). Około 58 milionów lat temu, po rozdzieleniu się przodków małp i wyrakowatych, z genu *GGTA1* powstał w wyniku retropozycji pseudogen pozbawiony intronów (processed pseudogen, *PPG* albo *GGTA1P*). Prawdopodobnie gen ten nie mógł ulegać transkrypcji ze względu na nieobecność sekwencji regulatorowych. W przeciwieństwie do funkcjonalnego genu *GGTA1*, pozbawiony intronów gen *PPG* nie podlegał regułom selekcji naturalnej i zgromadził wiele mutacji punktowych. Około 28 milionów lat temu *GGTA1* utracił zdolność do kodowania aktywnego białka, prawdopodobnie w wyniku pojawienia się kodonu stop w pozycji 260, stał się pseudogenem (unprocessed pseudogene – *UPG*) i zaczęły się w nim gromadzić mutacje punktowe (ryc. 3).

Przyczyna, dla której jedyny znany przypadek utraty aktywności genu kodującego  $\alpha$ 1,3-galaktozyłotransferazę zdarzył się u naczelnnych, jest przedmiotem wielu kontrowersji. Wykazano, że zablokowanie genu *GGTA1* powoduje przedwczesną zamię u myszy [39], a świnię pozbawioną tego genu są małe, wątłe i trudne w hodowli [32]. Dane te sugerują, że gen *GGTA1* odgrywa ważną rolę w homeostazie gatunków Gal $\alpha$ 1-3Gal-pozytywnych. Pomimo to, utrata aktywności tego genu nastąpiła bez wyraźnej szkody dla organizmów małp wąskonosych, co może sugerować, że  $\alpha$ 1,3-galaktozyłotransferaza została zastąpiona przez inny enzym lub enzymy. Istnieje możliwość, że utrata antygeny Gal $\alpha$ 1-3Gal była związana z malejącym znaczeniem wężu



Ryc. 3. Schemat ewolucji genu *GGTA1*. Kolorem niebieskim zaznaczono gatunki, które mają niefunkcyjny gen *UPG* (nie zawiera intronów), zieloną strzałką zaznaczono niefunkcyjny gen *PPG* (zawiera introny). Według [20]

w aktywności życiowej tych zwierząt. Wykazano, że w nabłonku narządu nosowo-lemieszowego u szczurów (VNO – vomeronasal organ), organu, który bierze udział w wykrywaniu feromonów, występuje dużo epitopów Gal $\alpha$ 1-3Gal [37]. U małp wąskonosych i człowieka narząd ten uległ zanikowi, podobnie jak zdolność do wykrywania feromonów [13,27]. Zmniejszenie się zależności od węchu mogło być związane z pojawieniem się widzenia trójbarwnego, co odbywało się prawie jednocześnie z zanikiem narządu nosowo-lemieszowego [20]. Tak więc można przedstawić hipotezę, że utrata epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal mogła być skutkiem tego, że organizmy zaczęły być w większym stopniu zależne od wzroku, w związku z czym zmysł węchu (wraz z epitopami Gal $\alpha$ 1-3Gal) nie był już tak potrzebny.

Uważa się, że zniknięcie epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal było związane z silną presją ewolucyjną, której były poddane organizmy należące do naczelnych. Można zauważyć, że presja ta musiała zaistnieć tylko w Europie, Azji i Afryce (czyli w Starym Świecie), ponieważ naczelné Nowego Świata nie utraciły epitopu  $\alpha$ Gal. Przyczyną tej presji była prawdopodobnie obecność epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal na powierzchni patogenów [12,18]. Wykazano, że naturalne ludzkie przeciwciała anty-Gal $\alpha$ 1-3Gal wiążą się do lipopolisacharydów bakterii rodzajów *Escherichia*, *Neisseria*, *Klebsiella* i *Salmonella*, a także glikolipidów i glikoprotein pierwotniaków, takich jak *Trypanosoma*, *Leishmania* i *Plasmodium* [11]. W tym przypadku, obecność przeciwciał anty-Gal $\alpha$ 1-3Gal mogła odgrywać ważną rolę w obronie przeciwko tym patogenom [20].

Utrata epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal przez naczelné Starego Świata mogła być również korzystna z innych względów, ponieważ epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal oraz podobne do niego antygeny, obecne na powierzchni komórek, mogą stanowić determinanty rozpoznawane przez bakterie, wirusy lub pierwotniaki. Przykładem takich oddziaływań może być wiązanie endotoksyny z *Clostridium difficile* do epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal na powierzchni komórek nabłonka jelit u chomika [21]. Również w tym przypadku, utrata epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal mogła być korzystna z punktu widzenia obrony przed tym patogenem [29].

