

ژنتیک آنتی بادی‌ها

بازآرایی ژنی و بیان گیرنده آنتی ژن

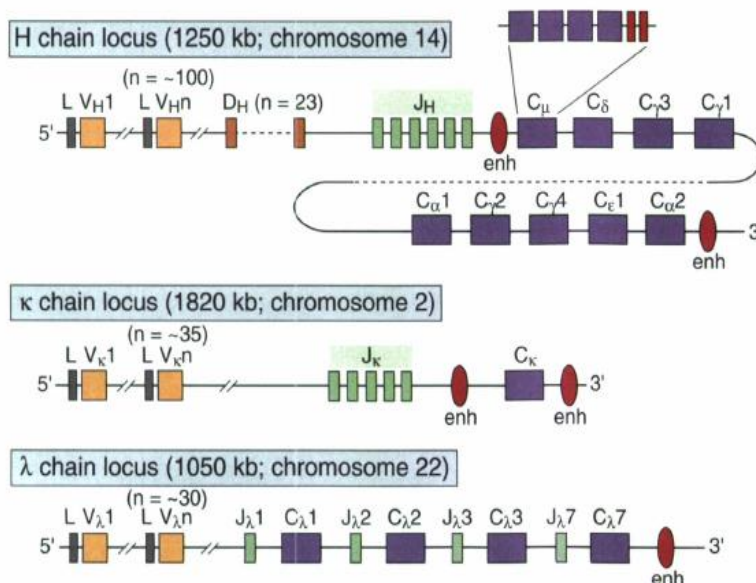
بازآرایی ژن‌های گیرنده آنتی ژن، رویدادی کلیدی در تکامل لنفوسیت‌ها است و برای ایجاد گنجینه (repertoire) متنوع لنفوسیتی لازم است. هر کلون از لنفوسیت‌های B و T، گیرنده آنتی ژن مخصوص به خود را تولید می‌کند. احتمال می‌رود در هر فرد بیش از 10^7 کلون لنفوسیتی مختلف از سلول‌های B یا T با گیرنده اختصاصی منحصر به فرد وجود داشته باشد. توانایی هر فرد برای سازمان دهی چنین گنجینه متنوعی طوری تنظیم می‌شود که به تعداد زیادی ژن نیازی نباشد. در غیر اینصورت قسمت اعظم ژنوم ما می‌بایست به رمزدهی مولکول‌های آنتی بادی (BCR) و گیرنده سلول T (TCR) اختصاص می‌یافت.

در طی روندی تحت عنوان بازآرایی ژنی (recombination, rearrangement)، از بخش نسبتاً کوچکی از ژنوم در سلول نابالغ B در مغز استخوان و سلول‌های نابالغ T در تیموس تعداد زیادی گیرنده‌های آنتی ژنی تولید می‌شود. این مرحله مستقل از آنتی ژن‌های خارجی است و پیش از برخورد با آنتی ژن گیرنده‌های آنتی ژنی متنوع بر سطح سلول‌های B و T بیان می‌شوند.

بازآرایی در ژن‌های BCR یا TCR، شامل باز شدن جایگاه ژن و اتصال قطعات DNA در این جایگاه به نحوی انجام می‌گردد که گیرنده آنتی ژن کارآمدی بوجود آید. در طی این روند بازهای بین دو قطعه ژنی بطور تصادفی حذف یا اضافه شده و به دنبال آن دو قطعه به هم متصل می‌شوند. این امر باعث به حداکثر رسیدن تنوع (diversity) در گیرنده‌ها خواهد شد. در سلول‌های B در حال تکامل، نخست ژن زنجیره سنگین و سپس ژن زنجیره سبک دستخوش بازآرایی می‌گردند.

بازآرایی ژن‌های ایمونوگلوبولین‌ها در لنفوسیت‌های B

هر آنتی بادی از یک نوع زنجیره سنگین و یک نوع زنجیره سبک کاپا یا لامبدا تشکیل شده است. برای هر یک از این زنجیره‌ها یک جایگاه ژنی در DNA وجود دارد در انسان جایگاه ژنی کد کننده زنجیره سنگین بر روی کروموزوم 14، جایگاه ژنی کد کننده زنجیره سبک کاپا بر روی کروموزوم 2 و جایگاه کد کننده زنجیره سبک لامبدا بر روی کروموزوم 22 قرار گرفته است.



