

WIESŁAWA RUDNICKA

Katedra Immunologii
Zakład Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź

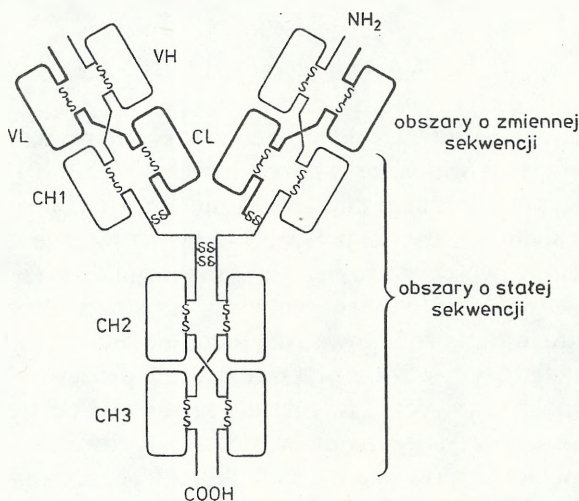
BUDOWA IMMUNOGLOBULIN

W ciągu 100 lat, które upłynęły od momentu odkrycia przeciwciał przez Emila von B e h r i n g a (wyróżnionego Nagrodą Nobla w roku 1901), immunoglobuliny ciągle pozostają przedmiotem zainteresowania licznych badaczy w ośrodkach naukowych na całym świecie. Zapotrzebowanie na wiedzę o tych białkach podykowane jest możliwością szerokiego ich stosowania jako leków: substytuty przeciwciał w niedoborach odpornościowych, czynniki znoszące szkodliwe działanie drobnoustrojów i produkowanych przez nie toksyn, inhibitory rozwoju nowotworów, regulatory wadliwie przebiegających procesów fizjologicznych, w tym reakcji odpornościowych. Przeciwciała są również cennymi preparatami diagnostycznymi, wykorzystywanymi w pracach prowadzonych z użyciem wszelkiego rodzaju materiałów pochodzenia biologicznego, a nawet produktów syntetycznych o właściwościach podobnych do materiałów biologicznych. W postępie wiedzy o immunoglobulinach, jaki dokonał się w ciągu 100 lat, szczególnie ważne okazały się: wyniki badań Geralda M. E d e l m a n a i Rodneya R. P o r t e r a (wyróżnionych Nagrodą Nobla w 1972 r.) wyjaśniające naturę molekularną przeciwciał, opracowanie przez Georga K ö h l e r a i Caesara M i l s t e i n a (wyróżnieni Nagrodą Nobla w 1984 r.) techniki otrzymywania przeciwciał monoklonalnych oraz ustalenie przez Susumu T o n e g a w a (Nagroda Nobla w 1987 r.) molekularnych podstaw zróżnicowania przeciwciał. Obecnie immunoglobuliny należą do grupy najlepiej poznanych białek. Znajomość struktury, funkcji i genetycznej kontroli ich syntezy pozwoliła na podjęcie, w pewnych przypadkach udanych, prób otrzymywania przeciwciał metodami inżynierii genetycznej. Stwarza to możliwość konstruowania przeciwciał o z góry zakładanych właściwościach, a nawet podejmowanie próby konstruowania „ulepszonych” przeciwciał w stosunku do tych, które występują w naturze.

STRUKTURA IMMUNOGLOBULIN

Przeciwciała, określane ogólną nazwą immunoglobulin, syntetyzowane są w odpowiedzi na stymulujące działanie antygenów i swoiście reagują ze strukturami wyznaczającymi swoistość antygenów, tj. determinantami lub

epitopami antygenowymi. Przeciwciała są produkowane przez aktywowane limfocyty grasicznie niezależne (limfocyty B), których finalną komórką rozwojową jest komórka plazmatyczna, a następnie wydzielane do krwi i płynów ustrojowych. Dlatego zachodzący *in vivo* proces produkcji przeciwciał, uruchamiany w odpowiedzi na wnikaące do organizmu antygeny infekcyjne (bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty zwierzęce) lub nieinfekcyjne (obce erythrocyty, obcogatunkowe surowice, obce białka zawarte w pokarmie, składniki leków), nosi nazwę odporności humoralnej.