Interesującym przypadkiem „mikroewolucji”, w wyniku której nastąpiła utrata epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal, jest linia komórkowa CHO komórek jajnika chomika chińskiego (chinese hamster ovary). Organizmy tego gatunku, podobnie jak wszystkie gryzonie, mają na powierzchni komórek epitop Gal $\alpha$ 1-3Gal, ale hodowane w laboratoriach komórki CHO nie mają go [38]. Przyczyną tego jest prawdopodobnie to, że w latach sześćdziesiątych ub.w. do hodowli komórek używano ludzkiej surowicy, która zawierała przeciwciała anty-Gal $\alpha$ 1-3Gal. Spowodowało to wyselekcjonowanie komórek, które nie mają tego epitopu.

## PODSUMOWANIE

Brak epitopu Gal $\alpha$ 1-3Gal u wyższych naczelnych jest interesującym przykładem ewolucyjnego zaniku cechy, której obecność nie okazała się niezbędna. Pojawienie się przedwczesnego kodonu stop w genie kodujących  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę spowodowało dalsze zmiany w se-

kwencji i transkrypcji genu, których skutkiem jest brak białka kodowanego przez ten gen. Przedstawiona w niniejszej pracy teoria, zgodnie z którą przyczyną obecności u człowieka skróconego transkryptu genu *GGTA1* było pojawienie się przedwczesnego kodonu stop w eksonie 7, które uruchomiło mechanizm NMD oraz alternatywny splicing, nie została na razie potwierdzona doświadczalnie i stanowi naszą autorską hipotezę.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Almeida I.C., Milani S.R., Gorin P.A., Travassos L.R.: Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies. *J. Immunol.*, 1991; 146: 2394–2400
- [2] Blanken W.M., Van den Eijnden D.H.: Biosynthesis of terminal Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\alpha$ 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide  $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, 1985; 260: 12927–12934
- [3] Broga S., Wen J.: Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 107–113
- [4] Casals F., Ferrer-Admetlla A., Sikora M., Ramfrez-Soriano A., Marquès-Bonet T., Despiau S., Roubinet F., Calafell F., Bertranpetit J., Blancher A.: Human pseudogenes of the ABO family show a complex evolutionary dynamics and loss of function. *Glycobiology*, 2009; 19: 583–591
- [5] Christiansen D., Milland J., Mouhtouris E., Vaughan H., Pellicci D.G., McConville M.J., Godfrey D.I., Sandrin M.S.: Human lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. *PLoS Biol.*, 2007; 6: e172
- [6] Cooper D.K., Koren E., Oriol R.: Genetically engineered pigs. *Lancet*, 1993; 342: 682–683
- [7] Deutsch M., Long M.: Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acid. Res.*, 1999; 27: 3219–3228
- [8] Dzikiewicz A., Szwejkowska-Kulińska Z.: Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) – na straży jakości DNA. *Post. Bioch.*, 2006; 52: 390–398
- [9] Galili U.: Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol. Today*, 1993; 14: 480–482
- [10] Galili U., Rachmilewitz E.A., Peleg A., Flechner I.: A unique natural human IgG antibody with anti- $\alpha$ -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.*, 1984; 160: 1519–1531
- [11] Galili U., Shohet S.B., Kobrin E., Stults C.L., Macher B.A.: 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
- [12] Galili U., Swanson K.: Gene sequences suggest inactivation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase in Catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 7401–7404
- [13] Gilad Y., Przeworski M., Lancet D.: Loss of olfactory receptor genes coincides with the acquisition of full trichromatic vision in primates. *PLoS Biol.*, 2004; 2: E5
- [14] Gudikote J.P., Imam J.S., Garcia R.F., Wilkinson M.F.: RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005; 12: 801–809
- [15] Hennet T.: The galactosyltransferase family. *Cell Mol Life Sci.*, 2002; 59: 1081–1095
- [16] Iborra F.J., Jackson D.A., Cook P.R.: Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*, 2001; 293: 1139–1142
- [17] Joziassie D.H., Oriol R.: Xenotransplantation: the importance of the Gal $\alpha$ 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1455: 403–418
- [18] Joziassie D.H., Shaper J.H., Jabs E.W., Shaper N.L.: Characterization of an  $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 6991–6998
- [19] Koike C., Fung J.J., Geller D.A., Kannagi R., Libert T., Luppi P., Nakashima I., Profozich J., Rudert W., Sharma S.B., Starzl T.E., Trucco M.: Molecular basis of evolutionary loss of the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 10114–10120
- [20] Koike C., Uddin M., Wildman D.E., Gray E.A., Trucco M., Starzl T.E., Goodman M.: Functionally important glycosyltransferase gain and loss during catarrhine primate emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 559–564
- [21] Krivan H.C., Clark G.F., Smith D.F., Wilkins T.D.: Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc. *Infect. Immun.*, 1986; 53: 573–581
- [22] Lanteri M., Giordanengo V., Vidal F., Gaudray P., Lefebvre J.C.: A complete  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene is present in the human genome and partially transcribed. *Glycobiology*, 2002; 12: 785–792
- [23] Larsen R.D., Rivera-Marrero C.A., Ernst L.K., Cummings R.D., Lowe J.B.: Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:  $\beta$ -D-Gal(1,4)-D-GlcNAc  $\alpha$ (1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 7055–7061
- [24] Le Hir H., Séraphin B.: EJC at the heart of translational control. *Cell*, 2008; 133: 213–216
- [25] Lewis B., Green R., Brenner S.E.: Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 189–192
- [26] Li B., Wachtel C., Mirami E., Yahalom G., Friedlander G., Sharon G., Sperling R., Sperling J.: Stop codons affect 5' splice site selection by surveillance of splicing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 5277–5282
- [27] Liman E.R., Innan H.: Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 3328–3332
- [28] Lisowska E., Duk M.: Diversity of natural anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies in human serum. W: *The molecular immunology of complex carbohydrates*. red.: A.M. Wu; w druku
- [29] Macher B.A., Galili U.: The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1780: 75–88
- [30] Milland J., Christiansen D., Lazarus B.D., Taylor S.G., Xing P.X., Sandrin M.S.: The molecular basis for gal $\alpha$ 1,3gal expression in animals with a deletion of the  $\alpha$ 1,3galactosyltransferase gene. *J. Immunol.*, 2006; 176: 2448–2454
- [31] Moore M.J., Proudfoot N.J.: Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 2009; 13: 688–700
- [32] Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D., Boone J., Wells K.D., Chen S.H., Ball S., Specht S.M., Polejaeva I.A., Monahan J.A., Jobst P.M., Sharma S.B., Lamborn A.E., Garst A.S., Moore M., Demetris A.J., Rudert W.A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T.E., Dai Y., Ayares D.L.: Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003; 299: 411–414
- [33] Ravindran D., Satapathy A.K., Das M.K.: Naturally occurring anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies in human *Plasmodium falciparum* infections – a possible role for autoantibodies in malaria. *Immunol. Lett.*, 1988; 19: 137–141
- [34] Sachs D.H.: The pig as a xenograft donor. *Pathol Biol.*, 1994; 42: 217–219
- [35] Sharma A., Naziruddin B., Cui C., Martin M.J., Xu H., Wan H., Lei Y., Harrison C., Yin J., Okabe J., Mathews C., Stark A., Adams C.S., Houtz J., Wiseman B.S., Byrne G.W., Logan J.S.: Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*, 2003; 75: 430–436
- [36] Smolarek D., Krop-Wątopek A., Waśniowska K., Czerwiński M.: Molekularne podstawy układu grupowego ABO. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2008; 62: 4–17

