

MARIA JANUSZ

Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda
Zakład Immunochemii
Wrocław

STRUKTURALNE I FUNKCJONALNE ZRÓŻNICOWANIE IMMUNOGLOBULIN

Bardzo istotnym elementem systemu immunologicznego żywych organizmów jest zdolność rozpoznania co jest „własne”, a co „obce”. Rozpoznanie obcej substancji — antygenu jest bodźcem do uruchomienia mechanizmów obronnych, tj. odpowiedzi humoralnej i komórkowej.

Cząsteczkami efektorowymi odpowiedzi humoralnej są immunoglobuliny. Do grupy tej należą białka mające aktywność przeciwciałową oraz białka podobne do przeciwciał pod względem struktury chemicznej i swoistości antygenowej.

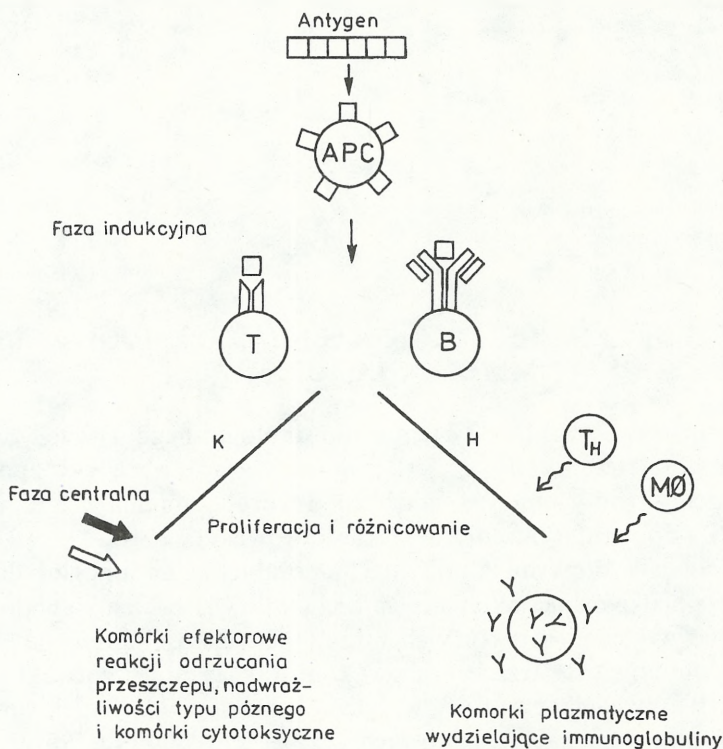
Immunoglobuliny wytwarzane są przez komórki plazmatyczne (aktywowane limfocyty B). Wydzielane są do krwi, gdzie stanowią 11% białek surowicy, obecne są również w płynach ustrojowych i tkankach. Wykryte zostały przez Emila von Behringa i Shibasaburo Kitsabato w 1890 roku. Od tego czasu stały się przedmiotem intensywnych badań, które doprowadziły do tego, że obecnie zaliczane są do grupy najlepiej scharakteryzowanych białek. Rozwój i znaczenie badań nad immunoglobulinami wymierzyć można przyznanymi nagrodami Nobla:

- 1901 r.: E. von Behring — wykrycie immunoglobulin,
- 1972 r.: G. M. Edelman i R. R. Porter — poznanie molekularnych i biochemicznych właściwości,
- 1984 r.: G. Kohler i C. Milstein — podstawy izolacji i produkcji przeciwciał monoklonalnych,
- 1987 r.: S. Tonegawa — molekularne podstawy zróżnicowania przeciwciał.

Poznanie struktury i właściwości immunoglobulin, genetycznych podstaw ich biosyntezy i zróżnicowania ma fundamentalne znaczenie dla wyjaśnienia molekularnych podstaw procesów odpornościowych, a opracowanie technologii produkcji przeciwciał monoklonalnych otwiera nowe możliwości w diagnostyce i terapii.

STRUKTURA IMMUNOGLOBULIN

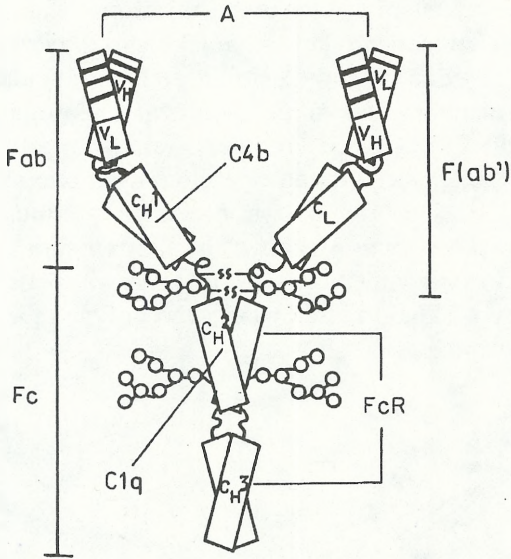
Prototypowa cząsteczka immunoglobuliny zbudowana jest z dwu identycznych łańcuchów ciężkich (H) i dwu identycznych łańcuchów lekkich (L),



Rys. 1. Schemat odpowiedzi immunologicznej. Antygen w formie natywnej $\square\square\square\square\square$ lub po przetworzeniu \square przez komórkę prezentującą antygen (APC) rozpoznawany jest przez swoiste receptory limfocytów T i B (faza indukcyjna). W centralnej fazie odpowiedzi humoralnej (H) na skutek współdziałania pomocniczych limfocytów (T_H) i makrofagów ($MØ$) poprzez bezpośredni kontakt komórka-komórka lub wydzielane przez nie mediatory \rightsquigarrow limfocyty B podlegają proliferacji i różnicowaniu do komórek funkcjonalnych wydzielających przeciwciała. W procesie odpowiedzi komórkowej (K) pod wpływem antygenowo swoistych \Rightarrow i antygenowo nieswoistych \rightarrow czynników, limfocyty T proliferują i różnicują się do komórek efektorowych

połączonych za pomocą mostków dwusiarczkowych w makromolekularny kompleks. Liczba mostków może być różna w zależności od klasy i podklasy oraz źródła pochodzenia. Immunoglobulina obserwowana w mikroskopie elektronowym ma kształt litery Y, kąt rozwarcia jej ramion może być różny dla różnych cząsteczek. Na końcach każdego z dwu ramion zlokalizowane jest miejsce wiążące. Cząsteczki immunoglobulin mogą występować w postaci monomerów lub mogą tworzyć trójkątne trimery, kwadratowe tetramery bądź pentagonalne pentamery.