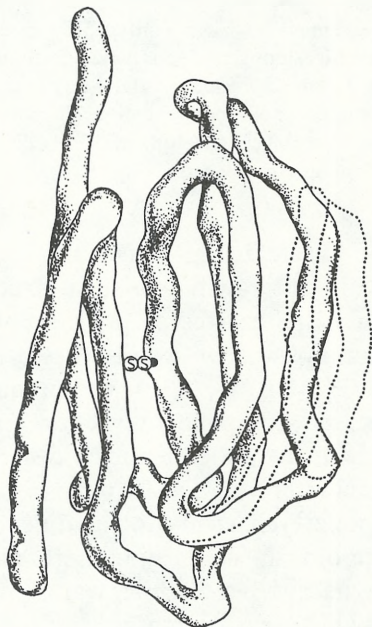


Rys. 1. Schemat budowy cząsteczki immunoglobuliny (IgG). Na rysunku przedstawiono łańcuchy ciężkie (H) oraz lekkie (L) (linia pogrubiona). Prostokąty obrazują obszary (domeny) łańcuchów polipeptydowych stabilizowane przez wiązania dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe. Obszary V charakteryzują się zmienną sekwencją aminokwasów, obszary C — wykazują relatywnie stałą sekwencję aminokwasów

Poza pokrewieństwem funkcjonalnym, wyrażającym się zdolnością swoistej reakcji z antygenami, immunoglobuliny wykazują wspólny plan budowy (rys. 1). Cząsteczka immunoglobuliny, w formie monomerycznej, zawiera dwa łańcuchy lekkie (L — light) o masie około 24 kDa i dwa łańcuchy ciężkie (H — heavy) o masie 55–70 kDa, związane między sobą mostkami dwusiarczkowymi, zewnątrzłańcuchowymi. Łańcuchy te, dzięki określonemu pofałdowaniu, tworzą trójwymiarowe globularne struktury, zwane obszarami lub domenami, zawierające od 120 do 130 reszt aminokwasowych. W łańcuchach lekkich występują dwie domeny, zaś w ciężkich — 4 lub 5 obszarów. Sposób pofałdowania łańcucha polipeptydowego w domenach różnorodnych przeciwciał jest podobny. Występuje 7 pętli o strukturze β w dwóch płaszczyznach, 3 w jednej i 4 w drugiej płaszczyźnie (rys. 2). Struktura przestrzenna każdej domeny stabilizowana jest przez wiązanie dwusiarczkowe wewnątrz-

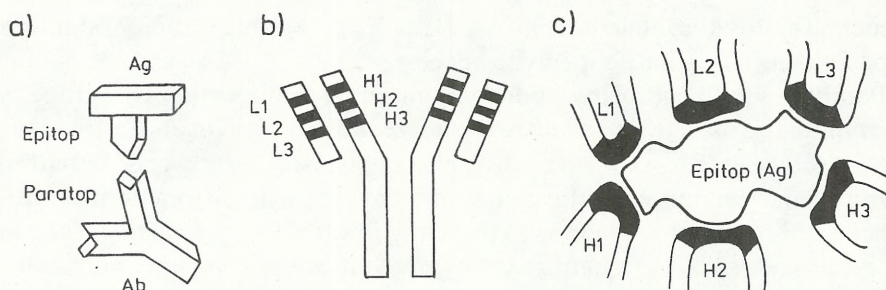
łańcuchowe. Poszczególne domeny oddzielone są od siebie słabo pofałdowanymi odcinkami łańcucha polipeptydowego.

Pomimo wspólnego plany budowy, immunoglobuliny stanowią grupę białek wybitnie zróżnicowanych. Sądzi się, że pojedynczy osobnik, w danym czasie, produkuje $10^6 - 10^8$ różnych, co do swoistości, przeciwciał. Wyjątkowe zróżnicowanie immunoglobulin jest czymś zrozumiałym w świetle nie ograniczonej różnorodności antygenów, które mogą pobudzać organizm do produkcji przeciwciał, swoiście z nimi reagujących i nie wiążących się z odmiennymi antygenami.



