

IWONA WOJDA

*Zakład Immunobiologii
Instytut Biologii i Biochemii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: wojda@hektor.umcs.lublin.pl*

RÓŻNE STRATEGIE OSIĄGANIA PAMIĘCI IMMUNOLOGICZNEJ

WSTĘP

Pamięć immunologiczną definiujemy jako gotowość organizmu do sprawniejszej i efektywniejszej reakcji na ponowne zakażenie danym patogenem. Wiąże się ona ze specyficzną odpowiedzią na dany antygen, „wypracowaną” po pierwszym kontakcie. W powszechnym rozumieniu kojarzy się z nabyciem odporności, opartym na limfocytach pamięci immunologicznej, syntezie przeciwciał i nazwana jest odpornością adaptacyjną (nabytą, specyficzną). Tego typu odporność istnieje obok tzw. odporności wrodzonej, która gwarantuje natychmiastową, choć niespecyficzną reakcję i stanowi pierwszą linię obrony. W klasycznym rozumieniu odporność wrodzona pozbawiona jest elementów adaptacji w kontekście interakcji gospodarz-patogen (co dobrze odzwierciedla nazewnictwo obu typów odporności). Odporność adaptacyjna *sensu stricto*, pojawia się w procesie ewolucji bardzo późno, bo dopiero u kręgowców (BUCHMANN 2014). Oznacza to, że około 95% wszystkich gatunków zwierząt posiada jedynie mechanizmy odporności wrodzonej! Badania ostatnich dekad wykazały, że mimo to, nie są one pozbawione swego rodzaju „pamięci immunologicznej”. Przeżycie infekcji spowodowanej danym patogenem, może odcisnąć piętno na mechanizmach odporności wrodzonej, skutkujące szybszym zwalczaniem patogenu podczas kolejnego kontaktu. Co więcej, nawet organizmy jednokomórkowe, jak bakterie czy archeony, są w stanie zapamiętywać wtargnięcie obcego materiału genetycznego do wnętrza komórki. Niniejszy

artykuł stanowi przegląd różnych mechanizmów, jakimi posługują się poszczególne organizmy w usprawnianiu reakcji na ponowne wtargnięcie patogenu do ich wnętrza.

JAK BAKTERIE „ZAPAMIETUJĄ” INFEKCJĘ? SYSTEM CRISPR-CAS

Bakterie i archeony są stale narażone na inkorporację obcego materiału genetycznego. Ma ono miejsce w wyniku pobierania plazmidów, wnikania transpozonów (ruchomych elementów genetycznych), jak również infekcji wirusowych. Nabycie nowych cech w wyniku tzw. horyzontalnego transferu genów może być korzystne dla mikroorganizmów, np. może skutkować nabyciem odporności na antybiotyki lub nabyciem nowych czynników wirulencji. Może też być zgubne, kiedy wirus namnaża się prowadząc do lizy komórki. Wirusy, których globalna populacja jest bardzo zróżnicowana, a których liczba o rząd wielkości przekracza liczbę prokariotów (SUTTLE 2005) są stałym zagrożeniem dla organizmów bezjądrowych. Dlatego bakterie i archeony rozwinęły różne strategie, mające na celu ochronę przed atakami wirusów. Wśród nich są mechanizmy niespecyficzne, takie jak infekcja abortywna, mutacja receptorów na powierzchni utrudniająca przyłączenie faga oraz degradacja lub modyfikacja obcego materiału genetycznego. Na szczególną uwagę zasługuje zdolność organizmów prokariotycznych do nabywania specyficznej odporności przeciw-wirusowej, co jest cechą odporności adaptacyjnej. Opiera się ona na systemie CRISPR/

Słowa kluczowe: CRISPR/Cas, immunoglobuliny, pamięć immunologiczna, RAG, receptory DSCAM, receptory VLR

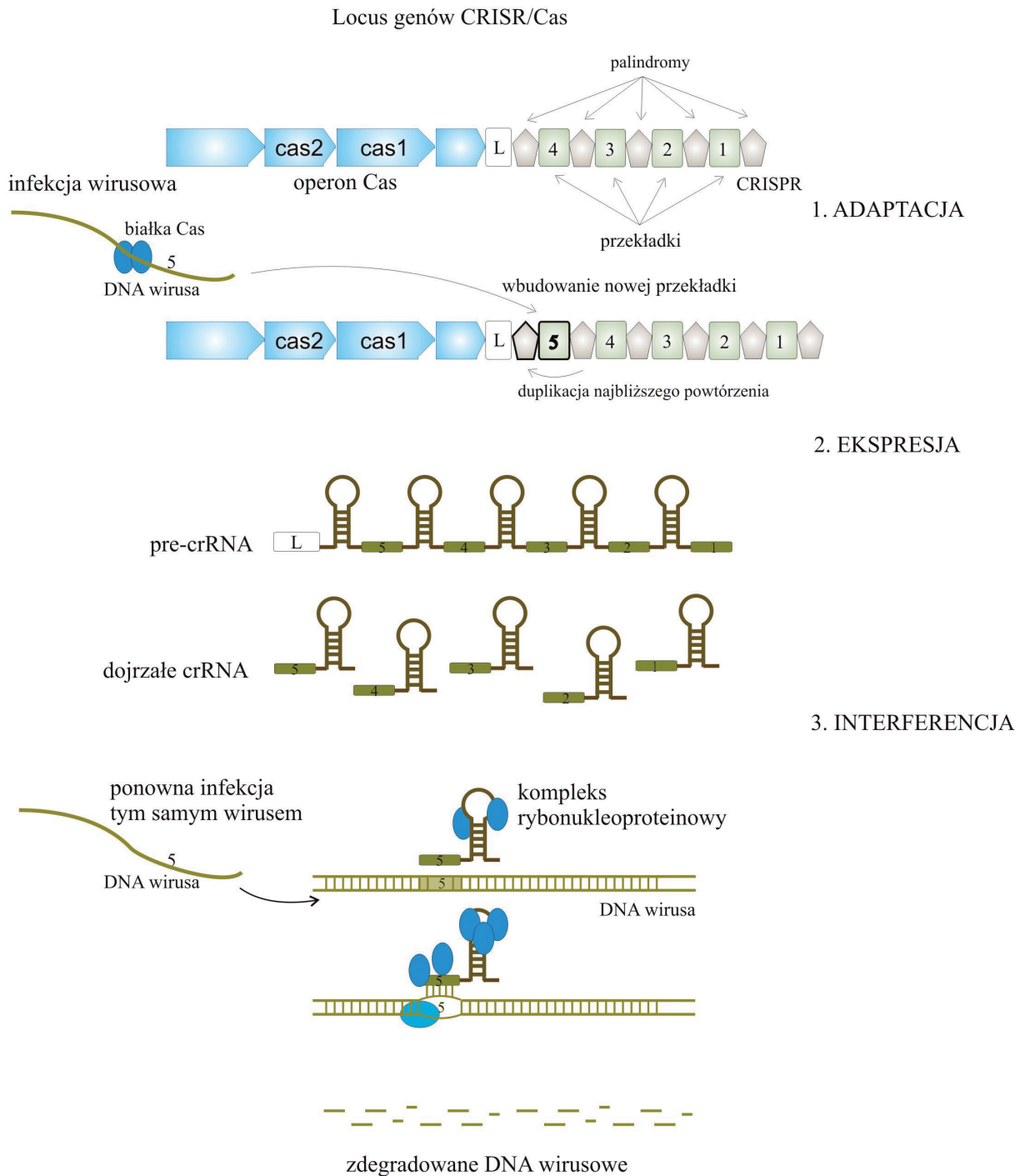
Cas. Obecność genów *CRISPR/Cas* wykryto po raz pierwszy u *E. coli* w 1987 r. (ISHINO i współaut. 1987), chociaż dopiero później poznano ich rolę w niszczeniu obcego materiału genetycznego za pomocą mechanizmu przypominającego interferencję RNA i jego znaczenia w nabyciu specyficznej odporności na infekcje wirusami (MAKAROVA i współaut. 2006). *Loci* genów *CRISPR* (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) stanowi szereg krótkich sekwencji palindromowych (takich dla których sekwencja komplementarna, czytana w kierunku 5'-3' jest identyczna), poprzedzanych tzw. przekładkami (ang. *spacers*) oraz znajdującego się w pobliżu operonu genów *Cas* (ang. *CRISPR-associated*). Te ostatnie kodują zróżnicowaną grupę białek biorących udział w „inżynierii” kwasów nukleinowych, to jest nukleazy, polimerazy, helikazy oraz białka wiążące DNA i RNA. Przekładki są to nabyte fragmenty kwasów nukleinowych, komplementarne do materiału genetycznego wirusów lub innych mobilnych elementów genetycznych. Na początku takiego zestawu, znajduje się sekwencja liderowa. Odporność oparta na *CRISPR/Cas* obejmuje trzy etapy. Są to: adaptacja, ekspresja i interferencja (Ryc. 1). Pierwszy etap polega na pozyskaniu nowej sekwencji (fragmentu DNA) oraz wbudowaniu jej do własnego genomu. Odbywa się to w wyniku np. infekcji wirusowej, w wyniku której fragment DNA wirusa jest wbudowywany jako nowa przekładka, tuż za sekwencją liderową, z jednoczesną duplikacją najbliższej sekwencji palindromowej. Odbywa się to przy udziale różnych białek *Cas* (wśród których zwykle występują *Cas1* i *Cas2*). Tak więc etap ten kończy się z chwilą pozyskania nowej jednostki palindrom-przekładka. Drugi etap (ekspresja) to przepisanie sekwencji *CRISPR* na mRNA i powstanie pierwotnego transkryptu-pre crRNA, który w dalszym etapie ulega cięciu na fragmenty (crRNA), tworzące tzw. interferencyjne RNA. Każdy zawiera jedną przekładkę i jeden palindrom, który po transkrypcji przybiera tzw. strukturę spinki do włosów, ponieważ zawiera na początku i końcu komplementarne do siebie nukleotydy. Dojrzałe crRNA funkcjonują jako sekwencje kierujące białka *Cas* do specyficznie rozpoznawanej sekwencji (ang. *guide RNA*). Trzeci etap (interferencja) ma miejsce w wyniku ponownej infekcji tym samym wirusem. Przepisany na RNA fragment włączonego uprzednio materiału genetycznego (crRNA), na zasadzie komplementarności, „rozpoznaje” DNA faga. W wyniku przyłączenia crRNA do komplementarnej sekwencji DNA wirusa, może nastąpić jej częściowe rozplecenie, a następnie degradacja DNA, z udziałem nukleaz *Cas*.