در انتهای 5' هر جایگاه ایمونوگلوبولینی، قطعه‌های ژنی متغیر (V) که طول هر کدام حدود 300 جفت باز است قرار دارند. تعداد قطعات ژنی V در جایگاه ژنی زنجیره سنگین انسان حدود 100 ژن، در کاپا حدود 35 ژن و در لامبدا حدود 3 ژن می‌باشد. در بالادست هر ناحیه V، یک رشته نوکلئوتیدی قرار دارد که 20-30 اسید آمینه انتهایی را کد می‌نماید که بطور معمول آب گریز هستند و پپتید راهنما (Leading Peptide) را می‌سازند. این پپتید در هر نوع پروتئین ترشحی یا داخل غشایی تازه ساز وجود دارد و پروتئین در حال ساخت توسط ریبوزوم را به داخل شبکه اندوپلاسمی هدایت می‌کند و سپس تجزیه می‌گردد.

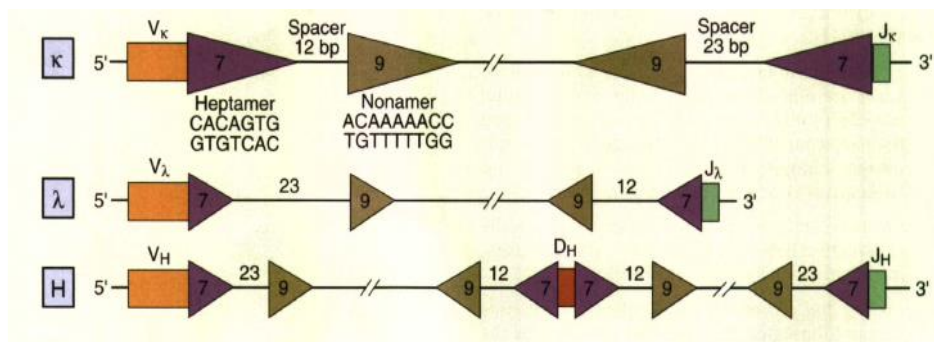
در قسمت بالا دست هر توالی راهنما، پروموتور ژن V قرار دارد. در فواصل مختلف از انتهای 3' قطعات ژنی V چندین قطعه ژنی J وجود دارد که بلافاصله پس از آنها اگزون‌های نواحی ثابت قرار می‌گیرند. اندازه قطعات J بطور معمول 30-50 جفت باز است که با اینترون‌ها از یکدیگر جدا می‌شوند.

در ژن زنجیره سنگین بر خلاف زنجیره سبک قطعات ژنی D نیز قرار دارند. در انسان ژن زنجیره سبک کاپا تنها شامل یک ناحیه ژنی ثابت CK است دارد در حالیکه ژن زنجیره سبک لامبدا دارای چهار ناحیه ژنی ثابت C λ عملکردی می‌باشد. ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین 9 ژن ثابت (CH) دارد که بصورت متوالی پشت سر هم قرار گرفته‌اند و کد کننده 9 ایزوتایپ و زیر کلاس آنتی بادی هستند. ژن‌های C λ و CK هر یک دارای یک اگزون هستند اما ژن‌های CH هر یک از 5 یا 6 اگزون تشکیل شده‌اند که 3-4 اگزون کد کننده دامین‌های ناحیه ثابت می‌باشند و 2 اگزون کوچکتر انتهای کربوکسیلی نواحی مربوط به دامین‌های داخلی غشایی (TM) و سیتوپلاسمی (CY) را کد می‌نمایند. ناحیه متغییر زنجیره‌های سبک کاپا توسط ژن‌های V, J کد می‌شوند در حالیکه در زنجیره‌های سنگین، ناحیه متغییر توسط قطعات ژنی V, D, J رمزدهی می‌شود.

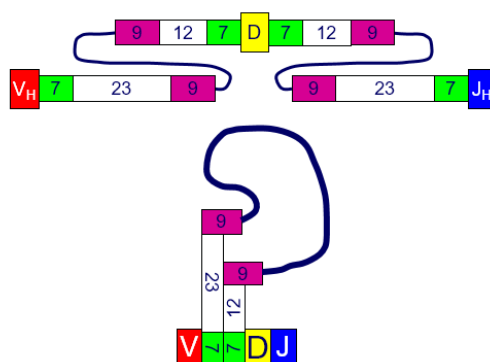
نو ترکیبی J(D)V

جایگاه‌های ژنی ایمونوگلوبولین‌ها در همه سلول‌های بدن وجود دارند اما تنها در لنفوسیت‌های B بازآرایی ژنی در آنها انجام میشود و سپس نسخه برداری از روی آنها صورت می‌گیرد. در بازآرایی DNA بطور اتفاقی قطعاتی از نواحی V, D, J انتخاب می‌شوند و در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند.