Pod wpływem enzymów proteolitycznych, rozszczepiających cząsteczkę immunoglobuliny w specyficznych miejscach, dzielona jest ona na dwa podstawowe obszary funkcjonalne: Fab (antigen binding) i Fc (easily crastallized). Fragment Fab składa się z fragmentu łańcucha ciężkiego i łańcucha lekkiego,



Rys. 2. Schemat budowy monomeru cząsteczki immunoglobuliny. Prostokąty prezentują domeny tworzące łańcuch lekki (V_L i C_L) oraz łańcuch ciężki (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). — regiony hiperzmiennne w obrębie regionu zmiennego V_L i V_H . $\circ\circ\circ\circ$ — komponenta węglowodanowa, |—| fragmenty

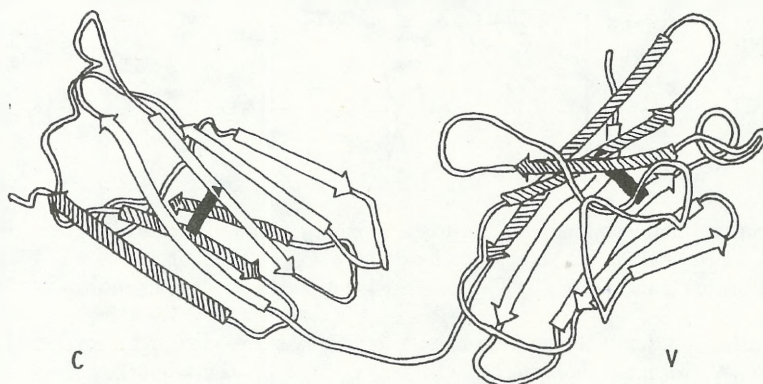
proteolityczne. Z poszczególnymi domenami związane są określone funkcje cząsteczki immunoglobuliny. V_H - V_L wiązanie antygeny (A), C_{H2} - C_{H3} oddziaływanie z komórkowym receptorem dla fragmentu Fc (FcR), C_{H1} , C_{H2} wiązanie składowych dopełniacza ($C4b$, $C1q$)

fragment Fc, odpowiedzialny za funkcje efektorowe, stanowi pozostałą część łańcucha ciężkiego. Fragment proteolityczny $F(ab')_2$ otrzymany po działaniu pepsyny składa się z dwu fragmentów Fab i części łańcucha H, zawierającej jeden lub więcej międzyłańcuchowych mostków dwusiarczkowych. $F(ab')_2$, w przeciwieństwie do Fab, jest dwuwartościowy, ma taką zdolność wiązania antygeny jak cała cząsteczka przeciwciała.

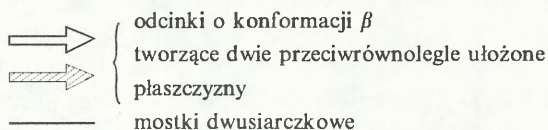
Populacja immunoglobulin, nawet pojedynczego osobnika, odznacza się ogromną heterogennością. Dla określenia sekwencji aminokwasowej posłużono się modelowymi białkami szpiczaka (myeloma proteins). Okazało się, że C — końcowa część zarówno łańcucha ciężkiego, jak i lekkiego odznacza się stosunkowo zachowawczą sekwencją, natomiast w N-końcowej części występuje duża zmienność. Na tej podstawie wydzielono region stały (C — constants) i region zmienny (V — variable). Występują one zarówno w łańcuchu ciężkim (C_H , V_H), jak i lekkim (C_L , V_L). W obrębie regionów zmiennych występują miejsca odznaczające się szczególną heterogennością sekwencji aminokwasowej — regiony hiperzmiennne.

Łańcuchy ciężkie i lekkie immunoglobulin zbudowane są z liniowo połączonych podstawowych struktur — domen (obszarów globularnych).

Z poszczególnymi domenami związane są określone właściwości biologiczne. W obrębie regionu zmiennego łańcucha lekkiego i ciężkiego wyróżnia się jedną domenę V_L i jedną V_H , w regionie stałym łańcucha lekkiego jedną domenę C_L , w łańcuchu ciężkim 3–4 obszary globularne C_H . Z badań krystalograficznych i dyfrakcji rentgenowskiej wiadomo, że domeny V i C utworzone są z 7 przeciwrównolegle ułożonych odcinków o konformacji β tworzących dwie płaszczyzny utrzymywane za pomocą oddziaływań hydrofobowych i mostków dwusiarczkowych. W domenie regionu zmiennego łańcuch polipeptydowy zwinięty jest w dodatkową pętlę – region hiperzmienny wchodzący w skład miejsca wiążącego antygen [3, 14].

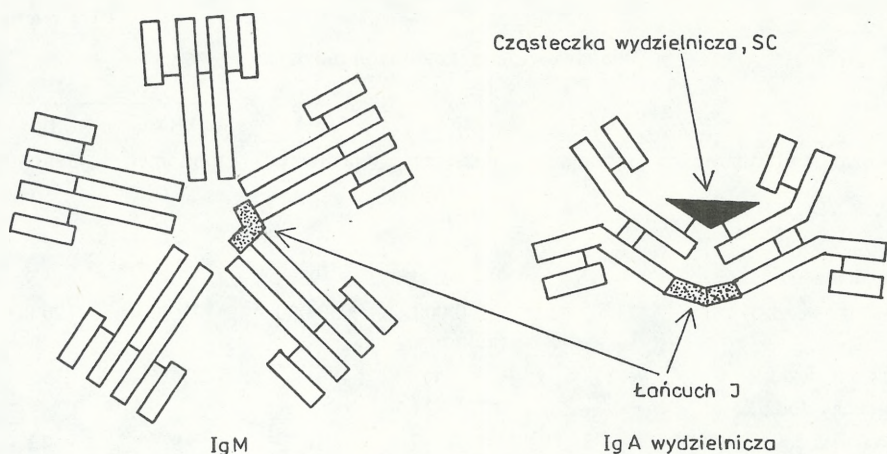


Rys. 3. Schemat budowy stałej i zmiennej domeny immunoglobulinowej



Pomiędzy domenami $C_{H1} - C_L$ a C_{H2} występuje region zawiasowy (hinge region). Pełni on między innymi rolę elastycznego łącznika pomiędzy fragmentem Fab a pozostałą częścią cząsteczki. Jego obecność zwiększa stopień swobody orientacji przestrzennej fragmentu Fab.

Cząsteczki immunoglobulin są glikoproteinami. Ilość reszt aminokwasowych będących akceptorami komponenty węglowodanowej (Asn-X-Ser) jest różna w różnych immunoglobulinach, zlokalizowane są głównie w obrębie regionu zawiasowego i domeny C_{H2} . Funkcjonalna rola komponenty węglowodanowej immunoglobulin nie jest dokładnie poznana. Uważa się jednak, że cukry odgrywają rolę w utrzymaniu struktury cząsteczki, syntezie i sekrecji, warunkują oporność na proteolizę, zwiększają rozpuszczalność w środowisku wodnym i modulują usuwanie z surowicy.