Proces ten przypomina interferencję RNA u Eucaryota, chociaż degradowane jest tu DNA faga, jednak w niektórych typach degradowane może być również RNA (FINERAN i CHARPENTIER 2012, HELER i współaut. 2014, BARRANGOU 2015, RATH i współ. 2015).

Powyżej opisano ogólny przebieg działania mechanizmu *CRISPR/Cas*. Istnieje kilka typów, a także subtypów tego systemu, różniących się szczegółowym mechanizmem powstawania crRNA, udziałem białek *Cas* oraz mechanizmem interferencji. Więcej informacji dotyczących klasyfikacji systemu *CRISPR/Cas* znajdzie czytelnik w pracach: HELER i współaut. 2014, BARRANGOU 2015, RATH i współaut. 2015. Warto wspomnieć, że sekwencje palindromowe mogą liczyć od 21 do 48 par zasad, zaś przekładki od 26 do 72 par zasad (patrz RATH i współaut. 2015). Liczba i rodzaj sekwencji przekładkowych stanowią swoisty bank pamięci immunologicznej bakterii czy archeona. Z immunologicznego punktu widzenia mechanizm *CRISPR/Cas* posiada następujące cechy: (i) zdolność do rozróżniania swoje/obce, (ii) nabywanie odporności, (iii) aktywność swoistą, skierowaną przeciw konkretnym elementom genetycznym, (iv) nabyta odporność jest dziedziczona. Poznanie bakteryjnego systemu *CRISPR/Cas* niesie ze sobą wiele możliwości, zarówno poznawczych, jak i aplikacyjnych. Analiza sekwencji pobranych przez dany szczep wiele mówi o jego genezie i patogenach jakie napotkał w swej historii. Ponadto, poznanie sekwencji przekładek może być wykorzystywane do poszukiwania wybranych patogenów bądź zanieczyszczeń danego materiału biologicznego. Co więcej, człowiek może zaprojektować, a następnie technikami inżynierii genetycznej wprowadzić określone sekwencje *CRISPR* do genomu bakterii, używając w ten sposób szczepy o pożądanym fenotypie: np. odporne na wirusy, niepobierające lub pozbywające się plazmidów (tzw. *plasmid cure*). Szczepy takie mogą być wykorzystywane zarówno w badaniach podstawowych, jak i do produkcji jogurtów, serów czy stosowane jako probiotyki (BARRANGOU 2015).

PLASTYCZNOŚĆ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ OWADÓW

Owady stanowią największą i najbardziej różnorodną gromadę zwierząt. Swoją ewolucyjny sukces zawdzięczają między innymi sprawnie funkcjonującemu układowi immunologicznemu. W reakcji komórkowej biorą udział hemocyty, odpowiedzialne za takie procesy jak fagocytoza, enkapsulacja i nodulacja (zamykanie intruza w strukturach zwanych odpowiednio kapsułami i nodulami).



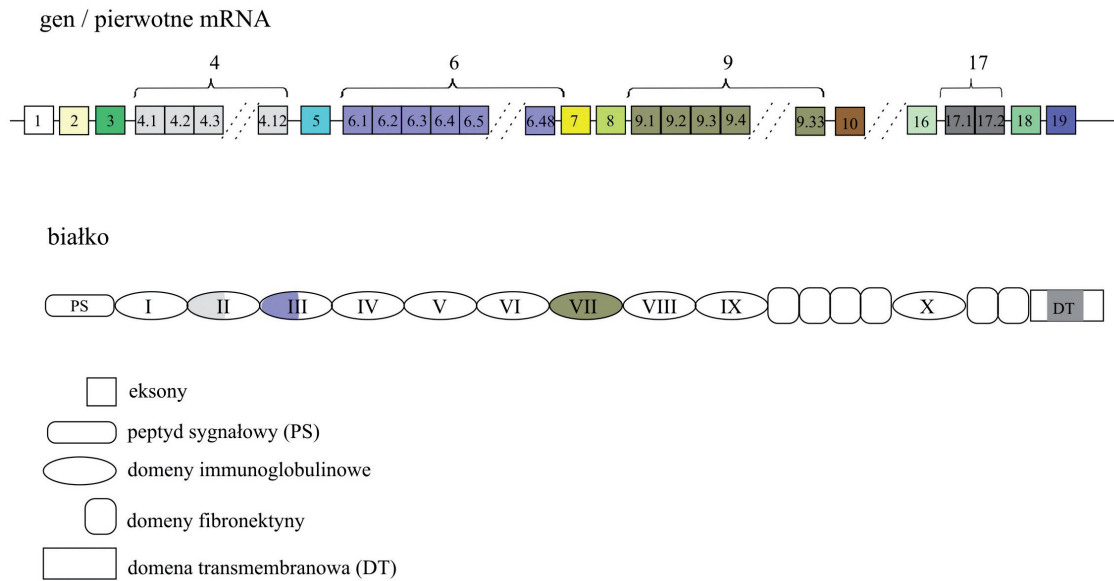
Ryc. 1. System CRISPR/Cas u bakterii.

