

# GLIKOPROTEINY UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO: STRUKTURA I FUNKCJA CZĘŚCI CUKROWEJ WYBRANYCH RECEPTORÓW BŁONOWYCH LIMFOCYTÓW T – CZĘŚĆ I

GLYCOPROTEINS OF IMMUNE SYSTEM:  
OLIGOSACCHARIDE STRUCTURE AND FUNCTION  
OF THE SELECTED T CELL MEMBRANE RECEPTORS – PART I

Katarzyna POLAK, Ewa POCHEĆ

Zakład Biochemii Glikokoniugatów, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie:* Powierzchnia limfocytów T jest bogata w N- i O-połączone struktury cukrowe związane z błonowymi receptorami białkowymi, w tym z receptorem TCR, koreceptorami CD4 i CD8 oraz CD43 i CD45. Ogromna różnorodność, jaką zapewniają cukry oraz dynamika procesu glikozylacji sprawiają, że glikany białek układu odpornościowego pełnią szereg funkcji regulujących dojrzewanie i aktywność limfocytów T. Generowanie sygnałów wewnątrzkomórkowych ściśle zależy od zawartości  $\beta$ 1,6-rozgałęzionych złożonych N-glikanów na cząsteczce TCR, tworzących z galektynami na powierzchni limfocytów białkowo-cukrową sieć obniżającą próg aktywacji komórek. Oligosacharydy koreceptora CD4 są niezbędne do ekspresji tej glikoproteiny na powierzchni komórki. Zmiany sjalilacji cząsteczki CD8 wpływają na jej zdolność do rozpoznawania i wiązania tetrameru MHC klasy I. O-glikany białka CD43 są ważne w procesie dojrzewania limfocytów T oraz regulują ich apoptozę. Oligosacharydy CD45 odgrywają istotną rolę w regulacji aktywności fosfatazy domeny wewnątrzkomórkowej tej cząsteczki. Glikoimmunologia limfocytów T jest nową, prężnie rozwijającą się gałęzią nauki, badającą znaczenie glikozylacji w funkcjonowaniu tych komórek oraz zmian, jakie towarzyszą dysfunkcjom układu odpornościowego, co pozwoliło na wyjaśnienie niektórych, wcześniej niezrozumiałych, mechanizmów działania tego układu.

*Słowa kluczowe:* limfocyty T, N- i O-glikozylacja, receptory błonowe, TCR

*Summary:* T cell surface is abundant in N- and O-linked sugar structures associated with membrane protein receptors, including TCR receptor, CD4 and CD8 co-receptors, as well CD43 and CD45. The huge variety of oligosaccharide structures and the dynamics of glycosylation process result in a num-

ber of glycan functions that regulate T cell development and activity. The triggering of TCR intracellular signals strictly depends on its  $\beta$ 1,6-branched complex type N-glycans that are bound by galectins on the T cell surface. It leads to forming the protein-sugar lattice which decreases the activation threshold of T cells. Oligosaccharides of the CD4 co-receptor are essential for the expression of this glycoprotein on cell surface. Changes in sialylation of CD8 molecule effect on its ability to recognize and bind MHC class I tetramer. CD43 protein O-glycans are crucial for T-cell maturation and influence their apoptosis. CD45 oligosaccharides play an important role in regulating the phosphatase activity of its intracellular domain. Glycoimmunology of T cells is a new, rapidly evolving field of science that explores the importance of glycosylation in the functioning of these cells and the changes that accompany dysfunctions of immune system, which has helped to explain some of the previously incomprehensible mechanisms of immune system action.

*Keywords:* T cells, N- and O-glycosylation, cell membrane receptors, TCR

## WSTĘP

Zdecydowana większość receptorów błonowych limfocytów T podlega procesowi glikozylacji, czyli enzymatycznemu dołączeniu złożonych struktur cukrowych określanych jako oligosacharydy lub glikany [50, 62]. Wśród nich są receptor limfocytów T (TCR), koreceptory CD4 i CD8 oraz cząsteczki CD43 i CD45, których glikozylację scharakteryzowano w dalszej części pracy. Reszty cukrowe receptorów komórek T są ważnym funkcjonalnie elementem cząsteczek glikoprotein, uczestniczą w dojrzewaniu i aktywacji limfocytów oraz ich oddziaływaniach z innymi komórkami układu odpornościowego i śródbłonna podczas migracji limfocytów do miejsca zapalenia [77]. W efekcie glikozylacja limfocytów T w istotny sposób reguluje mechanizmy odporności nabytej [2, 20, 89] a jej zaburzenia przyczyniają się do dysfunkcji komórek i w konsekwencji mogą prowadzić do rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym [85].

## GLIKOZYLACJA JAKO WAŻNA FUNKCJONALNIE MODYFIKACJA BIAŁEK

Glikozylacja jest najbardziej powszechną formą potranslacyjnej modyfikacji białek, która decyduje o ich chemicznej i funkcjonalnej różnorodności oraz wpływa na ich aktywność biologiczną [78, 93, 94]. Jest procesem złożonym, wieloetapowym [84], pośrednio genetycznie uwarunkowanym [44], zależnym od wieku, płci oraz czynników środowiskowych i biochemicznych [21]. Zachodzi w komórkach zwierząt, roślin, grzybów a także bakterii [65]. W przypadku Eukariotów proces ten nie jest zlokalizowany tylko w jednym organelum, lecz prze-

biega w kilku przedziałach komórkowych; głównie aparacie Golgiego i siateczce śródplazmatycznej (ang. *Endoplasmic Reticulum*, ER) [44], poza tym obejmuje również jądro komórkowe, gdzie syntetyzowany jest prekursor kwasu sjałowego, lizosomy, w których odzyskiwane są monosacharydy powstałe w efekcie degradacji oligo- i polisacharydów oraz cytoplazmę stanowiącą miejsce syntezy donorów cukrów oraz prekursora N-glikanów [84].

Oligosacharydy przyłączone są do białek wiązaniem N- lub O-glikozydowym, dlatego określa się je jako N- i O-glikany, które różnią się strukturą oraz lokalizacją w łańcuchu białkowym [24]. N-glikany dołączone są do atomu azotu grupy amidowej Asn, zlokalizowanej w określonej sekwencji Asn-X-Ser/Thr polipeptydu (X jest dowolnym aminokwasem z wyjątkiem Pro), podczas gdy O-glikany związane są przez resztę N-acetylogalaktozoaminy (ang. *N-acetylgalactosamine*, GalNAc) lub N-acetyloglukozaaminy (ang. *N-acetylglucosamine*, GlcNAc) z grupą hydroksylową głównie Ser lub Thr [86] oraz rzadziej Tyr albo Hyp [36]. W obrębie N-glikanów wyróżnia się trzy charakterystyczne grupy struktur: wielomannozowe (oligomannozowe) zawierające w części zewnętrznej tylko reszty mannozy (ang. *Mannose*, Man), złożone zbudowane z anten, w skład których wchodzi GlcNAc, galaktoza (ang. *Galactose*, Gal), kwas sjałowy (ang. *Sialic Acid*, SA; kwas N-acetylonauraminowy) i fukoza (ang. *Fucose*, Fuc) oraz oligosacharydy hybrydowe o cechach obydwu wcześniejszych typów glikanów [93, 94]. Glikozylacji podlega zdecydowana większość białek błonowych i wydzielniczych [11, 39, 52] oraz część białek jądrowych i cytoplazmatycznych [47]. Przy czym białka wewnątrzkomórkowe są glikozylowane głównie przez dołączenie pojedynczej reszty GlcNAc wiązaniem O-glikozydowym [45] a powierzchniowe i sekrecyjne zawierają bardziej rozbudowane struktury cukrowe [59].