در جایگاه‌های ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین روند بازآرایی شامل دو مرحله متمایز از هم است. ابتدا اتصال D به J صورت گرفته و سپس یک قطعه V به قطعه ادغام شده DJ متصل می‌گردد. برای این منظور ابتدا باید کروماتین در نواحی اختصاصی کروموزومی گیرنده آنتی ژن باز شود تا قطعات ژنی در دسترس آنزیم‌های Recombinase قرار گیرند. این آنزیم‌ها توالی‌های خاصی از DNA به نام Recombination Signal Sequences (RSS) را شناسایی می‌کنند. این توالی‌های در سمت 3' هر قطعه ژنی V و 5' هر قطعه J و دو طرف قطعات D قرار گرفته‌اند.



توالی‌های RSS از یک قطعه ثابت هفت نوکلئوتیدی (هپتامر) و همچنین یک توالی فاصله گذار (Spacer) 12 یا 23 نوکلئوتیدی و یک توالی 9 نوکلئوتیدی (نانومر) تشکیل شده‌اند.

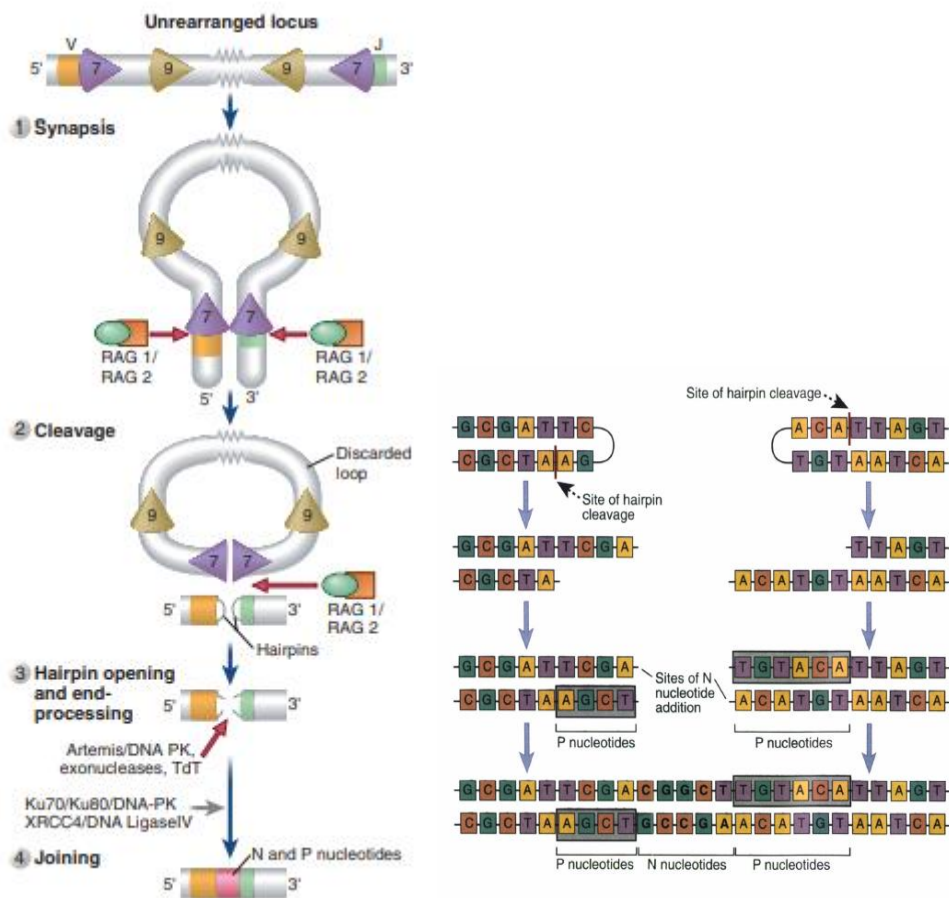


در طی نوترکیبی V(D)J یک برش در ناحیه بین هپتامر و توالی‌های V, D, J مجاور ایجاد می‌شود. سپس DNA دو رشته‌ای بین قطعات به شکل یک حلقه برداشت می‌شود و همزمان دو انتهای قطعات ژنی به یکدیگر متصل می‌شوند. این مراحل در اثر فعالیت هماهنگ چند آنزیم رخ می‌دهد. برخی از این آنزیم‌ها فقط در لنفوسیت‌های در حال تکامل وجود دارند و برخی نیز از گروه آنزیم‌های ترمیم شکستگی DNA دو رشته‌ای هستند و در همه سلول‌ها یافت می‌شوند. از این میان دو پروتئین رمز دهی شده از ژن‌های اختصاصی لنفوتیدی به نام‌های ژن فعال کننده نوترکیبی 1 و 2 (Rag1/2) مجموعه چهار واحدی را تشکیل می‌دهند که VDJ Recombinase نامیده می‌شود. قابل ذکر است که ژن‌های Rag اختصاصی سلول‌های لنفوتیدی می‌باشند و فقط در سلول‌های T, B در حال تکامل بیان می‌شوند. این آنزیم‌ها در مراحل تکثیر سلولی غیر فعال می‌گردند تا خطر تولید برش‌های نامناسب در DNA به حداقل برسد.