Locus *CRISPR/Cas* stanowi operon *Cas* kodujący białka biorące udział w „inżynierii” kwasów nukleinowych (zaznaczony na niebiesko). Obok, tuż za tzw. sekwencją liderową (L) znajduje się szereg krótkich sekwencji palindromowych (brązowe pięciokąty), poprzedzielanych tzw. przekładkami (zielone kwadraty). Istnieją 3 etapy działania w/w systemu. Adaptacja (1), polega na nabyciu nowej przekładki, tj. fragmentu obcego materiału genetycznego. Uczestniczą w tym białka *Cas*. Wbudowane DNA ulega następnie transkrypcji (ekspresja-2), zaś mRNA zostaje pocięte na fragmenty zawierające daną przekładkę (zielony prostokąt) oraz strukturę tzw. spinki do włosów (crRNA). W momencie kolejnej infekcji danym wirusem, struktura crRNA „rozpoznaje” obcy DNA na zasadzie komplementarności zasad przekładki i materiału genetycznego wirusa. Materiał genetyczny wirusa jest następnie degradowany. Proces rozpoznawania i degradacji obcego materiału genetycznego przypomina proces tzw. interferencji RNA (3). Więcej szczegółów w tekście (wg HORVATH i BARRANGOU 2010, BARRANGOU 2015).

Główną częścią odpowiedzi humoralnej jest natomiast synteza peptydów odpornościowych, które wydzielane do hemolimfy niszczą infekujące bakterie lub grzyby (CYTRYŃSKA i współaut. 2016).

W świetle najnowszych doniesień literaturowych okazuje się, iż, mimo że owady dysponują jedynie mechanizmami odporności wrodzonej, nie oznacza, że są całkowicie pozbawione „pamięci immunologicznej”. Ta zdolność modulacji układu immunologicznego, w zależności od przebytych wcześniej infekcji, może być również cechą odporności wrodzonej i nosi nazwę piętnowania układu immunologicznego (ang. immune priming) (CHAMBERS i SCHNEIDER 2012). Samo zjawisko piętnowania układu odpornościowego u owadów jest znane, tzn. istnieje wiele doniesień świadczących, że owady zakażone subletalną dawką patogenu są bardziej odporne na podanie dawki letalnej. Czasami uzyskana odporność jest specyficzna, tzn. mniejszą wrażliwość uzyskuje się tylko wobec danego mikroorganizmu, czasami zaś niespecyficzna, kiedy przebycie infekcji spowodowanej jednym patogenem powoduje wzrost odporności na kolejne zakażenie w wyniku dostania się innego mikroorganizmu do jamy ciała. Obecnie trwają badania dotyczące poznania molekularnych mechanizmów obserwowanego zjawiska. Informacje, które napływają od poszczególnych grup badawczych wskazują, że przyczyny zwiększonej odporności na kolejne zakażenie mogą być wyjaśnione w różny sposób. Jeden z nich (z pozoru najprostszy) to taki, że w wyniku podania dawki nieletalnej, aktywowany jest układ odpornościowy owada, m.in. ma miejsce wzmożona ekspresja genów kodujących białka i peptydy odpornościowe (BERGIN i współaut. 2006). Tak więc, w momencie ponownego zakażenia, białka i peptydy odpornościowe są już obecne w hemolimfie, co ułatwia sprawniejszą eliminację mikroorganizmów, które dostały się do hemocelu owada. Jest to interpretacja prosta tylko na pozór, bowiem z reguły dany mikroorganizm, nawet jeśli podany w dawce nieletalnej, jest wtedy jeszcze obecny w organizmie owada (Wojda, dane niepublikowane). Oznacza to, że w momencie podania drugiej, wyższej dawki, ilość danego mikroorganizmu jest u tych owadów większa, niż u tych zakażanych po raz pierwszy. Mimo to, ich krzywa przeżywalności wydłuża się, w porównaniu do owadów zakażanych po raz pierwszy. Inny zaproponowany mechanizm, wyjaśniający podwyższoną odporność owadów mających ponowny kontakt z patogenem, leży w budowie i sposobie ekspresji, a tym samym zmienności tzw. receptorów DSCAM. (ang. down syndrom cell adhesion molecules). Receptory DSCAM zawierają tzw.

domeny immunoglobulinowe (choć nie są immunoglobulinami, czyli przeciwciałami). U ludzi receptory te regulują wytwarzanie otoczki neuronów, zaś ich defekt jest skorelowany z zespołem Downa, stąd ich nazwa (YAMAKAWA i współaut. 1998). Ortologi genów DSCAM są obecne u owadów i uważa się, że pełnią rolę w rozpoznaniu immunologicznym. Wykazują one bardzo dużą zmienność sekwencji. Białka DSCAM mogą znajdować się w hemolimfie, jak również na powierzchni hemocytów. Każde z nich składa się z peptydu sygnałowego, 10 tzw. domen immunoglobulinowych (domeny Ig), 6 tzw. domen fibronektyny, domeny transmembranowej (DT) oraz części cytoplazmatycznej. Masa cząsteczkowa białka wynosi ok. 210 kDa. Zmienność sekwencji mającą wpływ na rozpoznanie danego patogenu obserwuje się w trzech domenach immunoglobulinowych. Jest ona wynikiem tzw. alternatywnego składania transkryptów. Jak wiadomo, wiele genów eukariontów to tzw. geny podzielone, tj. zawierające sekwencje nieobecne w dojrzałym transkrypcie (tzw. introny, dawniej niesłusznie uznawane za sekwencje niekodujące) oraz sekwencje obecne w dojrzałym transkrypcie (tzw. eksony, dawniej sekwencje kodujące). Po transkrypcji, to jest przepisaniu informacji z DNA na mRNA, z pierwotnego transkryptu zostają wycinane introny, zaś eksony są scalane. Odbyna się to w tzw. procesie składania transkryptów (ang. splicing) i jest częścią bardziej złożonego mechanizmu zwanego dojrzewaniem mRNA (GRAVELEY 2005, CHERRY i SILVERMAN 2006). U muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, gen kodujący receptory DSCAM, jest genem podzielonym. Eksony 4, 6 i 9 posiadają wiele alternatywnych form, powstałych najprawdopodobniej w wyniku ich wielokrotnej duplikacji i zmienności. Zawierają one odpowiednio 12, 48 i 33 wersji, znajdujących się obok siebie, kodujących różne izoformy danego eksonu. Ponadto, ekson 17 zawiera dwie alternatywne sekwencje, kodujące fragment domeny DT. W wyniku składania pierwotnego transkryptu, tylko jedna forma eksonu 4, 6, 9 oraz 17 wchodzi w skład dojrzałego mRNA. Tak więc, teoretycznie, u *D. melanogaster* istnieje ponad 38.000 możliwych form dojrzałego mRNA kodujących różne formy receptora DSCAM, z których ponad 18.000 różni się w domenie zewnątrzkomórkowej (WATSON i współaut. 2005). Mechanizm regulujący dobór konkretnych form danego eksonu nie jest znany. Alternatywne składanie transkryptów determinuje strukturę receptora w części N-terminalnej drugiej i trzeciej domeny immunoglobulinowej i całej siódmej domenie immunoglobulinowej. Ponadto, dojrzałe białko ma jedną z dwóch



Ryc. 2. Zmienność receptorów DSCAM u *Drosophila melanogaster*.

Gen kodujący DSCAM zawiera 19 eksonów. Eksony numer 4, 6 i 9 kodujące domeny, bądź fragmenty domen immunoglobulinowych posiadają odpowiednio 12, 48 i 33 alternatywnych form. Ponadto, ekson 17 zawiera dwie alternatywne sekwencje, kodujące fragment domeny transmembranowej (DT). W wyniku alternatywnego składania transkryptów tylko jedna forma danego eksonu jest scalana z pozostałymi. Skutkiem tego istnieje 38000 możliwych form receptorów DSCAM, z których ponad 18000 różni się w domenie zewnątrzkomórkowej, tj. wiążącej obce struktury. Możliwość doboru danej wersji eksonu 4 i 6 skutkuje zmiennością w N-terminalnej części odpowiednio II i III domeny immunoglobulinowej, zaś eksonu 9, zmiennością w całej domenie immunoglobulinowej VII. Sekwencja eksonu 17, determinuje strukturę pierwszorzędową domeny transmembranowej. Zaznaczono to odpowiednimi kolorami: jasnoszarym, niebieskim, zielonym i ciemnoszarym (wg GRAVELEY 2005, KURATA 2006, GHOSH i współaut. 2011).