Rys. 4. Schemat budowy polimerycznych immunoglobulin

Oprócz form monomerycznych immunoglobuliny występują też w postaci dimerów (czasami trimerów lub polimerów), np. IgA lub pentamerów, np. IgM. Cząsteczką odpowiedzialną za polimeryzację jest łańcuch J. Sekwencja łańcucha J jest w nieznacznym stopniu spokrewniona z sekwencją domeny immunoglobulinowej, ma jednak zbliżoną strukturę drugorzędową. Nie jest dokładnie poznany mechanizm udziału łańcucha J w polimeryzacji IgA czy IgM, wiadomo jednak, że w procesie tym bierze udział jedna jego cząsteczka. W wydzielniczych IgA występuje dodatkowa glikoproteina – cząsteczka wydzielnicza (SC, secretory component). Początkowo rola SC wiązana była z ochronnym działaniem przed enzymatycznym trawieniem IgA w czasie przechodzenia z miejsca syntezy – warstwy podśluzówkowej gruczołu. Obecnie cząsteczka SC określana jest jako transmembranowa domena receptora poliimmunoglobulinowego [9].

RÓŻNORODNOŚĆ IMMUNOGLOBULIN (IZOTYPY, ALLOTYPY, IDIOTYPY)

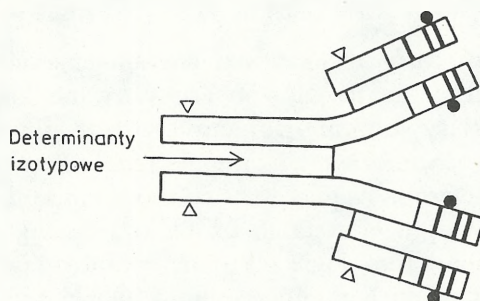
Na podstawie struktury regionu stałego łańcucha ciężkiego immunoglobuliny zostały podzielone na główne grupy zwane klasami, które dalej dzielone są na podklasy. Immunoglobuliny poszczególnych klas różnią się właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. Przynależność do danej klasy czy podklasy determinowana jest więc rodzajem łańcucha H, jego stały region, powtarzający się u wszystkich osobników danego gatunku, określa izotyp immunoglobulin. Homologia sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi klasami ludzkich immunoglobulin wynosi około 30%. Obserwuje się również znaczne różnicowanie w zawartości reszt cukrowych. W obrębie danego gatunku immunoglobuliny poszczególnych klas mogą mieć tę samą

Właściwości immunoglobulin ludzkich

Forma molekularna	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
	monomer	monomer dimer polimer	pentamer	monomer	monomer
Współczynnik sedimentacji	7S	7S, 9S, 11S	19S	7S	8S
Masa cząsteczkowa	150 000	160 000 (monomer)	950 000	175 000	190 000
Łańcuch ciężki	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_2, α_2	μ	δ	ϵ
Łańcuchy dodatkowe	—	J, SC	J	—	—
Zawartość cukrów (%)	3	7	10	9	13
Poziom w surowicy (mg/100 ml)	1250 ± 300	210 ± 50	125 ± 50	4	0.03
Wartościowość	2	2, 4	5, 10	2	2
Aktywacja dopełniacza:					
klasyczna	+	—	+	—	—
alternatywna	—	+	—	+	—
Wiązanie do komórek	makrofagi neutrofile trofoblasty łożyska	—	—	?	komórki tuczne

zdolność wiązania antygeny, różnią się jednak funkcjami efektorowymi. Łańcuchy ciężkie wszystkich izotypów immunoglobulin łączą się z tymi samymi łańcuchami lekkimi występującymi w formie κ lub λ . W formie natywnej cząsteczki immunoglobuliny zachowana jest zawsze jednorodność formy łańcucha lekkiego (κ_2 lub λ_2).

Zróżnicowanie allotypowe immunoglobulin odzwierciedla swoistość antygenową immunoglobulin pewnych, ale nie wszystkich osobników danego gatunku. Dotyczy zarówno łańcuchów lekkich, jak i ciężkich, uwarunkowane



Rys. 5. Lokalizacja determinant izotypowych, allotypowych i idiotypowych na cząsteczce immunoglobuliny. ▽ determinanty allotypowe, ● determinanty idiotypowe, — regiony hiperzmiennie

jest występowaniem allelicznych form kodujących je genów. Typowymi alotypami występującymi w łańcuchu ciężkim ludzi są: A_{2m} (IgA_2), G_{1m} (IgG_1), G_{2m} (IgG_2) i G_{3m} (IgG_3). Lokalizowane są głównie w obrębie fragmentu Fc. W obrębie łańcuchów lekkich wyróżnia się allotypy Km — łańcuchy κ i Lm — łańcuchy λ . W przeciwieństwie do allotypów łańcuchów ciężkich, związanych ściśle z izotypem immunoglobulin, występują one we wszystkich klasach immunoglobulin. Determinanty allotypowe są przeważnie odzwierciedleniem zmian w pierwszorzędowej strukturze łańcucha polipeptydowego dotyczących nawet jednej lub dwu reszt aminokwasowych, jak w przypadku G_{1m} i G_{1m} . W tych ostatnich przypadkach dla ekspresji wymagana jest obecność łańcucha L (Gm) i H (Km).

Swoistość idiotypowa immunoglobulin związana jest z różnicami w sekwencji aminokwasowej około 100 reszt w obszarze zmiennym łańcuchów ciężkich i lekkich, głównie w obrębie regionu hiperzmiennego tworzącego miejsce wiążące antygen. Zmienność ta daje możliwość rozróżnienia ogromnej liczby cząsteczek różniących się sekwencją regionu V i jest podstawą różnorodności przeciwciał. Ekspresja większości determinant idiotypowych wymaga obecności obu łańcuchów — H i L. Idiotyp jest więc niepowtarzalną cechą danej cząsteczki przeciwciała pojedynczego osobnika. Jest produktem pojedynczego genu lub grupy genów ściśle spokrewnionych. Może być uważany za marker specyficznego klonu komórek produkujących przeciwciała [13, 14, 15].

BIOSYNTeza I ZRÓŻNICOWANIE IMMUNOGLOBULIN

Lokalizacja syntezy przeciwciał zależy od drogi wprowadzenia antygeny i jego właściwości. Miejscem biosyntezy większości przeciwciał są szpik kostny, śledziona, węzły limfatyczne, wyrostek robaczkowy, płuca. Do organów najbardziej aktywnych należą śledziona i węzły limfatyczne. W tych narządach na ogół wzrasta synteza γ -globulin nie będących przeciwciałami.