Glikany w istotny sposób modulują właściwości i funkcje białek, do których są przyłączone [12] i, jak pokazują liczne badania, są nie mniej ważne w funkcjonowaniu glikoproteiny niż jej część białkowa [47]. Odpowiadają za prawidłowe fałdowanie białek [38], regulują transport cząsteczek do powierzchni komórki [75], utrzymują ich stabilność [49] oraz stanowią ochronę przed proteolizą [25]. Przebudowa struktury oligosacharydów jest charakterystyczna dla rozwoju, proliferacji i apoptozy komórek [42]. Obecność glikanów jest kluczowa do wiązania ligandów [51] oraz utrzymania w odpowiednich odstępach geometrycznych cząsteczek na powierzchni komórki, co zapobiega niepożądanym oddziaływaniom *cis* pomiędzy nimi oraz reguluje oddziaływania międzykomórkowe [29, 74]. Reszty cukrowe wpływają również na antygenowość glikoprotein [6, 34].

Wszystkie kluczowe receptory powierzchniowe limfocytów T są glikozylowane [75]. Aktywność komórek T zależy od ich prawidłowej glikozylacji [53]. Zmiana składu glikanów i/lub ich ilości na powierzchni białek może sprzyjać rozwojowi różnych chorób, w tym autoimmunizacyjnych [9, 54].

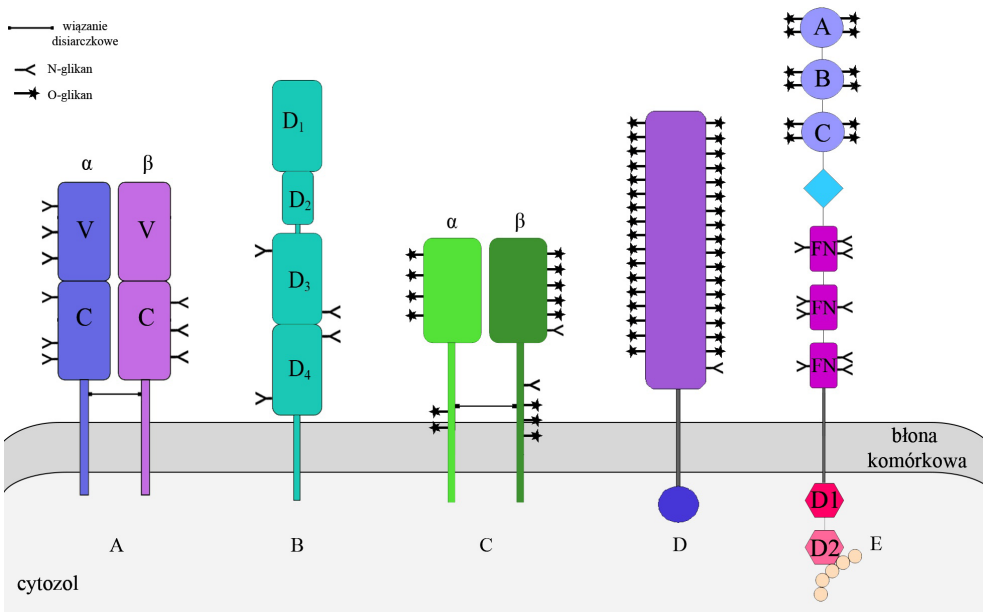
## GLIKOZYLACJA TCR REGULUJE AKTYWACJĘ LIMFOCYTÓW T

Receptor TCR jest heterodimerem utworzonym z dwóch łańcuchów polipeptydowych, najczęściej są to kompleksy  $\alpha\beta$  oraz  $\gamma\delta$ . Ponad 90% komórek T ludzkiej krwi wykazuje ekspresję receptora  $\alpha\beta$ , a pozostałe 10% stanowią limfocyty z heterodimerem  $\gamma\delta$ . Receptor TCR $\alpha\beta$  zbudowany jest z dwóch glikozylowanych transbłonowych łańcuchów białkowych, z których każdy ma część zmienną V oraz część stałą C (ryc. 1A). Domeny V tych łańcuchów rozpoznają oraz oddziałują ze swoistym peptydem i MHC oraz zapewniają różnorodność cząsteczek TCR [26]. Receptor TCR związany jest z limfocytom przez krótki fragment transbłonowy oraz odcinek wewnątrzkomórkowy [37]. Obie formy receptora TCR łączą się w błonie limfocytów T z grupą białek CD3. Składają się one z 6 łańcuchów należących do czterech różnych typów  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  oraz  $\zeta$ . Łańcuchy te biorą udział w przekazywaniu do wnętrza komórki sygnału generowanego w efekcie rozpoznania i związania antygeny przez TCR [43]. Kompleks TCR-CD3 jest funkcjonalną jednostką receptorową limfocytów T. Jest on obecny w błonie w bliskim kontakcie z cząsteczkami CD2, CD4, CD5 oraz CD8 [26].

Obydwie podjednostki TCR są N-glikozylowane. W jednych z pierwszych badań dotyczących glikozylacji TCR przeprowadzonych na mysiej linii limfocytów T cytotoksycznych (klon 2C) wykazano obecność 3-4 N-glikanów w obydwu podjednostkach receptora TCR. Wszystkie glikany w podjednostce  $\alpha$  były typu złożonego, natomiast w przypadku podjednostki  $\beta$  zidentyfikowano zarówno N-glikany wielomannozowe, jak i złożone [35]. W kolejnych badaniach wykonanych na mysich i ludzkich limfocytach T wykazano, że miejsca N-glikozylacji obecne są w domenie zmiennej łańcuchów  $\alpha$ , w przeciwieństwie do domeny zmiennej łańcucha  $\beta$ , która jest nieglikozylowana. Część stała łańcucha  $\alpha$  myszy zawiera dwa miejsca N-glikozylacji a człowieka trzy (ryc. 1A). Z kolei domena C $\beta$  posiada trzy takie miejsca u myszy oraz jedno u człowieka [46]. Natomiast inne źródła podają, że podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  TCR są N-glikozylowane w co najmniej siedmiu miejscach [19, 37]. W łańcuchu  $\delta$  TCR występują dwa N-glikany, z których jeden ma strukturę wielomannozową a drugi jest typu złożonego [34]. Kompleks TCR $\alpha\beta$ -CD3 u człowieka zawiera 12 potencjalnych miejsc, do których mogą być dołączane N-glikany oraz posiada ściśle zależną od glikozylacji TCR zdolność do wiązania endogennych lektyn zwanych galektynami (gal), głównie gal-1 i -3 [29]. Podjednostka CD3 $\delta$  w kompleksie z receptorem TCR $\alpha\beta$  charakteryzuje się obecnością jednego N-glikanu wielomannozowego i jednego typu złożonego, natomiast z TCR $\gamma\delta$  posiada wyłącznie oligosacharydy złożone [34]. N-glikozylacja kompleksu TCR-CD3 różni się również w zależności od tego, czy ulega on ekspresji na dojrzałych limfocytach T CD4<sup>+</sup> czy limfocytach CD8<sup>+</sup>.