możliwych wersji domeny DT. Alternatywne składanie transkryptów DSCAM przedstawia Ryc. 2. Obecność białek DSCAM znaleziono w ciele tłuszczowym, hemocytach, a także w formie rozpuszczalnej w hemolimfie. Mutacja w genach DSCAM czy też zahamowanie ich ekspresji za pomocą interferencji RNA (niszczenie mRNA dla tychże białek) skutkuje zahamowaniem procesu fagocytozy mikroorganizmów przez hemocyty (DONG i współaut. 2006). Jednocześnie wykazano, że *D. melanogaster*, potraktowana subletalną dawką (bądź martwymi komórkami) *Streptococcus pneumoniae*, jest bardziej odporna na późniejszą infekcję dawką letalną. Przyczyną tego zjawiska jest efektywniejsza fagocytoza bakterii (PHAM i współaut. 2007). Doniesienia literaturowe sugerują więc, że białka DSCAM funkcjonują u owadów (i skorupiaków) jako PRR (ang. pattern recognition receptors). Konsekwencją tego jest przypuszczenie, że ekspresja danych izoform DSCAM, zależy od rodzaju infekcji. Istnieją doniesienia podtrzymujące tę hipotezę. Mianowicie wykazano, że ekspozycja linii komórkowej (Sua5) wyprowadzonej z komara na różne, inaktywowane termicznie bakterie czy składniki ścian komórkowych, powoduje ekspresję różnych form białek DSCAM

(DONG i współaut. 2006). Niemniej jednak w innej pracy wykazano, że poziom ekspresji DSCAM u *D. melanogaster* po ekspozycji na bakterie *E. coli* nie ulegał podwyższeniu (w przeciwieństwie do ekspresji genów kodujących polipeptydy odpornościowe). Co więcej, nie wykazano różnic w ilości poszczególnych izoform DSCAM w wyniku stymulacji bakteriami *E. coli* (ARMITAGE i współaut. 2014). Dlatego, niezbędne są dalsze badania nad rolą białek DSCAM w „zapamiętywaniu” infekcji i sprawniejszym rozpoznawaniu patogenów w wyniku ponownego kontaktu.

Najnowsze dane literaturowe wskazują na inny, możliwy sposób w jaki przebyta infekcja może odciskać piętno w organizmie gospodarza. Mianowicie, kontakt owada z danym mikroorganizmem może powodować zmiany epigenetyczne. Skutkuje to wykształceniem podwyższonej odporności owadów, która może być przekazywana kolejnym pokoleniom. Jest to tzw. międzypokoleniowe piętnowanie układu immunologicznego (ang. transgenerational immune priming). Zmiany epigenetyczne powodują zmianę poziomu ekspresji danych genów, nie zmieniając sekwencji DNA. Skutki zmian epigenetycznych mogą wpływać na poziom ekspresji genów na poziomie transkrypcji lub potranskrypcyjnie.

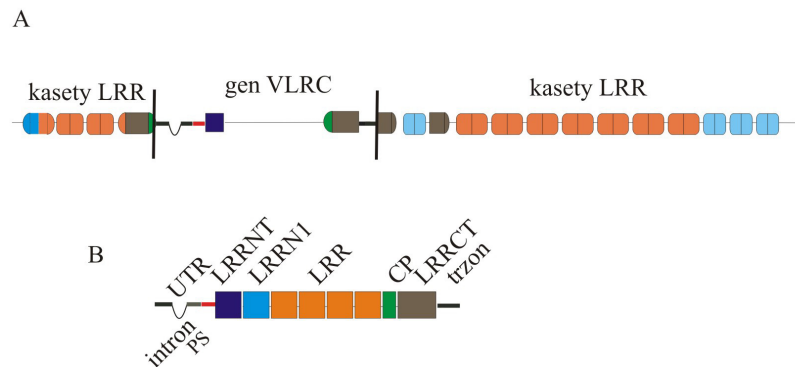
W pierwszym przypadku zmiany epigenetyczne związane są z modyfikacją chromatyny, czyli metylacją/demetylacją DNA i histonów oraz acetylacją/deacetylacją histonów, co ma istotny wpływ na dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych określonych genów. Acetylacja histonów powoduje, że chromatyna jest bardziej rozluźniona, co czyni ją bardziej dostępną dla białek regulatorowych. Okazuje się, że organizmy patogenne mogą wpływać na poziom ekspresji acetylasy i deacetylasy histonów, modulując tym samym poziom ekspresji genów zainfekowanego gospodarza (MUKHERJEE i współaut. 2015). Obecnie prowadzone są badania dotyczące tzw. eksperymentalnej koewolucji gospodarza (owada) i danego entomopatogenu (BROCKHURST i KOSKELLA 2013, VILCINSKAS 2016). Polegają one z jednej strony na wielokrotnym pasażowaniu danego entomopatogenu przez organizmy jednego gatunku owada (tj. patogeny wyizolowane z padłych owadów, używane są do infekcji kolejnych owadów tego samego gatunku), a następnie porównywany jest stopień ich wirulencji z linią niepasażowaną. Z drugiej strony, kolejne pokolenia danego gatunku owada, zakażane są wybranym patogenem, aby sprawdzić zmiany w podatności na infekcję w kolejnych generacjach. W tego typu eksperymentach wykazano, że 25 pokolenie barciaka większego *G. mellonella*, zakażane grzybem, entomopatogennym *B. bassiana*, było znacznie bardziej odporne na infekcję niż pokolenie wyjściowe. W linii wyselekcjonowanej (bardziej odpornej) zauważono podwyższony poziom ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe w kutikuli i nabłonku, czyli w miejscach będących pierwszą linią obrony przed wniknięciem grzyba poprzez okrywą ciała (DUBOVSKIY i współaut. 2013). Przyczyna tego nie jest poznana. Nie można jednak wykluczyć zmian epigenetycznych powodujących stały, podwyższony poziom ekspresji genów polipeptydów obronnych, które zabezpieczają owada przed wniknięciem grzyba patogennego do wnętrza ciała barciaka.

Jak wspomniano wyżej, regulacja ekspresji genów może odbywać się również potranskrypcyjnie. Biorą w niej udział kodowane w genomie organizmów eukariotycznych mikro RNA (miRNA). Są to krótkie (18-24 nukleotydowe) odcinki RNA, które dzięki częściowej komplementacji z fragmentami 3' mRNA przylaczają się do nich. Razem z białkami, tworzą one kompleksy rybonukleoproteiny i uniemożliwiają translację wybranych mRNA, ponieważ prowadzą do jego degradacji. Mechanizm ich działania jest podobny do mechanizmu interferencji RNA, różni się tym, że krótkie fragmenty RNA nie pochodzą od infekującego wirusa, ale są kodowa-

ne przez genom gospodarza (ASGARI 2013). Dzięki tylko częściowej komplementarności sekwencji miRNA i mRNA docelowego, jedna cząstka miRNA może kontrolować ekspresję do 100 genów (BUSHATI i COHEN 2007, SATO i współaut. 2011). Jak się okazuje, miRNA są zaangażowane w regulację odpowiedzi immunologicznej owadów. Badania prowadzone w zespole profesora Vilcinskasa wykazały istnienie u *G. mellonella* miRNA, których poziom ekspresji jest modulowany przez infekcję grzybem entomopatogennym *Metarhizium anisopliae* i bakteriami *Serratia entomophila*. Co więcej, zwiększoną ilość jednego z takich miRNA (których ekspresja wzrasta po zakażeniu) stwierdzono także w jajach składanych przez samice. Świadczy to o tym, że miRNA odgrywają istotną rolę w międzypokoleniowym piętnowaniu immunologicznym (MUKHERJEE i VILCINSKAS 2014).