Komórkami produkującymi przeciwciała są limfocyty B. Pierwotnym organem ich neogenezy jest szpik kostny. Małe limfocyty stanowią 20–30% jądrzastych komórek szpiku. Są niedzielącymi się komórkami spoczynkowymi (G_0). Około 3 dni po powstaniu przenoszone są z krwiobiegu do śledziony i węzłów chłonnych. Cechą charakterystyczną odpowiedzi immunologicznej jest przekształcanie się komórek prekursorowych w komórki produkujące przeciwciała, rozprzestrzenianie się ich w organizmie i nabieranie przez nie pewnej specjalizacji w kierunku produkcji przeciwciał o określonej swoistości. Prekursorowe komórki B powstające w szpiku podlegają procesom dojrzewania, pojawiają się na ich powierzchni specyficzne markery, takie jak: IgM, FcR, MHC klasy II, receptory dla mitogenów. Najwcześniej pojawiającym się markerem jest IgM. Kontakt z antygenem aktywuje grupę komórek o określonej specyficzności do przejścia w cykl komórkowy i do podziałów. Prowadzi to do powstania efektorowych komórek wydzielających immunoglobuliny

i populacji komórek spoczynkowych, krążących w organach limfoidalnych, przygotowanych na ponowny kontakt z tym samym antygenem. Proces końcowego różnicowania się komórek kontrolowany jest przez wiele czynników uwalnianych przez komórki T lub monocyty, jak np. interleukiny. Specjalizacja komórek do produkcji przeciwciał o określonej swoistości nabywana jest podczas różnicowania komórek B z niepobudzonych prekursorów poprzez rearanzację segmentów genów V_H i V_L powierzchniowych IgM. Źródłem dodatkowego zróżnicowania są zmiany w obrębie genów łańcucha H. Rearanzacja w obrębie genów i somatyczne mutacje prowadzą do powstania około 10^{10} różnych specyficzności w obrębie jednego osobnika. Stwarza to praktycznie możliwość powstania przeciwciał przeciwko wszystkim istniejącym lub sztucznie utworzonym antygenom [6]. Specyficzność wiązania antygeny, będąca wynikiem identyczności regionów zmiennych łańcuchów lekkich i ciężkich IgM, jest sygnałem pobudzającym powstanie klonu komórek produkujących przeciwciała o określonej swoistości. Obowiązuje więc zasada zaprogramowania limfocytów jednego klonu do produkowania przeciwciał o jednej specyficzności. Wydzielane przeciwciała są kopią immunoglobuliny na powierzchni limfocyty.

Cytoplazma komórek produkujących przeciwciała obfituje w RNA i rybosomy, co świadczy o przystosowaniu ich do syntezy dużej ilości białka „na eksport”. Synteza łańcuchów ciężkich i lekkich cząsteczki immunoglobuliny zachodzi na oddzielnych polirybosomach. Łańcuch lekki ma zdolność autonomicznego uwalniania się z polirybosomów. Uwalnianie łańcucha ciężkiego zależy od obecności łańcucha lekkiego. Po zakończeniu syntezy łańcuchy przechodzą do siateczki endoplazmatycznej, gdzie odłączany jest peptyd sygnałowy i na drodze reakcji enzymatycznej dołączana komponenta węglowodanowa. Po przejściu przez aparat Golgiego, gdzie mogą zachodzić modyfikacje reszt cukrowych, wydzielane są na zewnątrz [3]. W siateczce endoplazmatycznej stwierdzono obecność BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) i jego kompleksów z niekompletnymi łańcuchami ciężkimi. Białko to reguluje posttranslacyjne losy łańcuchów ciężkich. Przyłączenie BiP do łańcucha H zapobiega jego wydzielaniu. BiP i łańcuch lekki współzawodniczą więc o wiązanie łańcucha ciężkiego [4].

Różnice w strukturze pierwszorzędowej znajdują swoje odzwierciedlenie w strukturze czwartorzędowej — podjednostkowej budowie cząsteczki immunoglobuliny. Sprowadza się to do różnicy w liczbie i rozmieszczeniu reszt cysteiny biorących udział w tworzeniu międzyłańcuchowych, a też wewnątrzdomenowych mostków dwusiarczkowych. Zachowany jest konserwatyzm liczby i lokalizacji mostków w obrębie klasy i podklasy oraz gatunku, nieco większą zmienność obserwuje się pomiędzy mostkami łączącymi łańcuchy ciężkie [3].

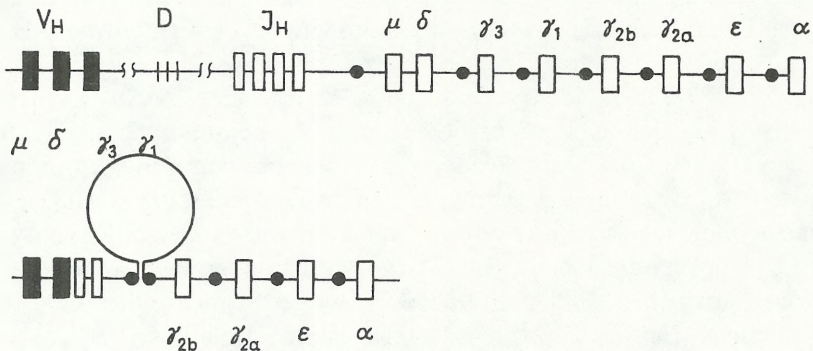
Jak już wcześniej wspomniano, system immunologiczny odznacza się zdolnością wytwarzania przeciwciał o bardzo zróżnicowanej specyficzności, skierowanych przeciwko prawie nieskończonej liczbie antygenów. Różnorodność ta jest wynikiem zmiennej sekwencji aminokwasowej regionów V. Dla

wytlumaczenia tak ogromnego zróżnicowania przyjmuje się dwa alternatywne modele: mutacji somatycznych i linii zarodkowych. W myśl teorii mutacji somatycznych poszczególne komórki mają ograniczony zasób informacji do produkcji przeciwciał, zróżnicowanie w obrębie regionu V jest wynikiem mutacji zachodzących podczas ontogenezy. Zgodnie z założeniami teorii linii zarodkowych przyjmuje się, że każdy limfocyt ma informację genetyczną do produkcji przeciwciał, zróżnicowanie regionów V w genomie zarodkowym jest wynikiem duplikacji i mutacji genowych podczas filogenezy. Fakt, że zmienność dotyczy regionu V, a nie C można wytłumaczyć tym, że regiony stałe i zmienne kodowane są przez niezależne geny.