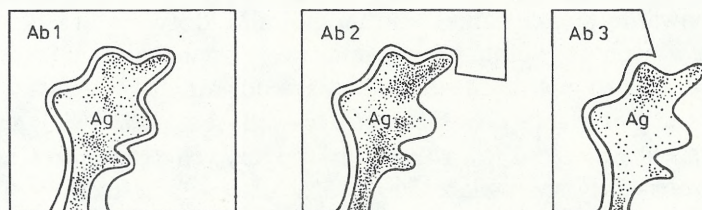
Rys. 2. Model przedstawiający sposób pofałdowania łańcucha polipeptydowego tworzącego pojedynczy obszar (domenę). Linia ciągła prezentuje układ złożeń łańcucha w obszarze o stałej sekwencji aminokwasów. Linia kropkowana obrazuje dodatkową pętlę, występującą w obszarach o zmiennej sekwencji aminokwasów. Układ złożeń stabilizowany jest przez wiązanie dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe [5].

Zróżnicowanie strukturalne immunoglobulin dotyczy przede wszystkim domen pierwszych (z wolną grupą aminową) łańcucha ciężkiego (VH) lub lekkiego (VL). Są to obszary o zmiennej sekwencji aminokwasów (V — variable). Różnice w pierwszorzędowej strukturze tych obszarów wykazano, porównując sekwencję aminokwasów różnych homogennych preparatów przeciwciał. Pozostałe obszary, stanowiące 66–75% części cząsteczki przeciwciała (C-constant), wykazują tylko ograniczoną zmienność (rys. 1). Taka organizacja obszarów immunoglobulinowych pozostaje w związku z pełnioną przez nie funkcją. Domeny VH i VL są odpowiedzialne za komplementarność miejsca



Rys. 3. Schemat przedstawiający organizację miejsca wiązania antygeny w cząsteczce przeciwciała. 3a — komplementarność epitopu (determinantu) antygenowego (Ag) i paratopu immunoglobuliny. 3b — regiony nadmienności w obszarze V łańcucha lekkiego (L1—L3) oraz łańcucha ciężkiego (H1—H3). 3c — przestrzenne ułożenie łańcuchów polipeptydowych zapewnia „sąsiedztwo” punktów nadmienności obu łańcuchów tworzących paratop, czyli właściwe miejsce wiązania epitopu antygenowego

wiązania antygeny (paratopu w cząsteczce przeciwciała) do determinantu antygenowego (rys. 3a). Warunkują one zatem swoistość reakcji przeciwciała z określonymi antygenami. W natywnej cząsteczce przeciwciała, zagęszczenia punktów zmienności sekwencji aminokwasów, zwane często obszarami nadmienności (po trzy w domenie VH i VL) (rys. 3b), występują w najbliższym sąsiedztwie, tworząc rodzaj „kieszeni” komplementarnej do epitopu antygeny (rys. 3c). To właśnie struktura obszarów nadmienności decyduje o niezwykle charakterze cząsteczek przeciwciała i o ich swoistości w stosunku do antygenów. Ogromne zróżnicowanie tych struktur znajduje odbicie w zróżnicowaniu immunoglobulin, które określa się terminem zróżnicowania idiotypowego. Należy jednocześnie zaznaczyć, że zróżnicowanie immunoglobulin, pozostające w związku z ich swoistością w stosunku do antygenów, ma charakter nie tylko jakościowy, ale również ilościowy. Określona cząsteczka przeciwciała może reagować z częściowo podobnymi determinantami, ale z różnym powinowactwem (affinity) w zależności od stopnia komplementarności jej paratopu do reagujących epitopów (rys. 4). Wynika to z tego, iż wiązanie antygen — przeciwciało jest reakcją odwracalną, w której siła wiązania jest



Rys. 4. Schemat ilustrujący powinowactwo różnych cząsteczek przeciwciał (Ab) do determinantu antygenowego (Ag). Powinowactwo Ab1 > Ab2 > Ab3