بنظر میرسد که Rag2 در شناسایی RSS نقش دارد و Rag1 در ایجاد برش در یکی از دو رشته DNA در محل اتصال بین هپتامر و قطعات ژنی نقش داشته باشد. سپس رشته برش خورده خود به رشته دوم DNA حمله می‌کند و موجب ایجاد یک فسفودی استر لوپ موقت می‌گردد.

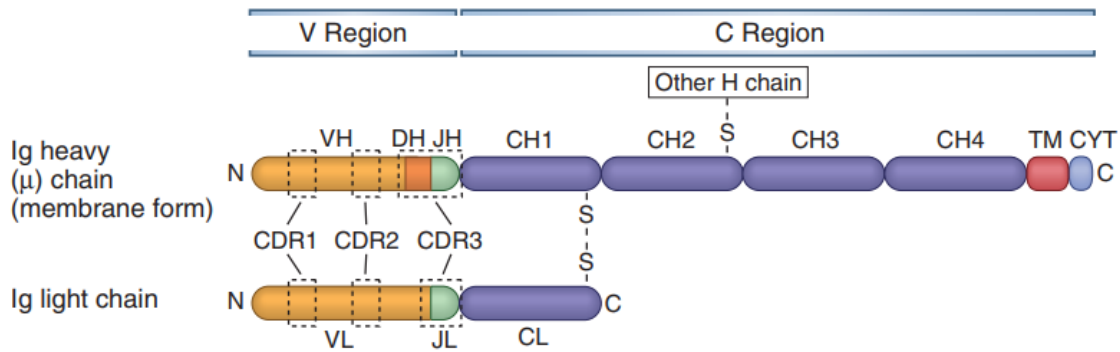
آرتمیس آنزیمی دیگری است که تنها در لنفوسیت‌ها فعال است و با ایجاد برش در این لوپ موقت زمینه را برای اتصال قطعات VDJ فراهم می‌سازد. برش در لوپ موقتی بین دو رشته DNA توسط آرتمیس عمدتاً مرکزی نیست و این برش در هر یک از دو رشته در مکانهای مختلف ممکن است رخ دهد. در اینحالت رشته بلندتر نقش الگو برای ترمیم رشته کوتاهتر را بازی می‌کند و موجب ایجاد

قطعه ای بنام نوکلئوتیدهای P می شود. بدنبال آن افزوده شدن اتفاقی و بدون الگوی حداکثر 20 نوکلئوتید به نام نوکلئوتیدهای N توسط آنزیم TdT موجب افزایش تنوع ایمنوگلوبولین می گردد (N-region diversity). در این مرحله نوعی آنزیم اختصاصی لنفوتیدی دیگر به نام دزکسی توکلئوتیدیل ترانسفراز (TdT) نیز تعدادی باز را به دو انتهای شکسته DNA اضافه می نماید که منجر به افزایش تنوع در ناحیه اتصالی می گردد. پس از آن انتهای توالی های D, V یا J که در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند با روند ترمیم شکستگی DNA دو رشته ای که در همه سلول ها وجود دارد به هم متصل می شوند. در این مرحله دو پروتئین Ku70 و Ku80 به انتهای شکسته DNA متصل می شوند و سبب فراخوانی DNA-PK (پروتئین کیناز DNA) که نوعی آنزیم ترمیم کننده DNA دو رشته ای است می گردند و به همراه DNA Ligase IV/XRCC4 اتصال نهایی قطعات ژنی انجام می گیرد.