ODPORNOŚĆ ADAPTACYJNA BEZZUCHWOWCÓW

U najprostszych kręgowców, czyli bezzuchwów, do których należą minóg i śluzica, istnieje odporność nabyta, oparta na tzw. zmiennych receptorach VLR (ang. variable lymphocyte receptors) odkrytych odpowiednio w 2004 i 2005 r. (PANCER i współaut. 2004, 2005). Zawierają one liczne sekwencje bogate w leucynę (ang. leucine rich repeats, LRR). Zarówno u minoga, jak i u śluzicy zidentyfikowano 3 geny kodujące receptory VLR: *VLRA*, *VLRB* i *VLRC*. Struktura tych genów w linii zarodkowej wykazuje duże podobieństwo. Mianowicie, geny te posiadają sekwencję 5' i 3' końcową, zaś „środek genu” nie zawiera eksonów, a jedynie sekwencje niekodujące, czyli upraszczając jest w pewnym sensie „pusty”. Jest on „wypełniany” w trakcie rozwoju limfocytów i cechuje się wysoką zmiennością, umożliwiającą efektywne rozpoznawanie wielu antygenów. Struktura genów VLR zostanie przedstawiona na przykładzie *VLRC* u minoga (Ryc. 3). Gen linii zarodkowej zawiera sekwencje kodujące regiony stałe białka: N-kończową część oraz fragment sekwencji C-kończowej, część sekwencji zawierających domeny LRR, zaś środek zawiera sekwencje niekodujące. W pobliżu znajdują się liczne, rozrzucone kasety zawierające domeny LRR. W trakcie dojrzewania limfocyta, sekwencje niekodujące są stopniowo zastępowane własnymi kasetami LRR. Sekwencja, która ma być wbudowana jest częściowo komplementarna do sekwencji już istniejącej i na końcu zawiera sekwencję komplementarną do kolejnego segmentu LRR, który ma być wbudowany. Taka „insercja” może rozpocząć się od końca 5' lub 3' genu VLR linii za-



Ryc. 3. Budowa genu VLRC u minoga.

W linii zarodkowej gen zawiera kodującą część 5' i 3' końcową, zaś jego „środek” stanowi część niekodująca. W trakcie dojrzewania limfocyty, polimeraza DNA używa jako matrycy sekwencji znajdujących się wokół ramki odczytu (kasety LRR), przy czym enzym często zmienia matrycę. Dzięki temu, w czasie syntezy DNA do „wnętrza” genu zostają wbudowywane różne sekwencje flankujące (A). Po zmontowaniu, gen VLRC w dojrzałym limfocycie zawiera sekwencje: UTR (nie ulegającą translacji) przedzieloną intronem, sekwencję kodującą peptyd sygnałowy (PS), sekwencje kodujące polipeptydy bogate w leucynę LRR, w tym: kodującą część N-terminalną białka (LRRNT), LRR1, pozostałe LRR, część kodującą część karboksylową (LRRCT), sekwencję CP (kodującą peptyd łączący) oraz tzw. trzon. Poszczególne fragmenty tworzą całość dopiero po złożeniu fragmentów z różnych miejsc flankujących, co odzwierciedlone jest różnicą ich kształtów, przed i po połączeniu (wg KISHITA i NAGAWA 2013, KASAHARA i SUTOH 2014).

rodkowej, najprawdopodobniej po przecięciu niekodującego fragmentu DNA. Inkorporacja kaset VLRC do genu odbywa się według modelu zwanego przełączaniem matrycy (ang. template switching) lub wyborem kopii (ang. copy choice), w którym polimeraza DNA zmienia matrycę, do której dobudowuje niekomplementarną, wykorzystując krótkie sekwencje homologiczne (NAGAWA i współaut. 2007). Po zmontowaniu, struktura wszystkich dojrzałych genów VLRC jest podobna. Składa się z sekwencji nie ulegającej translacji (5' UTR-untranslated region), przedzielonej intronem (fragmentem wycinanym w procesie dojrzewania mRNA), sekwencji kodującej peptyd sygnałowy (kierujący dane białko do błony lub na zewnątrz komórki), sekwencji kodującej część N-kończącą białka (LRRNT), LRR1 oraz wiele sekwencji LRR, sekwencję CP (kodującą, tzw. peptyd łączący; ang. connecting peptide), sekwencję kodującą część karboksylową białka (LRRCT), sekwencję nieulegającą translacji (3'UTR) i sekwencję zwaną trzonem (ang. stalk region) (BOEHM i współaut. 2012, KISHISHITA i NAGAWA 2013, KASAHARA i SUTOH 2014).

Ekspresja poszczególnych genów VLRA, VLRB lub VLRC umożliwia wykształcenie 3 linii limfocytów określanych jako VLRA+, VLRB+ i VLRC+. Wynika to z faktu, że w danym limfocycie montażowi może ulec tylko gen VLRA lub VLRB. Oznacza to, że w komórkach oznaczanych jako VLRA+, gen VLRB pozostaje w konfiguracji jaka istnieje w linii zarodkowej i odwrotnie. Podobnie, wzajemnie wykluczający się jest montaż genów VLRB i VLRC. Natomiast możliwy jest

równoczesny montaż VLRA i VLRC, jakkolwiek wówczas jeden z tych genów (zwykle VLRC) pozostaje nieaktywny (patrz KASAHARA i SUTOH 2014). U minoga, limfocyty VLRA+ i VLRC+ rozwijają się w organie podobnym do grasicy (ang. thymus-like, „thymoid”), znajdującym się na końcu włókien skrzelowych w koszu skrzelu. Białka VLRA i C są białkami transbłonowymi, zaś limfocyty VLRA+ i VLRC+ po rozpoznaniu antygeny ulegają transformacji blastycznej. Funkcjonalnie przypominają one więc limfocyty T szczykowców i są określane „T-cell like”. Z kolei białka VLRB mogą być zakotwiczone w błonie (poprzez GPI-glikozylfosfatidyloinozitol) lub być wydzielane na zewnątrz. Limfocyty VLRB+ określane są jako funkcjonalnie podobne do limfocytów B szczykowców. Po stymulacji antygenem, komórki te ulegają liczny podziałom (ekspansja klonalna) oraz wydzielają białka VLRB, podobnie jak limfocyty B wydzielają przeciwciała. Częstotliwość VLRB+ tworzące tetra- lub pentamery rozpoznają dany antygen, podobnie jak przeciwciała. Tak więc bezszczykowce posiadają dwie populacje limfocytów: funkcjonalnie podobne do limfocytów T (VLRA+ i VLRC+) oraz do limfocytów B (VLRB+), zaangażowane odpowiednio w odpowiedź komórkową i humoralną. Opisany mechanizm zwany konwersją genów umożliwia powstanie różnych receptorów VLR, specyficznie rozpoznających dane antygeny. Rząd wielkości liczby różnorodnych form białek VLR jest porównywalny z liczbą różnorodnych przeciwciał wytwarzanych przez szczykowce. Więcej informacji, dotyczących białek VLR, podobieństw i

różnic mechanizmów odpornościowych bezszczękowców i szczękowców znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej KASAHARA i SUTOH (2014).

ZMIENNOŚĆ PRZECIWCIAŁ I RECEPTORÓW U CZŁOWIEKA

Nabycie cech związanych z rearanżacją DNA, prowadzącą do powstawania tzw. odporności kombinatorycznej, określa się w literaturze jako immunologiczny wielki wybuch (ang. immunological Big-Bang) (SCHLUTER i współaut. 1999). Jego rezultatem było pojawienie się tzw. odporności adaptacyjnej (nabytej) *sensu stricto*. Jest ona oparta na różnorodności przeciwciał i receptorów limfocytów T (ang. T cell receptor, TCR) oraz układzie zgodności tkankowej MHC (ang. major histocompatibility complex). W jej rezultacie organizm ludzki, posiadający około $3,5 \times 10^4$ genów, jest w stanie wytworzyć 10^{14} różnych przeciwciał (MARKET i PAPAVALIOU 2003).