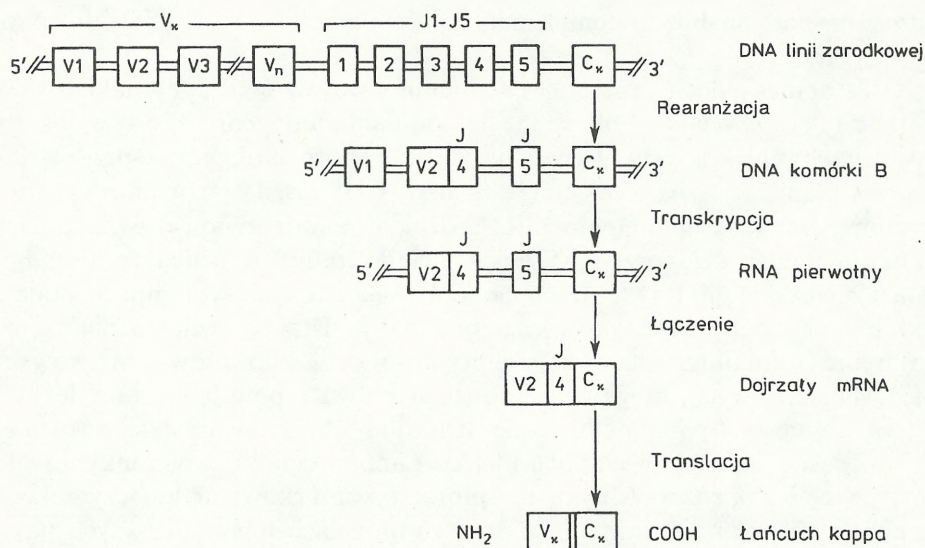
wprost proporcjonalna do komplementarności paratopu przeciwciała do epitopu antygenu.

O ile domeny o zmiennej sekwencji aminokwasów jak gdyby nakierowują cząsteczkę przeciwciała na określone determinanty antygenowe, o tyle obszary o stałej sekwencji są odpowiedzialne za aktywność biologiczną przeciwciała. Pewne ograniczone zróżnicowanie obszarów CH (rys. 1) pozwoliło wyróżnić u człowieka 5 klas immunoglobulin (zróżnicowanie izotypowe) oznaczanych jako: IgG (łańcuch ciężki γ), IgM (łańcuch ciężki μ), IgA (łańcuch ciężki α), IgE (łańcuch ciężki ϵ) lub IgD (łańcuch ciężki δ). Wszystkie klasy immunoglobulin, podobnie jak ich subklasy, wyróżnione na podstawie cech różnicujących w obrębie gatunku (zróżnicowanie allotypowe) oraz wiązań dwusiarczkowych międzyłańcuchowych, mogą zawierać jeden z dwu typów łańcuchów lekkich λ (typ λ) lub κ (typ κ). Określone struktury obszarów o stałej sekwencji aminokwasów łańcuchów ciężkich i lekkich immunoglobulin warunkują reakcję tych białek z różnorodnymi receptorami komórkowymi lub czynnikami humoralnymi w organizmie lub w różnych modelach doświadczalnych pozaustrojowych. Decydują one również o właściwościach serologicznych przeciwciał w reakcjach z korpuskularnymi lub rozpuszczalnymi antygenami wewnątrzustrojowymi lub infekcyjnymi.

GENETYCZNE PODSTAWY ZRÓŻNICOWANIA IMMUNOGLOBULIN

Udokumentowane ogromne zróżnicowanie immunoglobulin narzuciło konieczność szukania odpowiedzi na pytanie, ile potrzeba DNA dla zawarcia takiego ogromu informacji dla syntezy immunoglobulin i jak taka ilość DNA może pomieścić się w genomie jednej komórki. Dlatego też podstawowe znaczenie miało stwierdzenie, iż odrębne geny kodują obszary o zmiennej lub stałej sekwencji aminokwasów (rys. 1). Różne geny *V* dla obszarów zmiennych immunoglobulin mogą ulegać łączeniu z jednym genem *C* dla domeny stałej, tworząc w efekcie geny strukturalne dla łańcuchów polipeptydowych określonej klasy lub typu, różniące się fragmentem zmiennym. To w znacznym stopniu redukuje ilość informacji potrzebnej dla kodowania różnych cząsteczek immunoglobulin. Jak wykazał Susumu T o n e g a w a, łączenie się genów *V* z genami *C* jest możliwe dzięki reorganizacji, jakiej one podlegają podczas różnicowania się limfocytów B.