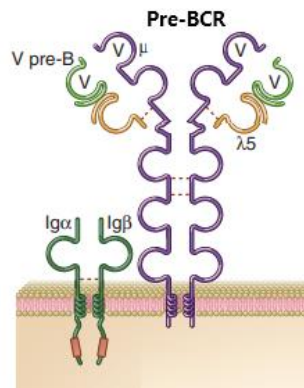


تنوع آنتی بادیها حاصل تنوع ترکیبی (Combinatorial diversity) و تنوع اتصالی (Junctional diversity) است. تنوع ترکیبی در وقایع به اتصال تصادفی قطعات ژنی D, V, J که خود بازتابی از تعداد آنهاست مربوط میشود. بعلاوه تنوع ترکیبی در اثر کنار هم قرار گرفتن تصادفی V_H و V_L نیز افزایش می یابد. اما بیشترین میزان تنوع در گیرنده های آنتی ژنی در اثر حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدها در بین قطعات V و D و J در هنگام اتصال این قطعات به یکدیگر بوقوع می پیوندد.

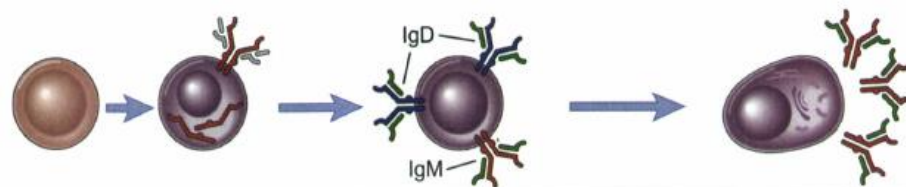
برخلاف CDR1 و CDR2 که هر دو در توالی ژنومی قطعه V تعریف شده اند، تنوع CDR3 که دربرگیرنده نواحی اتصالی است می باشد حاصل افزوده شدن یا حذف نوکلئوتیدهایی است که در طی روند بازآرایی وارد عمل می شوند.



در لنفوسیت‌های B در حال تکامل اولین بازآرایی در ژن‌های کد کننده ناحیه متغیر در زنجیره سنگین بوقوع می‌پیوندد. در اولین بازآرایی قطعات ژنی D, J, به یکدیگر متصل می‌گردند این واقعه در مرحله‌ای از تکامل لنفوسیت‌ها به نام Early pro-B اتفاق می‌افتد در مرحله بعد یعنی Late pro-B قطعات ژنی DJ به V (بازآرایی دوم) متصل می‌گردند. سپس از روی DNA بازآرایی شده متصل به نواحی ثابت، mRNA اولیه ساخته می‌شود که پس از ویرایش VDJ به نزدیک‌ترین ژن ناحیه ثابت زنجیره سنگین یعنی μ متصل است. در واقع زنجیره μ اولین زنجیره‌ای بلندی است که در لنفوسیت‌های B در حال تکامل ساخته می‌شود که در کنار زنجیره‌ای به نام زنجیره سبک جایگزین (Surrogate Light Chain) قرار می‌گیرد. لنفوسیت‌های B در این مرحله را Pre-B می‌گویند.

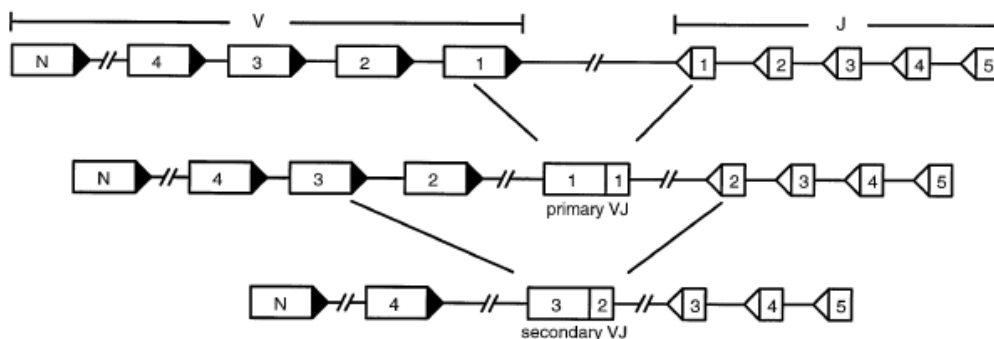


بازآرایی موفق در یک زن زنجیره سنگین مانع از شروع بازآرایی زنجیره سنگین در کروموزوم همولوگ می‌شود به این پدیده حذف آلی یا **Allelic exclusion** می‌گویند که ضامن تولید تنها یک نوع آنتی بادی توسط هر کلون سلول B است.