W badaniach Zapata i wsp. (2004) stwierdzono, że całkowita masa kompleksów TCR $\gamma\delta$ -CD3 jest większa dla komórek CD4<sup>+</sup> w porównaniu z limfocytami CD8<sup>+</sup>, co jest efektem odmiennej glikozylacji. Limfocyty CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> pozbawione CD3 $\gamma$  wykazywały także różnice w zawartości oligosacharydów na CD3 $\delta$  [92].

Glikozylacja TCR jest kluczowa do aktywacji limfocytów T [17]. Badania Kuball i wsp. (2009) wykazały, że zmniejszona N-glikozylacja łańcuchów TCR zwiększa powinowactwo limfocytów T do kompleksów peptyd-MHC (ang. *peptide-MHC complex*, pMHC) zarówno przy braku, jak i w obecności koreceptora CD8, co wynika ze zwiększonej zdolności słabiej glikozyłowanego receptora TCR do tworzenia kompleksów w obrębie błony i w efekcie wydajniejszej aktywacji komórek T [46].



**RYCINA 1.** Budowa receptorów błonowych limfocytów T z zaznaczonymi miejscami N- i O-glikozylacji. A. ludzki receptor TCR [na podst. 26, 46], B. koreceptor CD4 [na podst. 37, 74], C. koreceptor CD8 [na podst. 37, 76], D. CD43 [na podst. 80, 82], E. CD45 [na podst. 10, 22]. A, B, C (CD45), domeny powstałe z alternatywnego składowania mRNA; Asn, asparagina; C (TCR), domena stała; D1-D4, domeny immunoglobulinopodobne; D1 (CD45), domena fosfatazy tyrozynowej; D2 (CD45), domena C-końcowa wiążąca cytoskielet; FN, region fibronektynopodobny; Thr, treonina; V, domena zmienna

**FIGURE 1.** Structure of membrane T-cell receptors with marked N- and O-glycosylation sites. A. human TCR receptor [based on 26, 46], B. co-receptor CD4 [based on 37, 74], C. co-receptor CD8 [based on 37, 76], D. CD43 [based on 80, 82], E. CD45 [based on 10, 22]. A, B, C (CD45), domains formed by alternative mRNA assembly; Asn, asparagine; C (TCR), constant domain; D1-D4, immunoglobulin-like domains; D1 (CD45), tyrosine phosphatase domain; D2 (CD45), cytoskeleton-binding C-terminal domain; FN, fibronectin-like region; Thr, threonine; V, variable domain

Istotną rolę w aktywacji TCR pełnią struktury złożone N-glikanów z rozgałęzieniami GlcNAc $\beta$ 1,6 [8], których redukcja wzmacnia sygnalizację TCR i proliferację komórek T [28]. Enzym N-acetyloglukozaminylotransferaza V (GnT V) jest odpowiedzialny za powstanie rozgałęzień GlcNAc $\beta$ 1,6 glikanów typu złożonego zawierających laktozaminylowe jednostki cukrowe (ang. *N-acetylactosamine*, LacNAc) [17, 60, 94], które stanowią ligandy dla galektyn, czyli białek wiążących  $\beta$ -galaktozydy [69]. Wiązanie galektyn do galaktozy struktur polilaktozaminylowych (poliLacNAc), obecnych na TCR, powoduje tworzenie sieci białkowo-cukrowej na powierzchni limfocytów T, która reguluje aktywację tych komórek [17, 57, 61]. Oligosacharydy  $\beta$ 1,6-rozgałęzione na receptorach TCR są usytuowane na powierzchni białka w taki sposób, by zapobiegać niespecyficzej ich agregacji, ograniczają możliwe oddziaływania geometryczne oraz uniemożliwiają grupowanie się kompleksów TCR-MHC poprzedzające sygnalizację komórkową [62].

## SJALILACJA CD8 I CD4 JEST NIEZBĘDNA DLA ICH FUNKCJI

Cząsteczki CD4 i CD8 oddziałują z tym samym kompleksem pMHC co TCR, dlatego określane są jako koreceptory limfocytów T [56]. Są istotne w tworzeniu synapsy immunologicznej między limfocytami T a komórkami prezentującymi antygen (ang. *Antigen-Presenting Cells*, APC) [55]. Dojrzała komórka T wykazuje ekspresję tylko jednego z nich; limfocyty T pomocnicze (Th) posiadają koreceptor CD4, natomiast dla komórek T cytotoksycznych (Tc) charakterystyczny jest marker CD8 [26]. Mają one kluczowe znaczenie dla uzyskania czynnościowej zgodności podtypu limfocytu T z prawidłowym kompleksem pMHC oraz umożliwiają jego aktywację po rozpoznaniu antygeny [88]. Chociaż obie cząsteczki funkcjonują jako koreceptory, ich struktury są dość odmienne [37]. Pomimo tego, współdziałają ze strukturalnie homologicznymi miejscami na swoich ligandach MHC [72] a ich aktywność, ekspresja oraz funkcja w istotny sposób zależą od glikozylacji [16, 50].

CD4 jest cząsteczką zbudowaną z pojedynczego łańcucha, na który składają się cztery immunoglobulinopodobne domeny D1-D4. Pierwsze dwie domeny D1 i D2 są ciasno upakowane i tworzą sztywną strukturę prętopodobną, która jest połączona z błoną za pomocą domen D3 i D4 (ryc. 1B). CD4 silnie oddziałując z cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową, powoduje wzmocnienie sygnału generowanego przez receptor TCR wiążący się z kompleksem pMHC II. Jednoczesne połączenie CD4 i TCR z tym samym kompleksem powoduje znaczny wzrost wrażliwości limfocytów na prezentowany antygen. Udział koreceptora CD4 zmniejsza 100-krotnie ilość antygeny konieczną do aktywacji komórki [37]. Rozpoznanie przez limfocyt T CD4+ peptydu prezentowanego przez MHC II inicjuje odpowiedź odpornościową powodując aktywację limfocytów B i produkcję cyto-

kin prozapalnych [7]. Częsteczka CD4 zawiera cztery miejsca N-glikozylacji [34] przy Asn273 i Asn300 pomiędzy D3 i D4 oraz Asn159 i Asn270 (ryc. 1B) [74]. W przeciwieństwie do złożonych dwuantenowych N-glikanów dołączonych do Asn270 w domenie D4, oligosacharydy przyłączone do Asn159 w D3 są głównie typu oligomannozowego i hybrydowego [74]. Lokalizacja struktur wielomannozowych, zapewniająca ochronę dzięki określonej strukturze III-rzędowej białka, sprawia, że są one niedostępne dla enzymów biorących udział w obróbce glikanów. Glikozylacja Asn273 i Asn300 jest niezbędna do ekspresji CD4 na powierzchni komórki oraz uzyskania prawidłowej struktury przestrzennej białka. Nieglikozylowana forma CD4 wykazuje stabilność, lecz pozostaje wewnątrz komórki [74, 79]. Do prawidłowego składania i transportu CD4 konieczna jest obecność reszty Thr302 w sekwencji Asn-X-Thr, ze względu na obecność w bliskim sąsiedztwie Cys303, która tworzy wiązanie disiarczkowe w obrębie D4, istotne w formowaniu natywnej konformacji tej cząsteczki [79].