Organizacja genów dla immunoglobulin tylko w ogólnym zarysie przypomina strukturę genów dla nieimmunoglobulinowych białek receptorowych. Geny kodujące łańcuchy ciężkie oraz lekkie κ lub λ zlokalizowane są na różnych chromosomach, a zatem ich rearanżacja jest niezależna. U człowieka złożony locus dla łańcuchów ciężkich zlokalizowany jest na chromosomie 14, dla łańcuchów lekkich κ — na — chromosomie 2, zaś dla łańcuchów lekkich λ — na chromosomie 22. U myszy odpowiednie loci znajdują się na chromosomach 12, 6 i 16. Zawierają one grupy genów występujących w wielu



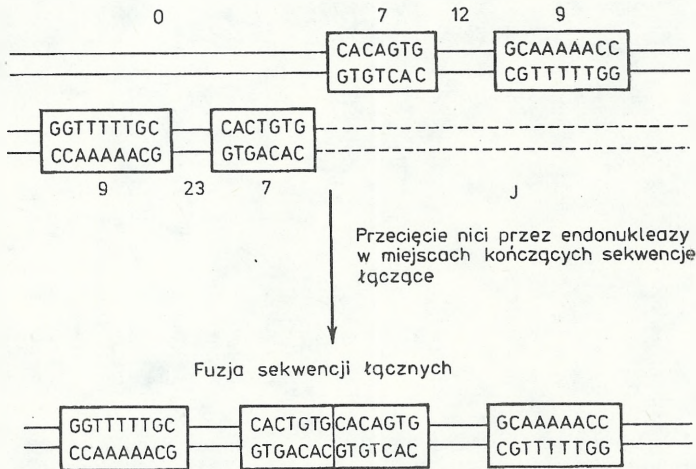
Rys. 5. Schemat organizacji genów dla syntezy łańcucha lekkiego κ . Sekwencje ulegające transkrypcji (eksony), przedstawione jako prostokąty, oddzielone są od siebie sekwencjami nie ulegającymi transkrypcji (intronami), które zaznaczono w postaci równoległych. Geny V_κ poprzedzone są krótkimi sekwencjami liderowymi, których dla uproszczenia nie przedstawiono na schemacie [1]

różniących się kopiach i kodujących poszczególne fragmenty łańcuchów polipeptydowych immunoglobulin.

Schemat organizacji genów dla łańcucha lekkiego κ przedstawiono na rys. 5. Linia zarodkowa zawiera, jak się sądzi, około 100–200 genów V dla odcinków zmiennych łańcucha κ (geny V_κ) kodujących łańcuch polipeptydowy odpowiadający około 95 resztom aminokwasowym (1–95). Każdy z genów V_κ poprzedzony jest krótką 5' sekwencją liderową L (L – leader) kodującą hydrofobowy peptyd sygnałowy o długości około 20 reszt aminokwasowych, który jest potrzebny dla transportu powstającego łańcucha polipeptydowego do cystyny endoplazmatycznej. Pozostały, krótki odcinek fragmentu V_κ , obejmujący około 13 reszt aminokwasowych (96–108), jest prawdopodobnie kodowany przez 5 genów J (join). Dopelnieniem jest pojedynczy gen C_κ , kodujący obszar stały łańcucha κ (reszty aminokwasowe 109–214). Gen strukturalny dla łańcucha κ , podobnie jak dla innych łańcuchów immunoglobulinowych, jest genem rozczłonkowanym. Sekwencje ulegające transkrypcji na mRNA – eksony, oddzielone są od siebie sekwencjami nie ulegającymi transkrypcji – intronami. T_0 , co jest szczególne w organizacji genów dla immunoglobulin, to reorganizacja, której one podlegają. Aby powstał strukturalny gen dla łańcucha κ , w różnicującym się limfocycie B musi nastąpić wybór jednego z genów V_κ . Jak przebiega proces selekcji, nie wiadomo. Sądzi się, że jest on niezależny od obecności antygeny, jakkolwiek prawdopodobne jest, że pewne geny V_κ mają szansę być selekcjonowane z większą częstością niż