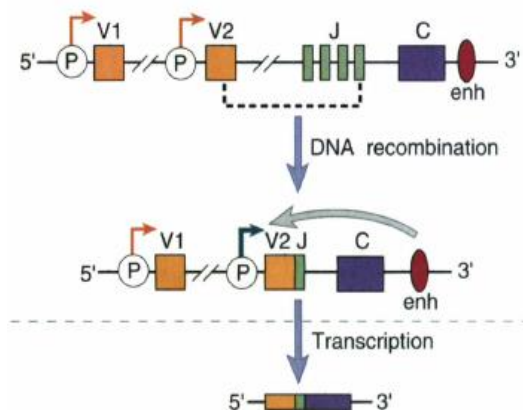


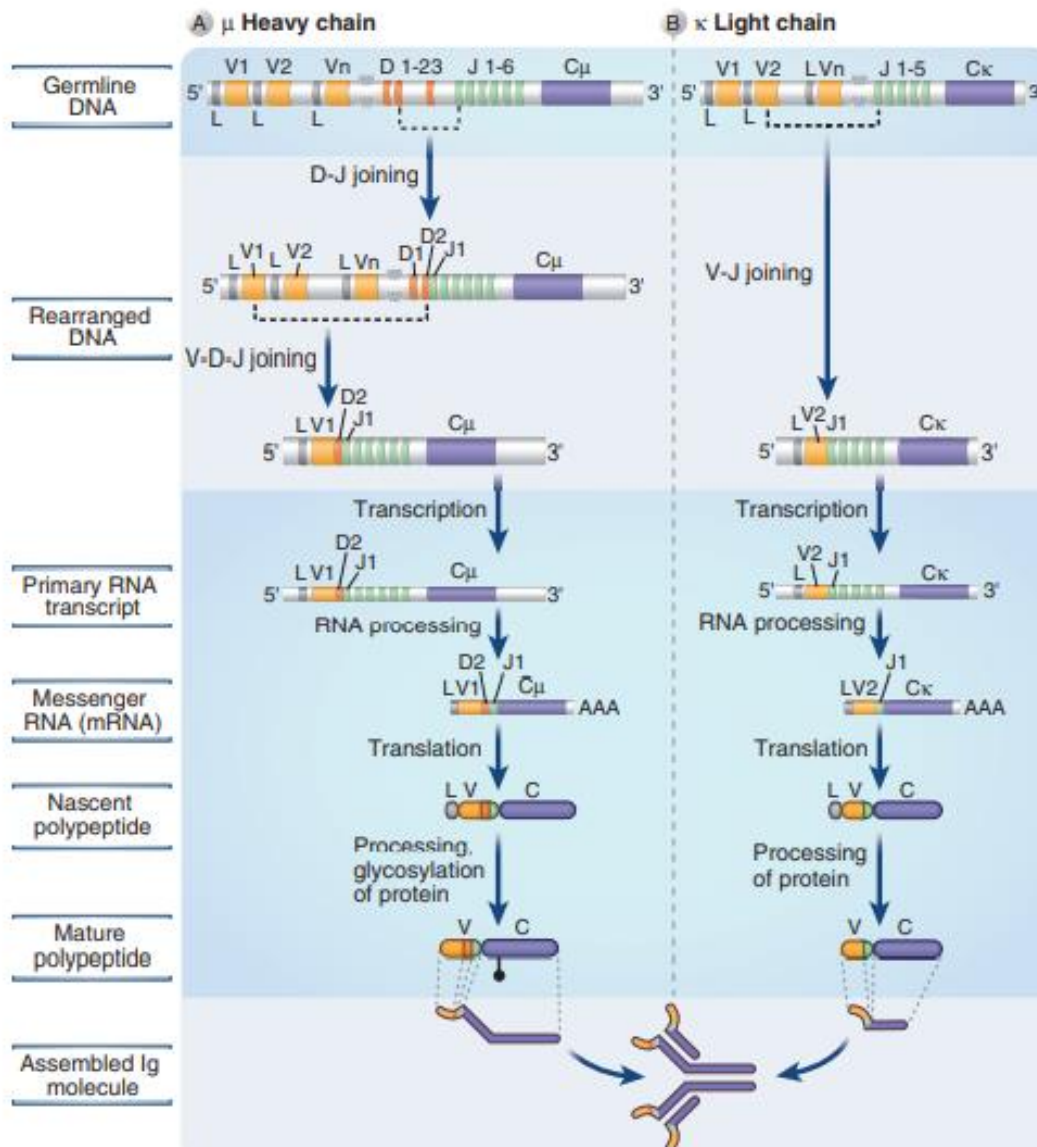
Stage of maturation	Stem cell	Pre-B cell	Immature B cell	Mature B cell	Activated B cell	Antibody-secreting cell
Pattern of immunoglobulin production	None	Cytoplasmic μ heavy chain and pre-B receptor	Membrane IgM	Membrane IgM, IgD	Low rate Ig secretion; heavy chain isotype switching; affinity maturation	High rate Ig secretion; reduced membrane Ig