W czasie rozwoju komórek produkujących przeciwciała jedna z wielu sekwencji regionu V łączy się z sekwencją regionu C, co prowadzi do powstania kompletnego genu kodującego immunoglobulinę. Poznanie struktury tego genu pozwoliło na wyjaśnienie molekularnych podstaw zróżnicowania immunoglobulin. Każdy region zmienny kodowany jest przez dwa lub trzy segmenty genowe, w przypadku łańcuchów κ i λ — V i J, w przypadku łańcuchów ciężkich — V, D i J. W poszczególnych segmentach znajdują się regiony = egzony (exons) kodujące określone odcinki łańcucha polipeptydowego, w tym regiony hiperzmiennie. Liczba segmentów genowych jest różna dla różnych łańcuchów (κ , λ i H) immunoglobulin różnych gatunków. Na przykład u myszy występuje kilkaset V_{κ} , cztery funkcjonalne J_{κ} , u ludzi około $80V_{\kappa}$ i $5J_{\kappa}$. W przypadku łańcucha ciężkiego myszy całkowitą liczbę segmentów V_H określa się na kilkaset do tysiąca. Dzielone są na podstawie homologii sekwencji nukleotydowej (> 80% identyczności) na 9 rodzin. U ludzi wyróżnia się 100–200 V_H podzielonych na 6 rodzin, sześć funkcjonalnych segmentów J_H i dziesięć D_H . Region stały każdego z łańcuchów immunoglobulinowych kodowany jest przez segment genowy C zawierający jeden lub więcej egzonów. Region stały łańcuchów lekkich κ lub λ kodowany jest przez pojedynczy egzon C_{κ} lub C_{λ} . Dla regionu łańcucha ciężkiego wyróżnia się 3–7 egzonów: jeden dla każdej domeny i 1–4 dla regionu zawiasowego. Segmenty genu C kodujące różne łańcuchy ciężkie ułożone są w określonej kolejności, np. u myszy: C_{μ} – C_{δ} – C_{γ_3} – C_{γ_1} – $C_{\gamma_{2b}}$ – $C_{\gamma_{2a}}$ – C_{ϵ} – C_{α} . W klonie komórek produkujących przeciwciała dany region zmienny łańcucha ciężkiego (kodowany przez egzon V–D–J) może być połączony z jednym z segmentów C_H . Ogromna różnorodność specyficzności przeciwciał jest rezultatem wykorzystania różnych segmentów genowych kodujących regiony zmienne, zróżnicowanie izotypowe — wynikiem wykorzystania różnych segmentów kodujących regiony stałe. Zastanawiając się nad mechanizmem zróżnicowania można wyróżnić następujące zjawiska: różnorodność segmentów genowych V, D i J w liniach zarodkowych, różne ich połączenia, mutacje somatyczne, czyli zamiana zasad w segmencie genowym pociągająca za sobą zmianę w sekwencji aminokwasowej przeciwciała, dołączenie dodatkowych nukleotydów, kombinację połączeń regionów zmiennych łańcucha ciężkiego i lekkiego tworzących miejsce wiążące antygen.

Podstawą molekularną zróżnicowania immunoglobulin jest rearanżacja kodujących je genów. Wyróżnić można dwa typy: rearanżację zachodzącą w prekursorowych lub nie pobudzonych komórkach B obejmującą segmenty genów kodujące zmienne regiony łańcuchów ciężkich i lekkich oraz rearanżację zachodzącą w aktywowanych komórkach B, obejmującą tylko geny łańcucha ciężkiego. W procesie dojrzewania, w pierwszej kolejności zachodzi rearanżacja segmentów regionu zmiennego łańcucha H. Jest to proces dwuetapowy, najpierw ma miejsce połączenie J_H-D , następnie dołączany jest segment V_H . W procesie rearanżacji segmentów genowych łańcuchów L, w pierwszej kolejności dochodzi do połączenia V_L-J_L , następnie V_L-C_L . Podczas łączenia segmentów genowych regionu zmiennego może następować dalsze różnicowanie w wyniku przecięcia rekombinujących segmentów w różnych miejscach bądź dołączenia dodatkowych nukleotydów.

Drugi typ rearanżacji odpowiedzialny jest za zjawisko „class switching” – wybór segmentu genowego regionu stałego. Proces ten zachodzi po stymulacji komórek B. Kompleks segmentów genowych $V_H-D_H-J_H$ przemieszczany jest do jednego z regionów C_H . Wybór regionu C_H odpowiedniego dla danego izotypu immunoglobulin – „isotypic exclusion” – może zachodzić na skutek delekcji segmentu genowego, np. C_{μ} , C_{δ} , C_{γ_1} , C_{γ_3} w przypadku syntezy γ_{2b} u myszy.

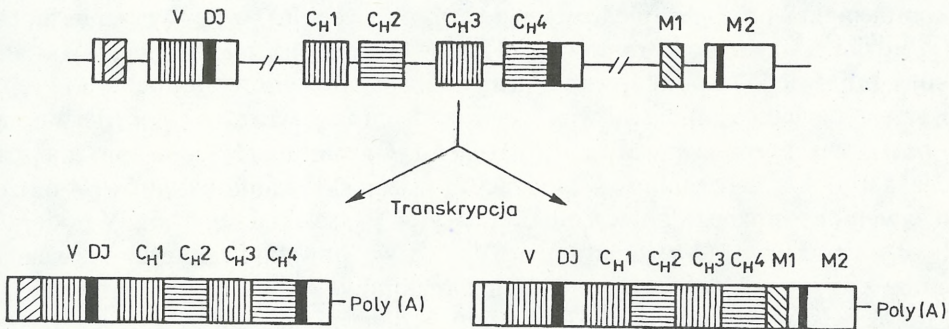


Rys. 6. Schemat rearanżacji w obrębie locus łańcucha ciężkiego. Wybór regionu C_H w przypadku syntezy γ_{2b} u myszy zachodzi na skutek delekcji segmentu genowego C_{μ} , C_{δ} , C_{γ_1} , C_{γ_3} , kompleks VDJ przemieszczony jest do regionu $C_{\gamma_{2b}}$

Na pojedynczej komórce wyrażany jest tylko jeden z dwu homologicznych chromosomalnych loci – „allelic exclusion”.

Końcowy etap różnicowania immunoglobulin to wybór jednej z dwu alternatywnych form ich występowania – sekrecyjnej lub membranowej. Immunoglobuliny membranowe (głównie monomeryczne IgM i IgD) różnią się od formy wydzielniczej C końcowym fragmentem łańcucha ciężkiego, który odpowiedzialny jest za zakotwiczenie w membranie komórkowej. Składa się on

z 41–72 reszt aminokwasowych, dzielony jest na trzy regiony: łączący się z końcową domeną C_H , hydrofobowy segment transmembranowy łączący się z lipidami membranowymi i C-końcowy fragment cytoplazmatyczny odpowiedzialny za przenoszenie sygnału do struktur wewnątrzkomórkowych. W procesie syntezy łańcucha ciężkiego immunoglobulin wydzielniczych i membranowych biorą udział różne formy mRNA pochodzące z tego samego genomu. C-końcowy segment formy membranowej ma jeden lub dwa dodatkowe egzony. Wybór formy wydzielniczej czy membranowej, determinowany jest w momencie transkrypcji. Ma miejsce konkurencja pomiędzy poliadenilacją a przyłączeniem egzonusów kodujących formę membranową [5, 10, 12, 16, 19].