Koreceptory CD8 i CD4 różnią się zawartością kwasu sjałowego i podatnością na acetylację kwasu neuraminowego [53]. Kwasy sjałowe (SA), to grupa monosacharydów obecnych w pozycjach terminalnych glikanów, spośród których najczęściej występuje kwas N-acetylo-5-neuraminowy będący N-acetylową pochodną kwasu neuraminowego [40]. Stwierdzono, że SA mysich limfocytów CD4<sup>+</sup> izolowanych z węzłów chłonnych jest mocniej acetylowany niż CD8<sup>+</sup> [53]. Acetylowanie kwasu neuraminowego może wpływać z kolei na wiązanie lektyn do limfocytów, w tym białek z rodziny Siglec preferencyjnie rozpoznających kwasy sjałowy (ang. *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin*) [16].

CD8, koreceptor obecny na limfocytach Tc, jest glikozylowanym heterodimerem zbudowanym z łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  połączonych wiązaniem disiarczkowym (ryc. 1C) lub homodimerem łańcuchów  $\alpha$  [37]. CD8 $\alpha\beta$  jest głównym koreceptorem dla TCR $\alpha\beta$  100-krotnie bardziej wydajnym niż CD8 $\alpha\alpha$  w generowaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na antygen. Natomiast powinowactwo kompleksu TCR-CD8 do MHC I prezentującego antygen jest ok. 10-krotnie wyższe niż w przypadku samego TCR [18]. Podjednostka  $\beta$  jest szczególnie istotna w funkcji CD8 jako koreceptora TCR w generowaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Jej wiązanie do kompleksu pMHC I indukuje zmiany konformacyjne w obrębie MHC I, które wzmacniają oddziaływanie MHC I i TCR [76]. Zmiany te obejmują zarówno stabilizację kompleksu pMHC/TCR, jak i wzmacnianie sygnału przez połączenie CD8 z kinazą tyrozynową Lck, białkiem adaptorowym LAT (ang. *Linker for Activation of T cells*) i traktami lipidowymi. CD8 może także wiązać MHC I niezależnie od TCR i w ten sposób działa jako cząsteczka adhezyjna [15].

Skład N-glikanów CD8 związany jest z dojrzewaniem, stanem aktywacji limfocytów T i ich szansą przeżycia jako naiwne komórki [15]. W każdym z tych procesów bardzo ważny jest stopień sjałowania (zawartości kwasu sjałowego) cząsteczki CD8. Istnieje co najmniej 18 różnych sjałotransferaz (enzymów ka-

talizujących dołączenie kwasu sjałowego), które modyfikują powierzchnię tymocytów. Niedojrzałe limfocyty oraz aktywowane efektorowe wykazują niski poziom sjałowania, podczas gdy naiwne komórki T są wysoce sjałowane [5]. Wzrost sjałowania towarzyszący dojrzewaniu limfocytów T od niedojrzałych podwójnie pozytywnych (ang. *Double Positive*, DP) do dojrzałych komórek T CD8+ [16], obniża zdolność koreceptora CD8 do rozpoznawania i wiązania MHC I [76]. Sjałowanie O-glikanów rdzenia 1 przez sjałotransferazę ST3Gal1 (ang.  *$\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase 1*) zmienia IV-rzędową strukturę globularnej głowy CD8, zmniejszając jej zdolność do “zaciskania” MHC I. Z kolei obecność SA w rejonie łądygi zapobiega ciasnemu upakowaniu CD8. W przypadku braku SA cząsteczki CD8 są na tyle ściśle upakowane, by zoptymalizować wiązanie MHC [5]. Aktywność ST3Gal1 ma zasadnicze znaczenie w żywotności komórek T CD8+, gdyż przy braku tego enzymu naiwna populacja CD8 ulega znacznej redukcji [70]. Zmniejszenie zawartości SA na O-glikanach rdzenia 1 aktywowanych i efektorowych limfocytów T CD8+ wynika z niedoboru ST3Gal1, podczas gdy obecność tego enzymu jest charakterystyczna dla komórek pamięci [83]. Na powierzchni limfocytów T CD8+ pamięci obecne są również O-glikany rdzenia 2, przez które komórki te wiążą się z P- oraz E-selektyną podczas migracji przez śródbłonek w odpowiedzi na stan zapalny [64].

Obydwie podjednostki koreceptora CD8 są mocno O-glikozylowane a łańcuch  $\beta$  zawiera również co najmniej 2 miejsca N-glikozylacji. Globularna głowa CD8 związana jest z błoną za pomocą łądygi (ryc. 1C). Region łądygi odgrywa ważną rolę w powstawaniu synapsy immunologicznej i orientacji CD8 względem MHC a konformacja tego fragmentu CD8 stabilizowana jest przez O-oligosacharydy. Cukry te zwiększają sztywność łańcucha peptydowego i w efekcie chronią go przed degradacją proteolityczną, jak również zapobiegają niespecyficznym oddziaływaniom łądygi z TCR [73]. Region łądygi obu podjednostek CD8 bogaty jest w reszty Pro, Ser i Thr oraz jest O-glikozylowany, co stwierdzono dla ludzi i wszystkich badanych gatunków zwierząt. Łodyga CD8 $\beta$  zawiera jedno miejsce N- oraz trzy miejsca O-glikozylacji [71] a CD8 $\alpha$  dwa miejsca O-glikozylacji [58]. Globularna głowa CD8 jest jeszcze intensywniej O-glikozylowana niż łądyga; w łańcuchu  $\alpha$  obecne są cztery miejsca wiązania O-glikanów (Thr122, Thr126, Thr132, Thr134) a w łańcuchu  $\beta$  pięć miejsc O-glikozylacji (Thr120, Thr121, Thr124, Thr127 i Thr128). Sjałilacja pojedynczego O-glikanu w jednej z pozycji Thr120-Thr124 ma miejsce jedynie w tymocytach CD8+ SP, więc prawdopodobnie odpowiedzialna jest za zwiększenie wiązania CD8-MHC I tych komórek w porównaniu z niedojrzałymi tymocytami [76]. Lokalizacja miejsc N-glikozylacji podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  jest zróżnicowana u różnych gatunków. Obecność co najmniej jednego miejsca N-glikozylacji na podjednostce  $\beta$  jest wspólna dla wszystkich gatunków, podczas gdy miejsca te dla podjednostki  $\alpha$  są swoiste gatunkowo [56].



## SJALILACJA CD43 I CD45 WPŁYWA NA WIĄZANIE LIGANDÓW I ADHEZJĘ LIMFOCYTÓW

Cząsteczki CD43 i CD45 należą do jednych z najważniejszych glikoprotein znajdujących się na powierzchni limfocytów T i są obecne na wszystkich etapach rozwoju tych komórek [91]. Odgrywają znaczącą rolę w ich rozwoju, aktywacji oraz przeżyciu. Są rozpoznawane przez różne receptory, z których część jest endogennymi lektynami obecnymi na innych komórkach układu odpornościowego, śródbłonna i nowotworowych [10] a ich glikozylacja jest istotna w oddziaływaniach między limfocytom T a otoczeniem. Ze względu na rozbudowaną strukturę glikozyłowanego receptora, w tym wysoki poziom sjalilacji, cząsteczki te muszą znajdować się z dala od miejsca kontaktu APC z komórką T, tak, by możliwa była interakcja komórka-komórka za pośrednictwem mniejszych białek, takich jak TCR oraz koreceptory CD4 i CD8 [16].