سیگنال ارسالی از طریق گیرنده Pre- B cell به بقای سلول کمک می‌کند و موجب تحریک بازآرایی ژن‌های سبک کاپا می‌گردد در صورت عدم تولید کارآمد زنجیره سبک کاپا بازآرایی در زنجیره لامبدا روی خواهد داد. در بازآرایی ژن‌های زنجیره سبک کاپا و لامبدا ژن‌های V به J متصل می‌گردند و نهایتاً زنجیره سبک تشکیل و در کنار زنجیره سنگین μ بر سطح سلول قرار می‌گیرد. در این مرحله سلول‌ها را immature B می‌نامند. اگر در این مرحله IgM سطح سلول B آنتی ژنهای خودی را به صورت high affinity شناسایی کند بار دیگر آنزیم RAG در سلول فعال میشود و شانس بازآرایی در زنجیره سبک به سلول داده می‌شود که به این پدیده **receptor Editing** روی می‌دهد.

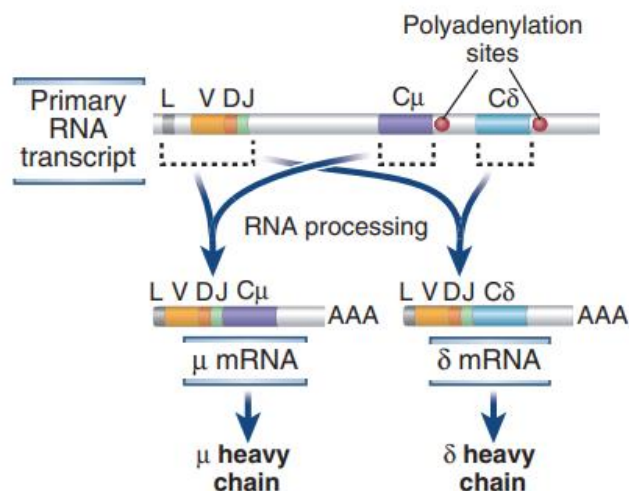


پس از بازآرایی V(D)J ممکن است در بالا دست قطعه V انتخابی، قطعات V دیگری نیز هنوز وجود داشته باشند اما بدلیل تاثیر enhancer واقع در بخش اینترونی در میان پایین دست نواحی ثابت، پروموتور بخش V بازآرایی شده که کمترین فاصله را با enhancer دارد فعال میشود و نسخه بردار از این ناحیه شروه میشود. در مورد قطعات J باقیمانده در پایین دست ناحیه بازآرایی شده، لازم به ذکر است این قطعات در زمان ویرایش mRNA حذف میشوند.