Rys. 7. Schemat syntezy wydzielniczej i membranowej formy IgM. M1 M2 – egzony specyficzne dla formy membranowej. Wybór formy, wydzielniczej czy membranowej, determinowany jest w momencie transkrypcji, zachodzi konkurencja pomiędzy poliadenilacją (polyA) a przyłączeniem egzonusów M1 M2

Poznanie struktury immunoglobulin i genetycznych podstaw ich biosyntezy i różnicowania upoważniło do uznania domeny immunoglobulinowej za podstawową jednostkę strukturalną całej grupy białek warunkujących sprawność funkcjonowania układu immunologicznego (immunoglobulin superfamily). Na skutek duplikacji segmentu genu pierwotnego i kombinacji połączeń powstały struktury powierzchniowe komórek odpowiedzialne za rozpoznanie antygeny (receptory limfocytów T i B), elementy restrykcyjne (MHC klasy I i klasy II), markery powierzchniowe limfocytów (CD4 i CD8), cząsteczki adhezyjne (CD2, LFA-3), receptory dla immunoglobulin (poly IgR, FcγR [13].

BIOLOGICZNE FUNKCJE IMMUNOGLOBULIN

Podstawową funkcją systemu immunologicznego jest rozpoznanie i unieczynnienie „obcego agenta”. Cząsteczkami efektorowymi obu etapów tego procesu są immunoglobuliny. Dwoistość funkcji przez nie pełnionych związana jest z przedstawionym powyżej zróżnicowaniem strukturalnym cząsteczki. Regiony zmienne odpowiedzialne są za rozpoznanie i wiązanie antygeny,

regiony stałe oddziaływując z innymi cząsteczkami i/lub komórkami pełnią funkcje efektorowe, takie jak: aktywacja komplementu, interakcje z komórkowymi receptorami dla fragmentu Fc (FcR), kontrola katabolizmu. Poszczególne funkcje związane są z określonymi domenami.

WIĄZANIE ANTYGENU

Jak przedstawiono przy omawianiu domenowej budowy immunoglobulin, miejsce wiążące utworzone jest na skutek przestrzennego uformowania pętli peptydowych zawierających regiony hiperzmiennie łańcuchów ciężkich i lekkich. Struktura określana jest przez reszty tworzące region determinujący komplementarność (complementary determining region), w jej tworzeniu biorą też udział reszty regionu ramowego (framework region), reszty glicyny warunkują odpowiednie pofałdowanie fragmentów łańcuchów polipeptydowych. Kształt i wielkość miejsca wiążącego zmienia się wraz ze specyficznością i powinowactwem w stosunku do antygeny. Ogromne zróżnicowanie miejsca wiążącego – heterogenność wchodzących w jego skład aminokwasów – może być wynikiem różnego połączenia domen V_H i V_L , selekcji regionów V podczas tworzenia aktywnego segmentu genu V_H lub V_L , powstania nowych sekwencji aminokwasowych na skutek połączenia regionów V i mutacji somatycznych. Miejsce wiążące, w zależności od wiązanych determinant antygenowych, może mieć kształt kieszonki hydrofobowej (w przypadku małych antygenów w niej zagłębia się cząsteczka haptenu) lub nieregularnej, płaskiej płaszczyzny w przypadku antygenów białkowych. W momencie przyłączania antygeny następuje „dopasowanie” płaszczyzny miejsca wiążącego z powierzchnią antygeny (model „lock-and-key” lub „face-to-face”) [3, 13].

FUNKCJE EFEKTOROWE

Immunoglobuliny poszczególnych klas mogą wykazywać jednakową zdolność oddziaływania z przeciwciałem, różnią się funkcjami efektorowymi.

Głównymi przeciwciałami syntezowanymi podczas wtórnej odpowiedzi immunologicznej są IgG. Posiadają one zdolność oddziaływania ze swoistym receptorem na powierzchni komórek. Oddziaływanie z Fc γ R na makrofagach, komórkach tucznych i limfocytach odpowiedzialne jest za takie procesy jak: fagocytoza, cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC), uwalnianie mediatorów, specyficzna regulacja funkcji limfocytów. Na skutek przyłączania do swoistego receptora na trofoblastach, jako jedyna klasa immunoglobulin, transportowane są przez łożysko, co stanowi drogę przekazywania odporności z matki do płodu. Oddziałują również z receptorami na śluzówce jelita. IgG mają zdolność neutralizacji toksyn bakteryjnych, wiązania się do mikroorganizmów (wzmaganie ich fagocytozy) i aktywacji układu komplementu (droga klasyczna). Najszybciej, w porównaniu z innymi klasami immunoglobulin,

dyfundują do przestrzeni pozanaczyniowej, gdzie są najliczniej reprezentowane. Katabolizm regulowany jest całkowitym poziomem IgG w płynach ustrojowych. Nasilenie syntezy zależy od stymulacji antygenem.

Główną klasą immunoglobulin płynów wydzielniczych, takich jak: łzy, ślina, mleko, sok jelitowy są IgA. Oddziałują z receptorem poliimmunoglobulinowym na komórkach nabłonkowych organów wydzielniczych. Hamując proces adhezji mikroorganizmów do powierzchni śluzówki, pełnią rolę w obronie organizmu przed infekcjami bakteryjnymi. IgA obecne w dużej ilości w sianie i mleku związane są z przekazywaniem biernej odporności z matki do noworodka. Agregaty IgA biorą udział w alternatywnym szlaku aktywacji komplementu.

IgE wykrywane są w krążeniu w nieznacznych ilościach. Głównie występują na powierzchni komórek tucznych i bazofili mających na swojej powierzchni swoisty receptor ($Fc_\epsilon R$) o wysokim powinowactwie. Zasadnicza rola przypisywana IgE to funkcja łącznika pomiędzy komórkami oraz mediatora alergii i odporności przeciwpalnej przez pobudzanie wydzielania mediatorów stanów zapalnych i chemoatraktantów.

IgM jest to główna klasa immunoglobulin pojawiających się podczas pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała klasy IgM często obserwowane są w chorobach o podłożu autoimmunologicznym (np. czynnik reumatoidalny). IgM występują w dwu formach: monomeryczne, związane z membraną komórek i pentameryczne, w płynach ustrojowych. Pentameryczne, wydzielnicze IgM mają zdolność wiązania wielowartościowych antygenów bakteryjnych i wirusowych, biorą udział w pierwszym etapie obrony przeciwko infekcjom mikroorganizmów. Kompleksy IgM aktywują układ dopełniacza (droga klasyczna).

IgD występują w bardzo małej ilości w surowicy, obecne są na powierzchni dojrzałych limfocytów B. Stosunek ekspresji $\mu:\delta$ uważany jest za marker dojrzałości komórek B. Występujące równocześnie na powierzchni dojrzałych komórek B IgM i IgD mają taki sam region zmienny – taką samą zdolność wiązania antygeny. Powierzchniowe IgD mogą być uważane za receptor współdziałający w kontroli aktywacji i supresji limfocytów B [3, 13].