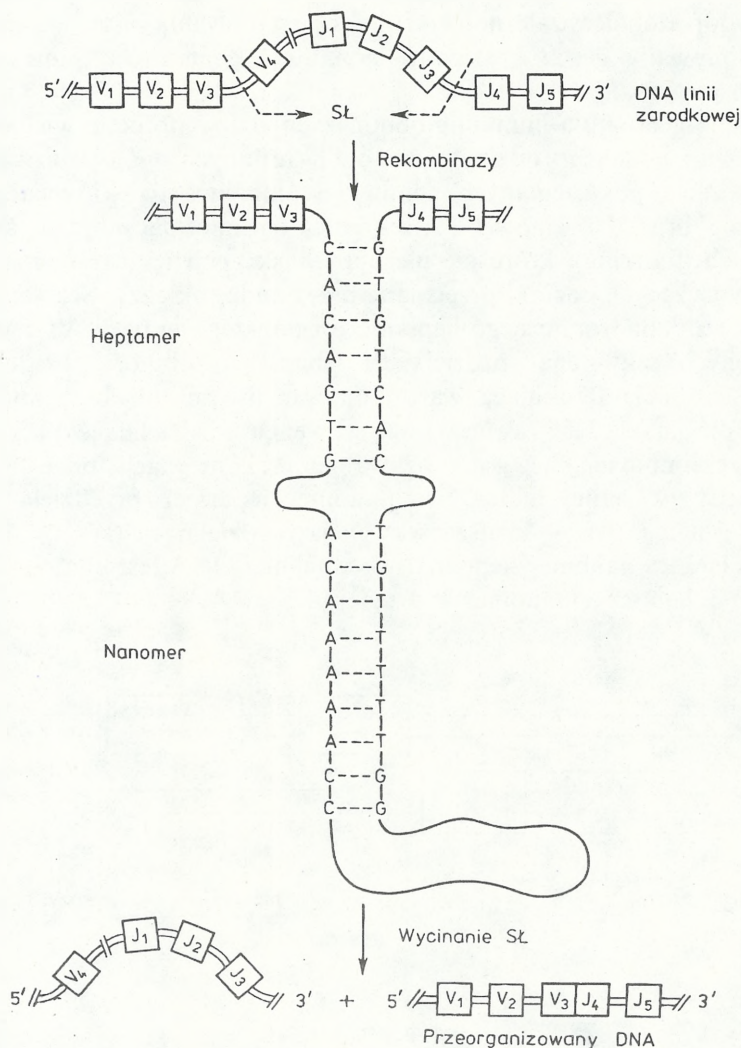
inne, prawdopodobnie w zależności od miejsca usytuowania w szeregu genów $V\kappa$. Wyselekcjonowany gen $V\kappa$ ulega połączeniu z genem $C\kappa$, poprzedzonym wybranym genem $J\kappa$.

Składanie genów dla immunoglobulin zachodzi w procesie wieloetapowej rekombinacji z udziałem rodziny enzymów określanych ogólną nazwą rekombinaz. Łączenie poszczególnych genów jest możliwe dzięki występowaniu w końcach 5' oraz 3' eksonów V i J , sekwencji ograniczających, tzw. sekwencji flankujących (flanking), które nie ulegają transkrypcji i które pełnią funkcję elementów łączących odcinki przecinane przez endonukleazy. Sekwencje takie składają się z palindromicznego heptameru i bogatego w pary AT nanomeru, przedzielonych sekwencją rozdzielającą (spacer) o długości 12 lub 23 pz (rys. 6). Sekwencje flankujące warunkują możliwość lub brak możliwości zajścia rekombinacji. Jeśli zawierają one sekwencje rozdzielające o takiej samej długości, rekombinacja nie jest możliwa. Do rekombinacji może dochodzić wtedy, kiedy w jednej nici DNA nanomer/heptamer przedziela dłuższa, a w drugiej nici DNA – krótsza sekwencja rozdzielająca (rys. 6). Wówczas sekwencja łącząca nanomer/heptamer w jednej nici DNA jest komplementarna do sekwencji heptamer/nanomer w drugiej nici DNA.