CD43 (leukosjalina) jest dużym, transbłonowym białkiem mucynopodobnym o małej, kulistej domenie cytoplazmatycznej, obecnym na powierzchni wielu komórek hemopoetycznych, w tym limfocytów T [82]. Nie ulega ekspresji natomiast na erytrocytach i spoczynkowych limfocytach B [41]. Region zewnątrzkomórkowy CD43 ma długość ok. 45 nm i zawiera ponad 80 reszt Ser lub Thr, z których do 75% jest O-glikozyłowanych [10, 80] oraz jedno potencjalne miejsce N-glikozylacji w pobliżu domeny transbłonowej przy Asn239 (ryc. 1D) [82]. Glikany białka CD43 są mocno sjalowane; w jednej cząsteczce stwierdzono obecność ponad 170 reszt SA. Wysoka zawartość kwasu sjalowego ma znaczenie w komunikacji limfocytów T z receptorami cukrowymi w krwiobiegu, węzłach chłonnych lub śledzionie [67]. Obecność kwasu sjalowego na CD43 osłabia zdolności adhezyjne limfocytów a desjalilacja umożliwia adhezję i aktywację komórki przez rekrutację różnych kinaz [41]. Mimo iż, CD43 jest kodowana przez pojedynczy gen nie zawierający intronów, występuje znaczna heterogeniczność masy tego białka wynikająca ze zróżnicowanej glikozylacji [4]. CD43 występuje w dwóch glikoformach o masie cząsteczkowej 115 i 130 kDa. Pierwsza z nich obecna na spoczynkowych komórkach T, zawiera prawie wyłącznie O-glikany zbudowane z 4 monosacharydów (tetrasacharydy). Glikoforma o większej masie, ulegająca ekspresji na limfocytach niedojrzałych i aktywowanych, posiada głównie rozgałęzione heksasacharydy [82]. Forma 130 kDa jest efektem zmian O-glikozylacji, powstaje z powodu zwiększonej ekspresji enzymu C2GnT (ang. *Core 2-GlcNAc-transferase*) rozbudowującego strukturę O-glikanów po aktywacji komórek T [4, 66]. Masa cząsteczkowa części białkowej CD43 wynosi ok. 44 kDa, więc aż 62-66% jej masy stanowią O-glikany [10]. Zmiany w ekspresji glikoform CD43 skorelowane są z różnicami w funkcji limfocytów T. Efektorowe limfocyty T CD8<sup>+</sup> wykazują zwiększony poziom glikoformy 130 kDa w porównaniu z naiwnymi lub pamięć-

ciowymi komórkami T CD8+ [31]. CD43 bierze udział w adhezji komórek T do śródbłonka w czasie migracji limfocytów do miejsca zapalnego oraz pełni rolę w ich przemieszczaniu, gdyż E-selektyna obecna na komórkach śródbłonka wiąże CD43 o masie 130 kDa za pośrednictwem sjałowanych struktur Lewis X obecnych w cząsteczkach O-glikanów rdzenia 2 [94]. Zwiększoną zawartość glikoformy o masie 130 kDa stwierdzono u osób z białaczką oraz zespołem Wiskotta-Aldricha [32]. O-glikany CD43 stanowią również ligandy dla gal-1 [33]. Gal-1 wykazuje wyższe powinowactwo do O-glikanów rdzenia 2 w porównaniu z rdzeniem typu 1. Badania wykazały, że powinowactwo gal-1 do sekwencji Gal $\beta$ 1,3GalNAc w O-glikanach rdzenia 1 jest 125-krotnie niższe niż do disacharydu Gal $\beta$ 1,4GlcNAc obecnego w rdzeniu 2 [14]. Modyfikacja glikozylacji CD43 przez C2GnT jest ważna również dla dojrzewania limfocytów i tworzenia funkcjonalnie kompetentnych komórek. Dodanie struktur O-glikanów rdzenia 2 do CD43 wpływa na adhezję limfocytów do komórek nabłonkowych grasicy podczas ich rozwoju [4]. ST3Gal1 konkuruje z C2GnT o substraty rdzenia 1 O-glikanów [13] a tym samym osłabia wiązanie gal-1 do CD43 [70]. Aktywność i ekspresja obydwu enzymów jest komórkowo-specyficzna; C2GnT jest charakterystyczna dla Th1, natomiast większą aktywność ST3Gal1 stwierdzono w przypadku subpopulacji Th2 [27], co wpływa na wyższy poziom  $\alpha$ 2,6-sjałilacji w limfocytach Th2 [27, 81].

Cząsteczka CD45 jest białkiem przezbłonowym wywodzącym się z linii hematopoetycznej, występującym obficie w błonie komórek jądrzastych. Białko CD45 jest N- i O-glikozylowane w sposób zależny od etapu rozwoju komórki. Glikozylacja CD45 warunkuje oddziaływanie z innymi białkami, wpływa na sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz moduluje odpowiedź limfocytów T na antygen [22]. Część wewnątrzkomórkowa CD45 zawiera domenę fosfatazy tyrozynowej (D1) i domenę C-końcową (D2) (ryc. 1E), która wiąże cytoplazmatyczny fragment do cytoszkieletu aktynowego za pośrednictwem fodryny. Domena D2 nie wykazuje aktywności katalitycznej. Fodryna wiążąca się z domeną D2, działa jak regulator aktywności i specyficzności fosfatazy substratowej D1. Część zewnątrzkomórkowa CD45 składa się z trzech fibronektynopodobnych regionów (FN), domeny bogatej w Cys oraz z trzech domen powstających z alternatywnego składowania mRNA, nazwanych A, B i C, które zawierają O-glikany rdzenia 1 i 2 dołączone do reszt Ser i Thr (ryc. 1E) [22, 90]. O-glikany usytuowane w dystalnej części CD45 to struktury rdzenia 1 i 2, które mogą zawierać sekwencje poliLacNAc oraz reszty SA i Fuc. Natomiast struktura N-glikanów w regionie FN zmienia się w trakcie rozwoju limfocytów od form wielomannozowych do złożonych i hybrydowych, co jest niezbędne do utrzymania stabilności cząsteczki CD45 oraz jej transportu do powierzchni komórki [3, 22]. Izoformy CD45 są odmiennie glikozylowane i w efekcie z różnym powinowactwem wiążą ligand [22, 87]. Istnieje co najmniej 8 izoform CD45, z których 5 (R0, RA, RB, RBC, RABC) znajduje się na powierzchni ludzkich limfocytów. W wyni-

ku alternatywnego składania mRNA, N-glikozylowane fragmenty białka pozostają niezienne, natomiast długość O-glikozylowanej części oraz liczba dołączonych O-glikanów różni się pomiędzy poszczególnymi izoformami. Liczba dołączonych N-glikanów zależy od etapu rozwoju oraz podklasy limfocytów T. Oligosacharydy w znacznym stopniu przyczyniają się do masy cząsteczkowej każdej izoformy CD45. Biorąc pod uwagę, że masa cząsteczkowa polipeptydu CD45 mieści się w zakresie 123-141 kDa a masa glikoform wynosi 180-230 kDa, to około 30% całkowitej masy stanowi glikan [33, 94]. Wszystkie izoformy posiadają do 11 N-glikanów w rejonie bliższym błony oraz 8-47 O-glikanów w części dystalnej [10]. Około połowa N-glikanów CD45 na tymocytach to oligosacharydy wielomannozowe lub hybrydowe a większość N-glikanów CD45 na obwodowych limfocytach T jest typu złożonego [68]. Stwierdzono też różnice w glikozylacji CD45 naiwnej populacji CD4 w porównaniu do CD8 [16].