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Pani Profesor Elwirze Lisowskiej za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi. Dziękujemy też Pani Doktor Małgorzacie Cebrat za owocne dyskusje.

- [37] Takami S., Getchell M.L., Getchell T.V.: Resolution of sensory and mucoid glycoconjugates with terminal alpha-galactose residues in the mucomicrovillar complex of the vomeronasal sensory epithelium by dual confocal laser scanning microscopy. *Cell Tissue Res.*, 1995; 280: 211–216
- [38] Takeuchi M., Inoue N., Strickland T.W., Kubota M., Wada M., Shimizu R., Hoshi S., Kozutsumi H., Takasaki S., Kobata A.: Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 7819–7822
- [39] Tearle R.G., Tange M.J., Zannettino L., Katerelos M., Shinkel T.A., Van Denderen B.J., Lonie A.J., Lyons I., Nottle M.B., Cox T., Becker C., Peura A.M., Wigley P.L., Crawford R.J., Robins A.J., Pearse M.J., d'Apice A.J.: The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*, 1996; 61: 13–19
- [40] Tian B., Pan Z., Lee J. Y.: Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res.*, 2007; 17: 156–165
- [41] Turcot-Dubois A.L., le Moullac-Vaidye B., Despiau S., Roubinet F., Bovin N., le Pendu J., Blancher A.: Long-term evolution of the CAZY glycosyltransferase 6 (ABO) gene family from fishes to mammals – a birth-and-death evolution model. *Glycobiology*, 2007; 17: 516–528
- [42] Wen J., Brogna S.: Nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 514–516
- [43] Xu H., Storch T., Yu M., Elliott S.P., Haslam D.B.: Characterization of the human Forssman synthetase gene. An evolving association between glycolipid synthesis and host-microbial interactions. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 29390–29398

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.