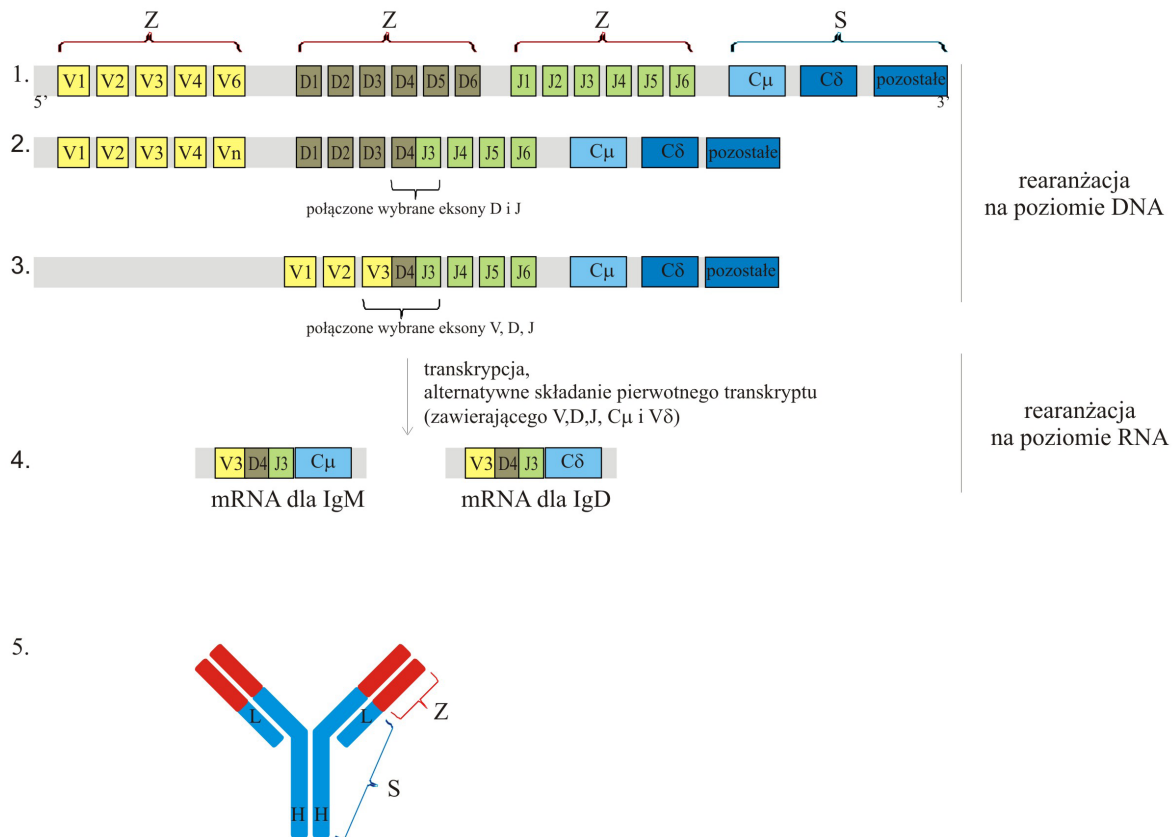
Aby wyjaśnić, jak do tego doszło, należałoby cofnąć się do początku niniejszego artykułu. Wspominano tam, że mikroorganizmy mogą być „atakowane” przez tzw. ruchome elementy genetyczne. U *Eucaryota* transpozony lub elementy transpozycyjne (ang. transposable elements, TE) mogą ulegać integracji w różne miejsca genomu według mechanizmu „kopiuj-wklej” (klasa I, czyli tzw. retrotranspozony, które w mechanizmie transpozycji wykorzystują proces odwrotnej transkrypcji) lub mechanizmu „wytnij-wklej” (klasa II, tzw. transpozony DNA, które nie wykorzystują procesu odwrotnej transkrypcji). Te drugie przemieszczają się w genomie poprzez „wycinanie” z pierwotnego położenia, a następnie „wklejanie” do innego. Transpozycja jest możliwa dzięki dwóm elementom: sekwencjom DNA kodującym tzw. transpozazy oraz terminalnym sekwencjom IR (ang. inverted repeats). Transpozazy katalizują integrację i wycinanie DNA transpozonu do/z genomu komórki-gospodarza. Sekwencje IR, które znajdują się na flankach, są to motywy rozpoznawane przez transpozazy jako miejsca rekombinacji (ROGALSKA i współaut. 2004, SOTERO-CAIO i współaut. 2017).

Kluczowym momentem w ewolucji odporności adaptacyjnej było wykształcenie genów RAG (ang. recombination activating sequences): RAG-1 i RAG-2. Pierwszy z nich powstał z transpozazy, kodowanej przez transpozon z rodziny *Transib*, zaś drugi wykształcił się najprawdopodobniej jako duplikat RAG-1, niezbędny do rearanżacji genów kodujących zmienne części przeciwciał. Z kolei sekwencje IR transpozonu *Transib* ule-

gły przekształceniu w sekwencje wyznaczające miejsca rekombinacji (ang. recombination signal sequence, RSS) (KAPITONOV i JURKA 2005). Pierwotnie uważano, że powstanie sekwencji RAG dokonało się w momencie wykształcania szczękowców, ponieważ u tych kręgowców po raz pierwszy obserwuje się odporność kombinatoryczną. Obecnie wiadomo, że sekwencje homologiczne do RAG1/RAG2 znajdują się już u początku linii wtóroustych (szkarłupnie), które tego typu odporności nie posiadają (FUGMANN i współaut. 2006). Przypuszczalnie, dopiero w linii prowadzącej do powstania kręgowców szczękowych, sekwencje RAG nabyły funkcji immunologicznej znanej obecnie. Mogło to być związane z wykształceniem nie tylko sekwencji RAG, ale także sekwencji RSS. Sekwencje RSS zostały wbudowane do genomu w *locus* genu kodującego prekursor receptorów limfocytów T i przeciwciał (KAPITONOV i JURKA 2005, FUGMANN i współaut. 2006, KAPITONOV i KOONIN 2015). Biorąc pod uwagę duplikację genów jako powszechny ewolucyjny mechanizm, skutkuje to tym, że kasety kodujące ludzkie immunoglobuliny poprzedzielane są sekwencjami RSS wyznaczającymi miejsce rekombinacji DNA. Skutkiem tego, poszczególne limfocyty T i poszczególne limfocyty B produkują różnorodną grupę odpowiednio: receptorów i przeciwciał, specyficznie rozpoznających dany antygen.

W linii zarodkowej, *loci* genów immunoglobulin i receptorów TCR składają się z sekwencji zgrupowanych w segmenty V (ang. variable), D (ang. diverse) i, w przypadku łańcuchów ciężkich, J (ang. joining). Każdy z eksonów, z obu stron zawiera sekwencje wyznaczające miejsce rekombinacji (RSS). Każda sekwencja RSS składa się z motywu heptameru i nonameru, o motywie zgodności odpowiednio CACAGTG i ACAAAAAAA, przedzielonych sekwencjami rozdzielającymi obydwie motywy, zawierającymi 12 lub 23 pary zasad. Rekombinacja genów V, D, J ma miejsce pomiędzy genami otoczonymi sekwencjami RSS o różnej długości sekwencji rozdzielającej według reguły 12/23 (TONEGAWA 1983). Dzięki temu łączone są geny z różnych kaset V, D, J, a nie z tych samych, np. D z D itp. Szczegółowy mechanizm udziału białek RAG w rearanżacji genów znajdzie czytelnik w pracy JONESA i GELLERTA (2004).

Za segmentami kodującymi części zmienne, w kierunku 3' znajduje się 11 segmentów genowych części stałej przeciwciał ($C\mu$, $C\delta$, $C\gamma^3$, $C\gamma^1$, ψ , Ca^1 , ψ , $C\gamma^2$, $C\gamma^4$, $C\epsilon$, Ca^2 , gdzie ψ oznaczają pseudogeny) (BROWN 2009). W trakcie rozwoju limfocyty B, w wyniku rearanżacji dokonywanej przez produkty genów RAG, jeden z segmentów V



Ryc. 4. Uproszczony model rearanżacji genów łańcucha ciężkiego immunoglobuliny.