Bogata glikozylacja białka CD45 wpływa znacząco na jego funkcje. N- i O-glikozylowany fragment pozakomórkowy oddziałuje z lektynami, co reguluje aktywność domeny wewnątrzkomórkowej. Cząsteczka CD45 jest równomiernie rozmieszczona na całej powierzchni limfocyta spoczynkowego a po związaniu z gal-1 ma miejsce przegrupowanie prowadzące do powstania skupisk tych receptorów. Grupowanie zmniejsza aktywność fosfatazy tyrozynowej zależną od obecności glikanów w cząsteczce CD45 [22]. Aktywność C2GnT skutkuje powstaniem ligandów dla gal-1 a następnie grupowaniem CD45 inicjującym szlak apoptozy [1, 63]. N- i O-glikany CD45 zawierające ujemnie naładowane reszty SA, mogą utrzymywać pojedyncze cząsteczki fizycznie oddzielone od siebie. Powoduje to zwiększenie sygnalizacji TCR przez aktywację wewnątrzkomórkowej fosfatazy CD45. I odwrotnie, zmniejszenie zawartości SA lub osłabienie wiązania lektyn zmniejsza sygnalizację TCR [10]. Zmiany w sjalilacji obu typów glikanów wpływają na oddziaływanie CD45 z ligandami. Sjalilacja O-glikanów rdzenia 1 blokuje aktywność C2GnT i tym samym powstanie O-glikanów rdzenia 2 [22]. Zwiększoną ekspresję O-glikanów rdzenia 2 CD45 stwierdzono w infekcjach wirusowych, chorobach autoimmunizacyjnych oraz po przeszczepach [30].

Aktywność enzymu C2GnT jest zwiększona w spolaryzowanych limfocytach CD4<sup>+</sup> Th1 i Th2 oraz podczas aktywacji komórek T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Powstałe w efekcie O-glikany rdzenia 2 są szczególnie istotne dla komórek Th1, gdyż jako ligandy dla P-selektyny regulują przemieszczanie się limfocytów oraz są ligandami dla gal-1. Opisana powyżej zwiększona w Th2 ekspresja ST3Gal1, który konkuruje z C2GnT o substraty O-glikanów rdzenia 1, wiąże się również ze zmianą sjalilacji CD45. Sjalowane  $\alpha$ 2,6 N-glikany CD45 są słabiej wiązane do gal-1. SA na CD45 występuje obficie na dojrzałych tymocytach, natomiast w niewielkiej ilości na niedojrzałych tymocytach, co również przyczynia się do niewrażliwości tymocytów pojedynczo pozytywnych (ang. *Single-Positive*, SP) na działanie gal-1 [23, 56, 87].

## PODSUMOWANIE

Obecnie w erze post-genomicznej, coraz więcej badań koncentruje się na modyfikacjach potranslacyjnych białek, wśród których prym wiedzie glikozylacja [47]. Białka komórek układu odpornościowego, w tym limfocytów T, są jednymi z najczęściej badanych pod kątem glikozylacji. Jednak ogromna różnorodność struktur cukrowych i wysoki stopień skomplikowania ich budowy utrudniają te badania. Udoskonaleniu wymagają metody badawcze, które pozwolą na sprawną i precyzyjną analizę strukturalną i funkcjonalną glikomu. Zaburzenia procesu glikozylacji białek prowadzą do nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórek i rozwoju chronicznych chorób układu odpornościowego [48], dlatego pokonanie trudności metodycznych analiz glikozylacji otworzy również nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

## PODZIĘKOWANIA

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego nr 2015/18/E/NZ6/00602 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki

## LITERATURA

- [1] AMANO M, GALVAN M, HE J, BAUM LG. The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 2003; **278**: 7469-7475.
- [2] AVCI FY, LI X, TSUJI M, KASPER DL. Carbohydrates and T cells: a sweet twosome. *Semin Immunol* 2013; **25**: 146-151.
- [3] BALDWIN TA, GOGELA-SPEHAR M, OSTERGAARD HL. Specific isoforms of the resident endoplasmic reticulum protein glucosidase II associate with the CD45 protein-tyrosine phosphatase via a lectin-like interaction. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32071-32076.
- [4] BARRAN P, FELLINGER W, WARREN CE, DENNIS JW, ZILTENER HJ. Modification of CD43 and other lymphocyte O-glycoproteins by core 2 N-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology* 1997; **7**: 129-136.
- [5] BAUM LG. Developing a taste for sweets. *Immunity* 2002; **16**: 5-8.
- [6] BAVARO T, TENGATTINI S, PIUBELLI L, MANGIONE F, BERNARDINI R, MONZILLO V, CALAROTA S, MARONE P, AMICOSANTE M, POLLEGIONI L, TEMPORINI C, TERRENI M. Glycosylation of recombinant antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*: in silico prediction of protein epitopes and *ex vivo* biological evaluation of new semi-synthetic glycoconjugates. *Molecules* 2017; **22**: e1081.
- [7] CHAPLIN DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 3-23.
- [8] CHEN HL, LI CF, GRIGORIAN A, TIAN W, DEMETRIOU M. T cell receptor signaling co-regulates multiple Golgi genes to enhance N-glycan branching. *J Biol Chem* 2009; **284**: 32454-32461.
- [9] CHUI D, SELAKUMAR G, GREEN RS, SUTTON-SMITH M, MCQUISTAN T, MAREK KW, MORRIS HR, DELL A, MARTH JD. Genetic remodeling of protein glycosylation *in vivo* induces autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 1142-1147.
- [10] CLARK MC, BAUM LG. T cell modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 2012; **1253**: 58-67.