IMMUNOGLOBULINY JAKO ANTYGENY

Glikoproteinowe cząsteczki immunoglobulin podane innemu osobnikowi tego samego lub innego gatunku rozpoznawane są jako „obce” i stają się sygnałem do zapoczątkowania procesu odpowiedzi immunologicznej. Często utrudnia to stosowanie przeciwciał w terapii. Jak wynika ze struktury immunoglobulin, mają one wiele determinant antygenowych (epitopów) będących odzwierciedleniem sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (determinanty sekwencyjne) i konformacji cząsteczki (determinanty konformacyjne).

Antygenami mogą być immunoglobuliny wszystkich klas. Mają one swoiste determinanty dla danego izotypu łańcucha ciężkiego i lekkiego — determinanty izotypowe. Podając zwierzętom immunoglobuliny danej klasy obcego gatunku otrzymuje się poliwalentne surowice zawierające przeciwciała skierowane przeciwko epitopom swoistym dla danego izotypu łańcucha ciężkiego i łańcucha lekkiego kappa lub lambda, który jest wspólny dla różnych klas immunoglobulin. Na drodze absorpcji przeciwciał antyizotypowych za pomocą odpowiednich surowic można uzyskać reagenty specyficznie reagujące z łańcuchami lekkimi. Pomiędzy izotypami poszczególnych gatunków obserwuje się częściowe pokrewieństwo antygenowe.

Determinantami charakterystycznymi dla danego osobnika są determinanty allotypowe. Przeważnie są one odzwierciedleniem różnic w strukturze pierwszorzędowej łańcucha ciężkiego lub lekkiego. Częsteczka immunoglobuliny osobnika o określonych determinantach allotypowych może być immunogenem dla innego osobnika tego samego gatunku, u którego nie obserwuje się ich ekspresji.

Determinantami charakteryzującymi region zmienny cząsteczki immunoglobuliny są determinanty idiotypowe. Są one markerem cząsteczki immunoglobuliny danego osobnika. Lokalizowane są głównie w obrębie miejsca wiążącego antygen, dla ich ekspresji przeważnie wymagana jest obecność zarówno łańcucha ciężkiego, jak i lekkiego. Przeciwciała skierowane przeciwko determinantom idiotypowym można otrzymać przez immunizację innego osobnika tego samego gatunku. Specyficzny antygen lub haptent, wiążąc się do cząsteczki przeciwciała antyidiotypowego, może blokować reakcję pomiędzy determinantami idiotypowymi a skierowanymi przeciwko nim przeciwciałami. Przeciwciała antyidiotypowe mogą modulować ekspresję określonego typu immunoglobulin, odgrywają rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej (network theory) [3].

RECEPTOR ANTYGENOWY LIMFOCYTÓW B

Istnienie przeciwciał na powierzchni komórek — nazwanych łańcuchami bocznymi — zaproponował Ehrlich już w roku 1900, co oparte było bardziej na znakomitej, jak się okazało, intuicji tego badacza, niż na materiale doświadczalnym. „Teoria łańcuchów bocznych” Ehrlicha, uważana potem przez wiele lat za naiwną, odżyła w nowoczesnej formie w świetle wyników badań prowadzonych w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych.

Cząsteczki immunoglobulin na powierzchni limfocytów jako struktury rozpoznające antygeny postulowane są w teorii klonalnej selekcji. W myśl jej założeń każdy limfocyt ma genetyczną informację do wyprodukowania jednego rodzaju przeciwciał. Cząsteczki takie wbudowywane są w błonę komórkową jako receptory. Na różnych limfocytach są różnego rodzaju receptory, tak że pula limfocytów organizmu reprezentuje szerokie spektrum swoistości. Antygen może łączyć się ze swoistym dla siebie przeciwciałem na powierzchni

komórki prekursorowej, co prowadzi do różnicowania i podziałów. W wyniku tego powstaje klon komórek syntezujących przeciwciała o takiej swoistości jaką miały przeciwciała rozpoznające antygen.

Jak już wcześniej wspomniano, podstawową funkcją układu immunologicznego jest rozpoznanie obcej struktury i pobudzenie reakcji mogących prowadzić do jej wyeliminowania. Za rozpoznanie odpowiedzialne są receptory antygenowe limfocytów T i B – TCR i immunoglobuliny, głównie IgM i IgD. Są to białka wykazujące pewne podobieństwa strukturalne – oba należą do rodziny białek immunoglobulinowych, zbudowane są z łańcuchów mających regiony stałe i zmienne, odcinki zewnątrzkomórkowe, transmembranowe i wewnątrzcytoplazmatyczne.

Antygen swoiście rozpoznawany przez receptor immunoglobulinowy limfocytów B przedostaje się do wnętrza komórki (ulega endocytozie w połączeniu z cząsteczką immunoglobuliny) gdzie poddawany jest procesom przetwarzania i ponownie transportowany jest na powierzchnię komórki B w formie typowej dla komórek prezentujących antygen, czyli związany z cząsteczką MHC klasy II. Zdolność prezentowania antygeny przez limfocyty B znacznie przewyższa antygenowo niespecyficzne komórki prezentujące np. makrofagi. Receptory immunoglobulinowe, swoiście reagując z antygenem, mają zdolność koncentrowania go na powierzchni komórki, dla zapoczątkowania procesu odpowiedzi wystarczające są tysiąc, a nawet dziesięć tysięcy razy mniejsze dawki antygeny. Sieciowanie receptorów immunoglobulinowych przez antygen jest źródłem sygnału aktywującego przekazywanego do wnętrza komórki.

Funkcja receptora immunoglobulinowego związana jest ściśle z jego budową. Za rozpoznanie i wiązanie antygeny odpowiedzialny jest zewnątrzkomórkowy fragment utworzony z dwu łańcuchów lekkich i dwu transmembranowych łańcuchów μ lub δ . W jego obrębie zlokalizowane jest miejsce wiążące. Transmembranowy fragment, połączony niekowalencyjnie z kompleksem przypominającym CD3 receptora limfocytów T, odgrywa rolę w przesyłaniu sygnału. W kompleksie membranowym ludzkich i mysich immunoglobulin wykazano obecność dwu łańcuchów α i β , połączonych w heterodimer za pomocą mostków dwusiarczkowych. Tworzą one otoczkę okalającą transmembranowy odcinek łańcucha ciężkiego, wchodzące w jego skład aminokwasy hydrofobowe odpowiedzialne są za zakotwiczenie na powierzchni komórki. Wykazano, że membranowe IgM pozbawione łańcucha α ulegają wewnątrzkomórkowej degradacji. Heterodimer $\alpha \beta$ może być uważany za rdzeniowe białko proreceptora immunoglobulinowego. Strukturalne różnice pomiędzy powierzchniowymi IgM, IgD, IgG i IgA mogą sugerować, że połączone one są z różnymi systemami przesyłającymi sygnały. Przypuszcza się, że dla każdej klasy immunoglobulin może być izotypowo specyficzna podjednostka α i wspólny łańcuch β . Jednak są też dane przemawiające za tym, że heterodimer $\alpha \beta$ jest wspólny, a zróżnicowanie izotypowe jest wynikiem różnego stopnia glikozylacji łańcucha α [2, 8, 18].