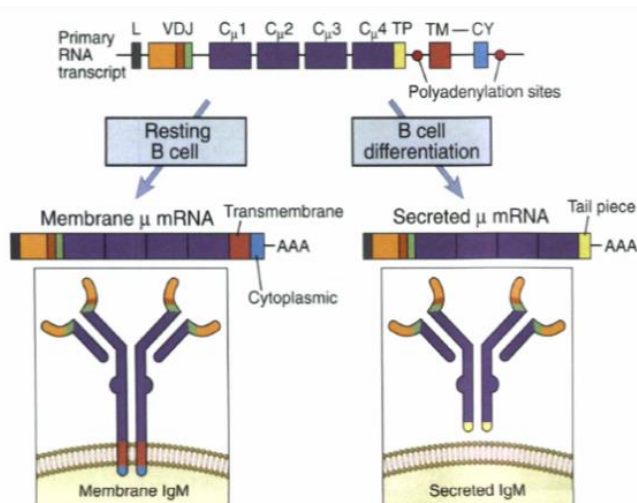
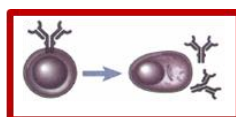


سلول B بالغ قادر است با ویرایش آلترناتیو mRNA همزمان IgM و IgD را بر سطح خود بیان کند.

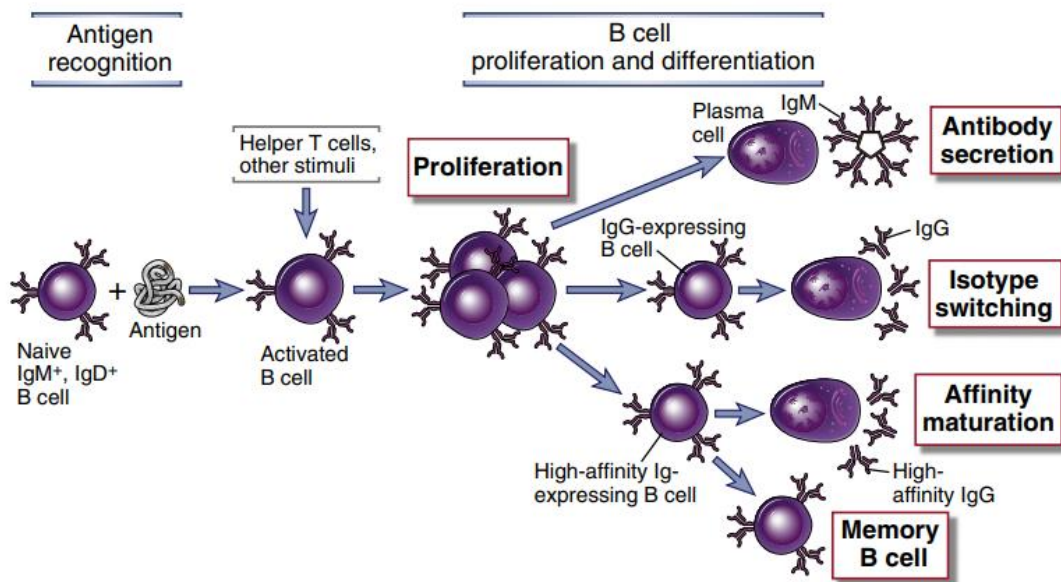


سپس لنفوسیت‌های B بالغ وارد گردش خون میشوند و به فولیکول‌های بافت‌های لنفاوی ثانویه مانند غدد لنفاوی مهاجرت می‌نمایند. پس از برخورد با آنتی ژن، فعال میشوند و شروع به تکثیر می‌نمایند و تعدادی از آنها به پلاسماسل تبدیل می‌شوند و آنتی بادی ترشحی تولید می‌کنند.

تفاوت آنتی بادی‌ها در نوع متصل به غشا و ترشحی، مربوط به توالی اسید آمینه‌ای انتهای کربوکسیلی ناحیه ثابت زنجیره سنگین می‌باشد. در انواع ترشحی بخش انتهای کربوکسیلی آب دوست می‌باشد در حالیکه شکل غشایی آنتی بادی دارای یک توالی داخل غشایی آب گریز و یک توالی داخل سیتوپلاسمی است.



تعدادی از سلولهای B نیز با کمک سلولهای T، مراکز زایا را ایجاد می‌نمایند. بدنبال میانکشی بین سلول B و سلول T، آنزیم (Activation- induced deaminase, AID) فعال می‌شود و با ایجاد موتاسیون‌های شدید در نواحی بازآرایی شده VDJ بخصوص در CDRs بلوغ میل پیوندی (**affinity maturation**) رخ میدهد. فعالیت همین آنزیم به همراه سیتوکینهای مترشحه از سلول T موجب تعویض کلاس آنتی بادی (**class switching**) نیز می‌گردد.



نوع سیتوکین مترشحه از سلول T در زمان میانکشی با سلول B، در تغییر کلاس آنتی بادی بسیار موثر است.