- [11] CUMMINGS RD, PIERCE JM. The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol* 2014; **21**: 1-15.
- [12] DALZIEL M, CRISPIN M, SCANLAN CN, ZITZMANN N, DWEK RA. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* 2014; **343**: 1235681.
- [13] DALZIEL M, WHITEHOUSE C, MCFARLANE I, BROCKHAUSEN I, GSCHMEISSNER S, SCHWIENK T, CLAUSEN H, BURCHELL JM, TAYLOR-PAPADIMITRIOU T. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycans structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11007-11015.
- [14] DAM TK, BREWER CF. Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* 2010; **20**: 270-279.
- [15] DANIELS MA, DEVINE L, MILLER JD, MOSER JM, LUKACHER AE, ALTMAN JD, KAVATHAS P, HOSQUIST KA, JAMESON SC. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* 2001; **15**: 1051-1061.
- [16] DANIELS MA, HOGQUIST KA, JAMESON SC. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol* 2002; **3**: 903-910.
- [17] DEMETRIOU M, GRANOVSKY M, QUAGGIN S, DENNIS JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001; **409**: 733-739.
- [18] DEMOTTE N, STROOBANT V, COURTOY PJ, VAN DER SMISSEN P, COLAU D, LUESCHER IF, HIVROZ C, NICAISE J, SQUIFFLET JL, MOURAD M, GODELAINE D, BOON T, VAN DER BRUGGEN P. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity* 2008; **28**: 414-424.
- [19] DENNIS JW, LAU KS, DEMETRIOU M, NABI IR. Adaptive regulation at cell surface by N-glycosylation. *Traffic* 2009; **10**: 1569-1578.
- [20] DIAS AM, DOURADO J, LAGO P, CABRAL J, MARCOS-PINTO R, SALGUEIRO P, ALMEIDA CR, CARVALHO S, FONSECA S, LIMA M, VILANOVA M, DINIS-RIBEIRO M, REIS CA, PINHO SS. Dysregulation of T cell receptor N-glycosylation: a molecular mechanism involved in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: 2416-2427.
- [21] EAKIN A, BUSTARD MJ, MCGEOUGH M, AHMED T, BJORSON AJ, GIBSON DS. Siglec-1 and -2 as potential biomarkers in autoimmune disease. *Proteomics Clin Appl* 2016; **10**: 635-644.
- [22] EARL LA, BAUM LG. CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol Cell Biol* 2008; **86**: 608-615.
- [23] EARL LA, BI S, BAUM LG. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 2010; **285**: 2232-2244.
- [24] EASTON R. Glycosylation of proteins-structure, function and analysis. *Life Science* 2011; **48**: 1-5.
- [25] GOETTIG P. Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *Int J Mol Sci* 2016; **17**: 1969.
- [26] GOŁĄB J, JAKÓBISIAK M, LASEK W, STOKŁOSA T. Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2014.
- [27] GRABIE N, DELFS MW, LIM YC, WESTRICH JR, LUSCINSKAS FW, LICHTMAN AH.  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase-I gene expression during Th2 but not Th1 differentiation: implications for core2-glycans formation on cell surface proteins. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 2766-2772.
- [28] GRIGORIAN A, LEE SU, TIAN W, CHEN IJ, GAO G, MENDELSON R, DENNIS JW, DEMETRIOU M. Control of T cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 2007; **282**: 20027-20035.
- [29] GRIGORIAN A, TOROSSIAN S, DEMETRIOU M. T-cell growth, cell surface organization, and the galectin glycoprotein lattice. *Immunol Rev* 2009; **230**: 232-246.
- [30] HARRINGTON LE, GALVAN M, BAUM LG, ALTMAN JD, AHMED R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med* 2000; **191**: 1241-1246.
- [31] HASLAM SM, JULIEN S, BURCHELL JM, MONK CR, CERONI A, GARDEN OA, DELL A. Characterizing the glycome of the mammalian immune system. *Immunol Cell Biol* 2008; **86**: 564-573.
- [32] HERNANDEZ JD, BAUM LG. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology* 2002; **12**: 127R-136R.

- [33] HERNANDEZ JD, KLEIN J, VAN DYKEN SJ, MARTH JD, BAUM LG. T-cell activation results in microheterogeneous changes in glycosylation of CD45. *Int Immunol* 2007; **19**: 847-856.
- [34] HOUNSELL EF, DAVIES MJ. Role of protein glycosylation in immune regulation. *Ann Rheum Dis* 1993; **52**: S22-S29.
- [35] HUBBARD SC, KRANZ DM, LONGMORE GD, SITKOVSKY MV, EISEN HN. Glycosylation of the T-cell antigen-specific receptor and its potential role in lectin-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **83**: 1852-1856.
- [36] JAGUSZTYN-KRYNICKA EK, ŻYCKA J, TOMCZYK K, WYSZYŃSKA A. Glikozylacja białek mikroorganizmów rodzaju *Campylobacter*. *Post Mikrob* 2005; **44**: 299-308.
- [37] JANEWAY CA JR, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK MJ. Immunobiology: The immune system in health and disease. V edycja, Garland Science, Nowy Jork, 2001.
- [38] JOHANNSEN T, LEPENIES B. Glycan-based cell targeting to modulate immune responses. *Trends Biotechnol* 2017; **35**: 334-346.
- [39] JOHNSON JL, JONES MB, RYAN SO, COBB BA. The regulatory power of glycans and their binding partners in immunity. *Trends Immunol* 2013; **34**: 290-298.
- [40] KAŃNIK-PRASTOWSKA I. Struktura i biologia kwasów sjałowych. *Adv Clin Exp Med* 2003; **12**: 653-663.
- [41] KHAN S, HOLDING S, DORÉ PC, SEWELL WA. Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for some features of Wiskott-Aldrich syndrome. *Med Hypotheses* 2008; **70**: 269-272.
- [42] KIM PJ, LEE DY, JEONG H. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS One* 2009; **4**: e7317.
- [43] KIM ST, SHIN Y, BRAZIN K, MALLIS RJ, SUN ZY, WAGNER G, LANG MJ, REINHERZ EL. TCR mechanobiology: torques and tunable structures linked to early T cell signaling. *Front Immunol* 2012; **3**: 1-8.
- [44] KRISTIC J, ZOLDOS V, LAUC G. Complex genetics of protein N-glycosylation, W: Taniguchi N. i wsp. (red), Glycoscience: Biology and Medicine, Springer Reference, Tokio 2015; 1303-1310.
- [45] KRZEŚLAK A, LIPIŃSKA. O-Glikozylacja białek jądrowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 441-460.
- [46] KUBALL J, HAUPTROCK B, MALINA V, ANTUNES E, VOSS RF, WOLFF M, STRONG R, THEOBALD M, GREENBER PD. Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J Exp Med* 2009; **206**: 463-475.
- [47] LAUC G, PEZER M, RUDAN I, CAMPBELL H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1860**: 1574-1582.
- [48] LOWE JB. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell* 2001; **104**: 809-812.
- [49] LU D, YANG C, LIU Z. How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: a molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B* 2012; **116**: 390-400.
- [50] LYONS JJ, MILNER JD, ROSENZWEIG SD. Glycans instructing immunity: the emerging role of altered glycosylation in clinical immunology. *Front Pediatr* 2015; **3**: 1-10.
- [51] MARGRAF-SCHONFELD S, BOHM C, WATZL C. Glycosylation affects ligand binding and function of the activating natural killer cell receptor 2B4 (CD244) protein. *J Biol Chem* 2011; **286**: 24142-24149.
- [52] MARTH JD, GREWAL PK. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 874-887.
- [53] MARTIN LT, MARTH JD, VARKI A, VARKI NM. Genetically altered mice with different sialyltransferase deficiencies show tissue-specific alterations in sialylation and sialic acid 9-O-acetylation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 32930-32938.
- [54] MAVERAKIS E, KIM K, SHIMODA M, GERSHWIN ME, PATEL F, WILKEN R, RAYCHAUDHURI S, RUHAAK LR, LEBRILLA CB. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 2015; **57**: 1-13.
- [55] MEISSNER J, BONIK M, MAJKOWSKI M, GROCHOWALSKA R, MACHNICKA B. Synapsa immunologiczna i aktywacja komórek T. *Post Biol Kom* 2012; **39**: 100-111.
- [56] MERRY AH, GILBERT RJ, SHORE DA, ROYLE L, MIROSHNYCHENKO O, VUONG M, WORMALD MR, HARVEY DJ, DWEK RA, CLASSON BJ, RUDD PM, DAVIS SJ. O-glycan sialylation and the structure of the stalk-like region of the T cell co-receptor CD8. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27119-27128.