Ilość oraz rodzaj poszczególnych klas immunoglobulin na powierzchni limfocytów B zależy od stanu rozwojowego komórki, immunoglobuliny powierzchniowe mogą więc być uważane za markery różnicowania. Komórki prekursorowe w pierwszym okresie życia zarodkowego myszy (pre-B cells) mają na swojej powierzchni tylko łańcuch μ , około dziewiątego tygodnia pojawiają się kompletne cząsteczki IgM, następnie wykrywane są limfocyty IgM^+IgD^+ oraz w niewielkiej ilości IgM^+IgG^+ , IgM^+IgA^+ lub IgM^+IgE^+ (10–12 tyg.). 3–6 dni po urodzeniu 90% limfocytów B myszy ma na swojej powierzchni IgM. Przyjmuje się, że na limfocycie B może być 10^5 cząsteczek immunoglobulin. Na poszczególnych etapach różnicowania limfocytów B obok immunoglobulin powierzchniowych pojawiają się receptory dla czynników pochodzących z limfocytów T, aktywujących spoczynkowe komórki B, wzrost komórek aktywowanych, różnicowanie się do komórek wydzielających przeciwciała i pobudzających sekrecję immunoglobulin (BSF-1/IL-4, BCGFII/IL-5, BCDF/BSF-2/LL-6). Ponad 80% IgM-pozytywnych limfocytów B jest równocześnie IgD^+ . Występujące równocześnie IgM i IgD mają jednakowy idiotyp, a więc przez ten sam klon mogą być produkowane przeciwciała o takiej samej swoistości, ale należące do różnych klas. Obecność określonych izotypów immunoglobulin na powierzchni limfocytów B jest odzwierciedleniem ich stanu funkcjonalnego. Na komórkach spoczynkowych obecne są równocześnie IgM i IgD. Stymulacja tych komórek antygenem powoduje zmianę fenotypu, główną formą membranową stają się IgM. Na powierzchni komórek pamięciowych występują IgG o takich właściwościach jak syntezowane i wydzielane, co ma ważne znaczenie dla zachowania informacji o swoistości na dany antygen – pamięć immunologiczna [1, 6, 7].

Chociaż immunoglobuliny należą do najlepiej poznanych białek i wciąż są przedmiotem intensywnych badań, to te podstawowe regulatory układu immunologicznego wciąż pozostawiają badaczom wiele tajemnic do odkrycia.

MARIA JANUSZ

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF IMMUNOGLOBULINS

S u m m a r y

Immunoglobulins are built up of two identical heavy and two identical light polypeptide chains. Each chain is made up of one variable and a few constant regions. These proteins, members of the immunoglobulin superfamily, share the so-called immunoglobulin domain. Pepsin splits the molecule into the F(ab')_2 fragment with an antigen binding function and the Fc fragment with effector functions such as complement binding and binding to cell surface receptors.

Isotypes of immunoglobulins generally define constant region determinants; allotypes refer to determinants encoded by one allele of a given immunoglobulin gene; idiotypic determinants are confined to the variable portion of the molecule.

One of the most interesting questions about immunoglobulins is the source of immense variation expressed in antibody binding specificity. The molecular basis of immunoglobulin diversity is rearrangement of immunoglobulin genes encoding heavy and light chains.

Immunoglobulins with a unique specificity are synthesized and secreted by B lymphocytes. This specificity is determined by the presence of immunoglobulin receptors on the cell surface.

The current view on the structure of immunoglobulins and on the genetic basis of their differentiation are presented. Biological and effector functions of immunoglobulins are also discussed.

LITERATURA

1. Burrows P. D., Cooper M. D. — *Regulated expression of cell surface antigens during B cell development*. Seminars in Immunology 2: 189–195, 1990.
2. Cambier J. C., Campbell K. S. — *Signal transduction by B lymphocyte receptors: structure-function relationships of membrane immunoglobulins and associated molecules*. Seminars in Immunology 2: 139–149, 1990.
3. Hasemann Ch. A., Capra J. D. — *Immunoglobulins: structure and function*. [W:] *Fundamental Immunology*, wyd. 2, s. 209–233, (Paul W. E. red.), Raven Press, N. York, 1989.
4. Hendershot L., Bole D., Kearney J. F. — *The role of immunoglobulin heavy chain binding protein in immunoglobulin transport*. Immunol. Today 8: 111–114, 1987.
5. Honjo T. — *Immunoglobulin genes*. Ann. Rev. Immunol. 1: 499–528, 1983.
6. Janusz M. — *Immunoglobuliny powierzchniowe*. Post. Hig. Med. Dośw. 36: 317–344, 1982.
7. Kishimoto T., Hirano T. — *B-lymphocyte activation, proliferation, and immunoglobulin secretion*. [W:] *Fundamental Immunology* wyd. 2, s. 385–411, (Paul W. E. red.) Raven Press, N. York 1989.
8. Koning F. — *Lymphocyte antigen receptors: a common design?* Immunol. Today 12: 100–101, 1991.
9. Kühn L. C., Kraehenbuhe J.-P. — *The membrane receptor for polymeric immunoglobulin is structurally related to secretory component*. J. Biol. Chem. 256: 12490–12495, 1981.
10. Max E. E. — *Immunoglobulins: molecular genetics*. [W:] *Fundamental Immunology*, wyd. 2, s. 235–290, (Paul W. E. red.) Raven Press, N. York 1989.
11. Osmond D. G. — *B cell development in the bone marrow*. Seminars in Immunology 2: 173–180, 1990.
12. Pascual V., Capra J. D. — *Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism and expression*. Adv. Immunol. 49: 1–64, 1991.
13. Roitt I. M. — *Essential Immunology*, wyd. 6, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1988.
14. Rosen F. S., Steiner L. A., Unanue E. R. — *MacMillan Dictionary of Immunology*, The Macmillan Press Ltd., 1989.
15. Ślopek S. — *Immunoglobuliny*. [W:] *Immunologia*. s. 45–65, (Mackiewicz S. red.) PZWL, Warszawa, 1986.
16. Wall R., Kuehl M. — *Biosynthesis and regulation of immunoglobulins*. Ann. Rev. Immunol. 1: 393–422, 1983.
17. Williams A. F., Barclay A. N. — *The immunoglobulin superfamily — domains for cell surface recognition*. Ann. Rev. Immunol. 6: 381–405, 1988.
18. Venkataraman A. R., Williams G. T., Dariavach P., Neuberger M. S. — *The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes*. Nature 352: 777–781, 1991.
19. Yancopoulos G. D., Alt F. W. — *Regulation of the assembly and expression of variable-region genes*. Ann. Rev. Immunol. 4: 339–368, 1986.