W komórkach linii zarodkowej fragment zmienny (Z) przeciwciała kodowany jest przez trzy grupy segmentów, tj. trzy skupiska eksonów: V (zmienne), D (zróżnicowane) i J (łącznie). Segmenty te zaznaczono czerwonymi klamrami. Za nimi, w kierunku 3', znajdują się sekwencje kodujące tzw. fragmenty stałe (S, zaznaczone niebieską klamrą), z których na rysunku uwzględniono dwa pierwsze: C μ i C δ (1). W trakcie rozwoju limfocyta B, dzięki sekwencjom RSS, flankującym każdy z eksonów, a rozpoznawanymi przez transpozazy kodowane przez geny RAG, ma miejsce rearanżacja DNA. Jeden z eksonów D zostaje scalony z jednym J (2), a następnie para DJ zostaje scalona z jednym z eksonów V (3). Różnorodność przeciwciał bierze się z przypadkowego doboru poszczególnych eksonów w różnych limfocytach B. Takie DNA po rearanżacji ulega transkrypcji. W wyniku alternatywnego składania transkryptów do fragmentu kodującego część zmienną dołączany jest jeden z eksonów części stałej (4). Na matrycy takiego dojrzałego mRNA syntetyzowane jest białko, którego dwie cząsteczki, po połączeniu z dwiema cząsteczkami kodującymi łańcuchy lekkie tworzy immunoglobulinę, w której każdy z łańcuchów zawiera część stałą (zaznaczoną na niebiesko) i zmienną (zaznaczoną na czerwono) (5). Rysunek jest uproszczony i nie pokazuje rzeczywistej ilości elementów eksonów w poszczególnych segmentach. Nie uwzględniono też powstawania innych klas przeciwciał.

zostaje połączony z jednym segmentem D, a następnie para VD zostaje scalana z segmentem J. W efekcie powstaje gen, który zawiera otwartą ramkę odczytu zawierającą po jednym segmencie V, D i J, kodującą część zmienną immunoglobuliny łańcucha ciężkiego. W przypadku łańcuchów lekkich segment V zostaje scalony z segmentem J na chromosomie 2 lub 22 i powstaje ekson kodujący część zmienną odpowiednio łańcucha κ i λ (LYDYARD i współaut. 2017).

Po transkrypcji ekson kodujący część zmienną zostaje połączony z wybranym eksonem części stałej w procesie składania transkryptu (dojrzwienie mRNA). Niewielkie różnice w częściach stałych immunoglobulin są

podstawą wyodrębnienia różnych klas immunoglobulin: IgA, IgM, IgD, IgE, IgG, IgM. Różne klasy mogą powstawać w wyniku doboru odpowiedniego fragmentu części stałej w trakcie dojrzewania mRNA (IgM i IgD), kiedy w transkrypcie złożony zostanie odpowiednio ekson C μ , C δ . Poza tym, w limfocycie może dojść do tzw. zmiany klasy przeciwciał, polegającej na delecji odpowiedniego fragmentu DNA tak, aby na końcu 5' części stałej, znajdował się ekson odpowiadający za wytworzenie określonej klasy przeciwciał (np. C δ dla klasy IgD, czy C γ , dla IgG, C ϵ dla IgE, czy C α dla IgA). Odbyna się to jednak bez udziału białek RAG. Dojrzałe mRNA będące efektem rearanżacji genów na poziomie DNA oraz

składania eksonów na poziomie RNA jest matrycą do syntezy polipeptydów, stanowiących łańcuchy ciężkie i lekkie immunoglobulin. Różnorodność części zmiennych gwarantuje specyficzność wiązania poszczególnych antygenów. Opisany mechanizm ilustruje Ryc. 4. Dokładniejsze informacje dotyczące mechanizmu rearanżacji genów można znaleźć w pracach BASSING i współaut. (2002) i MARKET i PAPAVALIOU (2003).

PODSUMOWANIE

Zarówno organizmy jedno-, jak i wielokomórkowe stale narażone są na infekcje. Organizmy atakowane (gospodarze), jak i atakujące (patogeny) ulegają tzw. antagonistycznej koewolucji. Oznacza to, że jedne i drugie nieustannie udoskonalają odpowiednio swoje mechanizmy obronne i mechanizmy wirulencji. Odporność adaptacyjna, związana z pamięcią immunologiczną, oparta na limfocytach, różnorodności przeciwciał i antygenów posiada jedynie około 5% gatunków zwierząt. Obserwowana jest ona w ewolucji dopiero u szczękowców, a dokładnie u ryb niedoskonałokostnych (dawniej chrzęstnoszkieletowych) i jest wynikiem wielu procesów związanych z tzw. horyzontalnym transferem genów, duplikacją genów i związanym z tym nabywaniem nowych funkcji. Jednak, nawet organizmy stojące na niższych szczeblach drabiny ewolucyjnej wypracowały różne sposoby ochrony przed powtarzającymi się infekcjami. Odbywa się to nawet u bakterii i archeonów, które poprzez wbudowanie fragmentu materiału genetycznego wirusa do własnego genomu, mogą go później specyficznie rozpoznawać na zasadzie komplementarności zasad w kwasach nukleinowych. Inny sposób, to indukowany pierwszą infekcją wzrost liczby receptorów, specyficznie rozpoznających dany antygen. U podstaw różnorodności cząstek rozpoznających może leżeć zmienność na poziomie RNA (alternatywne składanie transkryptów u owadów) lub zmienność na poziomie DNA. Ta druga może wynikać z wykorzystania przez polimerazę DNA różnych matryc, którymi są sekwencje otaczające daną ramkę odczytu. Jest to tzw. mechanizm konwersji genów spotykany u bezżuchwoców. W końcu, kręgowce szczękowe, na których czele stoi człowiek, dzięki wykształceniu genów RAG oraz sekwencji RSS wypracowały mechanizm rearanżacji genów, prowadzących do powstania różnych domen wiążących antygeny, przy jednoczesnym wykorzystaniu mechanizmu alternatywnego składania transkryptów oraz delekcji genów w celu produkcji różnych klas przeciwciał. Przytoczone powyżej przykłady świadczą o różnorodności wykorzystywanych mechanizmów adaptacyjnych oraz potwier-

dzają darwinowską teorię dostosowywania się organizmu do warunków jego środowiska i wypływających z tego zagrożeń. Innymi słowy, organizmy żywe wykorzystują różne strategie, na miarę swoich zasobów i możliwości, aby osiągnąć ten sam cel - ochronę przed powtarzającymi się atakami innych organizmów.

Streszczenie

Odporność nabyta inaczej adaptacyjna (swoista) rozwinęła się w ewolucji bardzo późno, bo dopiero u kręgowców zuchwowych. Oparta jest ona na limfocytach T i B oraz syntezie różnorodnych receptorów i przeciwciał. Okazuje się jednak, że u bezkręgowców, których odporność oparta jest jedynie na mechanizmach wrodzonych, obserwuje się swego rodzaju pamięć immunologiczną. Co więcej, nawet organizmy jednokomórkowe jak bakterie czy archeony wykazują cechy „pamięci immunologicznej”. W artykule opisano różne strategie „zapamiętywania” infekcji: mechanizm CRISPR/Cas u bakterii, receptory DSCAM i inne formy piętnowania układu immunologicznego owadów oraz zmienność receptorów bogatych w leucynę (LRR) u bezżuchwoców. Przedstawiono także jak doszło do nabycia możliwości syntezy różnorodnych przeciwciał oraz receptorów limfocytów. Opisane mechanizmy opierają się na włączaniu obcego materiału genetycznego do genomu gospodarza, mechanizmie konwersji genów, alternatywnego składania transkryptów oraz somatycznej rearanżacji DNA.