- [57] MKHIKIAN H, MORTALES CL, ZHOU RW, KHACHIKYAN K, WU G, HASLAM SM, KAVARIAN P, DELL A, DEMETRIOU M. Golgi self-correction generates bioequivalent glycans to preserve cellular homeostasis. *Elife* 2016; **5**: e14814.
- [58] MOODY AM, CHUI D, RECHE PA, PRIATEL JJ, MARTH JD, REINHERZ EL. Developmentally regulated glycosylation of the CD8 $\alpha$  coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell* 2001; **107**: 501-512.
- [59] MOREMEN KW, TIEMEYER M, NAIRN AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 448-462.
- [60] MORGAN R, GAO G, PAWLING J, DENNIS JW, DEMETRIOU M, LI B. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol* 2004; **173**: 7200-7208.
- [61] NABI IR, SHANKAR J, DENNIS JW. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci* 2015; **128**: 2213-2219.
- [62] NAGAE M, YAMAGUCHI Y. Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int J Mol Sci* 2012; **13**: 8398-8429.
- [63] NGUYEN JT, EVANS DP, GALVAN M, PACE KE, LEITENBERG D, BUI TN, BAUM LG. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol* 2001; **167**: 5697-5707.
- [64] NOLZ JC, HARTY JT. IL-15 regulates CD8 $^{+}$  T cell O-glycan synthesis and affects trafficking. *J Clin Invest* 2014; **124**: 1013-1026.
- [65] NOTHAFT H, SZYMAŃSKI CM. Bacterial protein N-glycosylation: new perspectives and applications. *J Biol Chem* 2013; **288**: 6912-6920.
- [66] ONAMI TM, HARRINGTON LE, WILLIAMS MA, GALVAN M, LARSEN CP, PEARSON TC, MANJUNATH N, BAUM LG, PEARCE BD, AHMED R. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol* 2002; **168**: 6022-6031.
- [67] PILLER F, PILLER V, FOX RI, FUKUDA M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycans biosynthesis. *J Biol Chem* 1988; **263**: 15146-15150.
- [68] POCHĘC E, BOCIAN K, ZĄBCZYŃSKA M, KORCZAK-KOWALSKA G, LITYŃSKA A. Immunosuppressive drugs affect high-mannose/hybrid N-glycans on human allostimulated. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015; **2015**: 324980.
- [69] POKRYWKA M, LITYŃSKA A. Budowa i funkcje biologiczne galektyny-3. Część I. *Post Biol Kom* 2010; **37**: 677-684.
- [70] PRIATEL J, CHUI D, HIRAOKA N, SIMMONS CJT, RICHARDSON KB, PAGE DM, FUKUDA M, VARKI NM, MARTH JD. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8 $^{+}$  T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 2000; **12**: 273-283.
- [71] RETTING L, MCNEILL L, SARNER N, GUILLAUME P, LUESCHER I, TOLAINI M, KIOUSSIS D, ZAMOYSKA R. An essential role for the stalk region of CD8 $\beta$  in the coreceptor function of CD8. *J Immunol* 2009; **182**: 121-129.
- [72] RUDD PM, ELLIOTT T, CRESSWELL P, WILSON IA, DWEK RA. Glycosylation and the immune system. *Science* 2001; **291**: 2370-2376.
- [73] RUDD PM, MERRY AH, DWEK RA. Roles for glycosylation in receptor-ligand interactions in the immune system, W: Godia F., Fussengger M. (red), Animal Cell Technology Meets Genomics, Springer Netherlands, 2005; 31-42.
- [74] RUDD PM, WORMALD MR, STANFIELD RL, HUANG M, MATSSON N, SPEIR JA, DIGENARO JA, FETROW JS, DWEK RA, WILSON IA. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* 1999; **293**: 351-366.
- [75] RYAN SO, COBB BA. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. *Semin Immunopathol* 2012; **34**: 425-441.
- [76] SHORE DA, WILSON IA, DWEK RA, RUDD PM. Glycosylation and the function of the T cell co-receptor CD8. *Adv Exp Med Biol* 2005; **564**: 71-84.
- [77] SUN L, MIDDLETON DR, WANTUCH PL, OZDILEK A, AVCI FY. Carbohydrates as T-cell antigens with implications in health and disease. *Glycobiology* 2016; **26**: 1029-1040.

- [78] SURMAN M, JANIK M. Regulacja procesu glikozylacji białek przez kaskadę cAMP. *Post Bioch* 2014; **60**: 305-312.
- [79] TIFFT CJ, PROIA RL, CAMERINI-OTERO RD. The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3268-3273.
- [80] TONG J, ALLENSPACH EJ, TAKAHASHI SM, MODY PD, PARK C, BURKHARDT JK, SPERLING AI. CD43 regulation of T cell activation is not through steric inhibition of T cell-APC interactions but through an intracellular mechanism. *J Exp Med* 2004; **199**: 1277-1283.
- [81] TOSCANO MA, BIANCO GA, ILARREGUI JM, CROCI DO, CORREALE J, HERNANDEZ JD, ZWIRNER NW, POIRIER F, RILEY EM, BAUM LG, RABINOVICH GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; **8**: 825-834.
- [82] TUCCILLO FM, DE LAURENTIIS A, PALMIERI C, FIUME G, BONELLI P, BORRELLI A, TASSONE P, SCALA I, BUONAGURO FM, QUINTO I, SCALA G. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 1-13.
- [83] VAN DYKEN SJ, GREEN RS, MARTH JD. Structural and mechanistic features of protein O glycosylation linked to CD8+ T-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 1096-1111.
- [84] VAN KOOYK Y, KALAY H, GARCIA-VALLEJO JJ. Analytical tools for the study of cellular glycosylation in the immune system. *Front Immunol* 2013; **4**: 451.
- [85] VAN VLIET SJ, VUIST IM, LENOS K, TEFSEN B, KALAY H, GARCIA-VALLEJO JJ, VAN KOOYK Y. Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)-calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galatose-type lectin (MGL). *J Biol Chem* 2013; **288**: 27519-27532.
- [86] VARKI A, CUMMINGS RD, ESKO DJ, FREEZE HH, HART GW, ETZLER ME. Essentials of glycobiology, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Nowy Jork 2008.
- [87] VASTA GR, AHMED H, NITA-LAZAR M, BANERJEE A, PASEK M, SHRIDHAR S, GUHA P, FERNANDEZ-ROBLEDO JA. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Front Immunol* 2012; **3**: 1-14.
- [88] VOLLMAR A, ZUNDORF I, DINGERMAN T. Immunologia i immunoterapia, red. wyd. pol. ŻEROMSKI J., MedPharm, Wrocław 2015.
- [89] WOLFERT MA, BOONS GJ. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nat Chem Biol* 2013; **9**: 776-784.
- [90] XUE J, GAO X, FU C, CONG Z, JIANG H, WANG W, CHEN T, WEI Q. Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett* 2013; **587**: 3986-3994.
- [91] YANG Q, BELL J, BHANDoola A. T-cell lineage determination. *Immunol Rev* 2010; **238**: 12-22.
- [92] ZAPATA DA, SCHAMEL WWA, TORRES PS, ALARC NB, ROSSI NE, NAVARRO MN, TORIBIO ML, REGUEIRO JR. Biochemical differences in the T cell receptor CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 24485-24492.
- [93] ZĄBCZYŃSKA M, OPIOLA K, POCHEĆ E. Rola glikozylacji w aktywacji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu. *Post Biol Kom* 2016; **43**: 289-304.
- [94] ZĄBCZYŃSKA M, POCHEĆ E. Rola glikozylacji białek układu odpornościowego. *Post Bioch* 2015; **61**: 129-137.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 03.09.2017*

*Przyjęto: 25.09.2017*

*Ewa Pocheć*

*Zakład Biochemii Glikokoniugatów, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych*

*Uniwersytet Jagielloński*

*ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków*

*tel.: (12) 664 64 67*

*e-mail: ewa.pochec@uj.edu.pl*