LITERATURA

- ARMITAGE S. A., SUN W., YOU X., KURTZ J., SCHMUCKER D., CHEN W., 2014. *Quantitative profiling of Drosophila melanogaster DSCAM1 isoforms reveals no changes in splicing after bacterial exposure*. PLoS One. 9, e108660.
- ASGARI S., 2013. *MicroRNA functions in insects*. Ins. Bioch. Mol. Biol. 43, 388-397.
- BARRANGOU R., 2015. *Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines*. Gen. Biol. 16, e247.
- BASSING C.H., SWAR W., ALT F.W., 2002. *The mechanism of chromosomal V(D)J recombination*. Cell 109, S45-S55.
- BERGIN D., MURPHY L., KEENAN J., CLYNES M., KAVANAGH K., 2006. *Pre-exposure to yeast protects larvae of Galleria mellonella from a subsequent lethal infection by Candida albicans and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides*. Microb. Infect. 8, 2105-2112.
- BOEHM T., MCCURLEY N., SUTOH Y., SCHORPP M., KASAHARA M., COOPER M. D., 2012. *VLR-based adaptive immunity*. Ann. Rev. Immunol. 30, 203-220.
- BROCKHURST M. A., KOSKELLA B., 2013. *Experimental coevolution of species interactions*. Trends Ecol. Evol. 28, 367-375.
- BROWN T. A., 2009. *Rearanżacje genomu*. [W:] *Genomy*. BROWN T. A. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- BUCHMANN K., 2014. *Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals*. Front. Immunol. 5, e459.
- BUSHATI N., COHEN SM., 2007. *Micro RNA functions*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23, 175-205.
- CYTRYŃSKA M., WOJDA I., JAKUBOWICZ T., 2016. *How insect combat infection [W:] Lessons in immunity. From single cells organisms to*

- mammals. BALLARIN L., CAMMARATA M. (red.). Academic Press. Elsevier.
- CHAMBERS M. C., SCHNEIDER D. S., 2012. *Pioneering immunology. Insect style.* Curr. Opin. Immunol. 24, 10-14.
- CHERRY S., SILVERMAN N., 2006. Host-pathogen interaction in *Drosophila*: new tricks from an old friend. Nat. Immunol. 7, 911-917.
- DONG Y., TAYLOR H.E., DIMOPOULOS G., 2006. AgDSCAM, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. PLoS Biol. 4, e229.
- DUBOVSKIY I. M., WHITTEN M. M., YAROSLAVTSEVA O. N., GREIG C., KRYUKOV V. Y., GRIZANOVA E. V., MUKHERJEE K., VILCINSKAS A., GLUPOV V. V., BUTT T. M., 2013. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? PLoS One 8, e60248.
- FINERAN P. C., CHARPENTIER E., 2012. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of a new information. Virology 434, 202-209.
- FUGMANN S. D., MESSIER C., NOVACK L., CAMERON A., RAST J. P., 2006. An ancient evolutionary origin of the *Rag1/2* gene locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 3728-3733.
- GHOSH J., MAN LUN C., MAJESKE A. J., SACCHI S., SCHRANKEL C. S., COURTNEY SMITH L., 2011. Invertebrate immune diversity. Dev. Comp. Immunol. 35, 959-974.
- GRAVELEY B. R., 2005. Mutually exclusive splicing of the insect DSCAM pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures. Cell 123, 65-73.
- HELER R., MARRAFFINI L.A., BIKARD D., 2014. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems. Mol. Microbiol. 93, 109.
- HORVATH P., BARRANGOU R., 2010. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. Science 327, 167-170.
- ISHINO Y., SHIGANAWA H., MAKINO K., AMEMURA M., NAKATA A., 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J. Bacteriol. 169, 5429-33.
- JONES J. J., GELLERT M., 2004. The taming of a transposon: *V(D)J* recombination and the immune system. Immunol. Rev. 200, 233-248.
- KASAHARA M., SUTOH Y., 2014. Two forms of adaptive immunity in vertebrates: similarities and differences. Adv. Immunol. 122, 50-89.
- KAPITONOV V. V., JURKA J., 2005. RAG1 core and *V(D)J* recombination signal sequences were derived from Transib transposons. PLoS Biol. 3, e181.
- KAPITONOV V. V., KOONIN E. V., 2015. Evolution of RAG-1-RAG-2 locus: both proteins came from the same transposon. Biol. Direct 10, e20.
- KISHISHITA N., NAGAWA F., 2013. Evolution of adaptive immunity: implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. Bioessays 36, 244-250.
- KURATA S., 2006. Recognition and elimination of diversified pathogens in insect defense systems. Mol. Div. 10, 599-605.
- LYDYARD P. M., WHELAN A., FANGER M. W., 2017. Źródła różnorodności przeciwciał - rozdział D3. [W:] *Krótkie wykłady. Immunologia*. LYDYARD P. M., WHELAN A., FANGER M.W. (RED.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- MARKET E., PAPAVALIOU F. N., 2003. *V(D)J* recombination and the evolution of the adaptive immune system. PLoS Biol. 1, 024-027.
- MAKAROVA K. S., GRISHIN N. V., SHABALINA S. A., WOLF Y. I., KOONIN E. V., 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eucaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol. Direct. 1, 7.
- MUKHERJEE K., VILCINSKAS A., 2014. Development and immunity-related microRNAs of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genom. 15, 705.
- MUKHERJEE K., TWYMAN R. M., VILCINSKAS A., 2015. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. Prog. Biophys. Mol. Biol. 118, 69-78.
- NAGAWA F., KISHISHITA N., SHIMIZU K., HIROSE S., MIYOSHI M., NEZU J., NISHIMURA T., NISHIZUMI H., TAKAHASHI Y., HASHIMOTO S., TAKEUCHI M., MIYAJIMA A., TAKEMORI T., OTSUKA A. J., SAKANO H., 2007. Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. Nat. Immunol. 8, 206-213.
- PANCER Z., AMEMIYA C. T., EHRHARDT G. R., CEITLIN J., GARTLAND G. L., COOPER M. D., 2004. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. Nature 430, 174-80.
- PANCER Z., SAHA N.R., KASAMATSU J., SUZUKI T., AMEMIYA C. T., KASAHARA M., COOPER M. D., 2005. Variable lymphocyte receptors in hagfish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 9224-9229.
- PHAM L. N., DIONNE M. S., SHIRASU-HIZA M., SCHNEIDER D. S., 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. PLoS Path. 3, e26.
- RATH D., AMLINGER L., RATH A., LUNGREN M., 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanism and applications. Biochimie 117, 119-128.
- ROGALSKA S. M., KALINKA A., ACHREM M., SŁOMIŃSKA-WALKOWIAK., SKUZA L., FILIP E., 2004. Genetyczne elementy ruchome u roślin i innych organizmów. Kosmos 53, 325-342.
- SATO F., TSUCHIYA S., MELTZER S., SHIMIZU K., 2011. MicroRNAs in epigenetics. FEBS J. 278, 1598-1609.
- SCHLUTER S. F., BERSTEIN R. M., BERNSTEIN H., MARCHALONIS J. J., 1999. "Big Bang" emergence of the combinatorial immune system. Dev. Comp. Immun. 23, 107-111.
- SOTERO-CAIO C. G., PLATT R. N., SUH A., RAY D. A., 2017. Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. Genome Biol. Evol. 9, 161-177.
- SUTTLE C., 2005. Viruses in the sea. Nature 437, 356-361.
- TONEGAWA S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature 302, 575-581.
- VILCINSKAS A., 2016. The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. Zoology 119, 273-280.
- WATSON F. L., PUTTMANN-HOLGADO R., THOMAS F., LAMAR D. L., HOGHES M., KONDO M., REBEL V. I., SCHMUCKER D., 2005. Extensive diversity of Ig - superfamily proteins in the immune system of insects. Science 309, 1874-1878.
- YAMAKAWA K., HUOT Y. K., HAENDEL M. A., HUBERT R., CHEN X. N., LYONS G. E., KORENBERG J. R., 1998. DCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. Human Mol. Gen. 7, 227-237.

KOSMOS Vol. 66, 4, 721–732, 2017

IWONA WOJDA

Department of Immunobiology, Institute of Biology and Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, E-mail: wojda@hektor.umcs.lublin.pl

DIFFERENT STRATEGIES FOR ATTAINING IMMUNE MEMORY

Summary

Acquired immunity (adaptive, specific) developed late in evolution – in jawed vertebrates. It is based on T and B lymphocytes and a diversity of antibodies. It turns out, however, that in invertebrates, which possess only innate mechanisms there is a kind of immune memory. Moreover, even single-cell organisms such as bacteria or archaea exhibit features of immunological memory. This article describes the various strategies used to achieve a kind of remembrance of infection: a CRISPR/Cas system in bacteria, diversity of DSCAM receptors and other forms of immune priming in insects, leucine-rich receptors in jawless vertebrates. It also describes how it came to acquire the possibility of synthesis of various forms of antibodies and lymphocyte receptors by jawed vertebrates. The described mechanisms are based on the incorporation of foreign genetic material into host genome, the gene conversion mechanisms, alternative splicing and finally, somatic rearrangements of DNA.

Key words: CRISPR/Cas, DSCAM receptors, immune memory, immunoglobulins, RAG, VLR receptors