Rys. 6. Schemat przedstawiający łączenie nici DNA linii zarodkowej rozcinanej przez endonukleazy podczas procesów reorganizacji genów dla syntezy immunoglobulin. Prostokąty przedstawiają sekwencje łączące heptamer/nanomer, przedzielone sekwencjami rozdzielającymi o różnej długości (12 lub 23 bp). [2]

Pierwszy etap reorganizacji genów to przecięcie obu nici DNA, zazwyczaj w miejscu połączenia heptameru z sekwencją kodującą. Następnie heptamery obu rekombinujących partnerów są precyzyjnie łączone. Następuje wypełnianie zbytecznego DNA (rys. 7), który następnie ulega wycięciu i rozpadowi.



Rys. 7. Schemat ilustrujący reorganizację genów dla syntezy immunoglobulin podczas różnicowania się limfocytu B, zachodzącą pod wpływem rekombinaz. SŁ — sekwencje łączące. [1]

W wyniku reorganizacji, wycinaniu lub łączeniu genów dla immunoglobulin, określona zostaje swoistość receptorów immunoglobulinowych limfocytu B, a tym samym zdeterminowana jest swoistość immunoglobulin, które komórka taka może w przyszłości produkować. Warto zaznaczyć, iż swoistość immunoglobulin syntetyzowanych przez dany limfocyt B lub jego potomstwo nie ulega zmianie w ciągu całego okresu życia komórki.

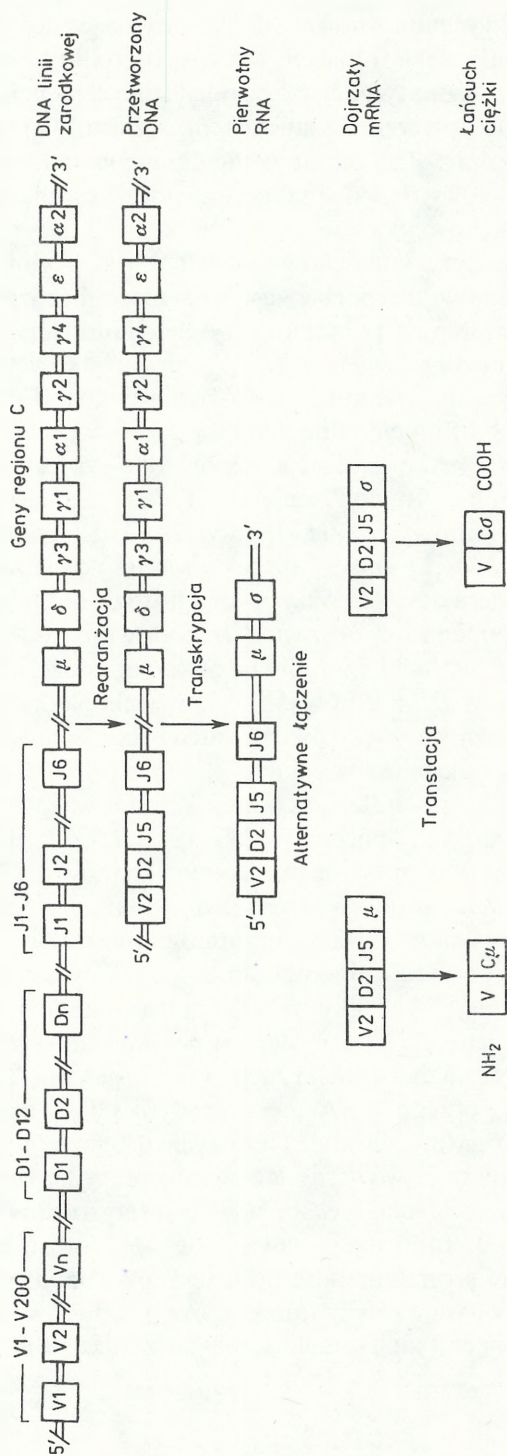
Złożony w wyniku rearanżacji DNA ulega transkrypcji z wytworzeniem RNA pierwotnego, który podlega modyfikacji potranskrypcyjnej. Z pierwo-

tnego transkryptu RNA wycinane są introny i powstaje dojrzały RNA informacyjny, który następnie ulega translacji w szerskim retikulum endoplazmatycznym (siateczce śródplazmatycznej). Po odcięciu sekwencji liderowej powstaje łańcuch κ , który po połączeniu z łańcuchem ciężkim tworzy kompletną cząsteczkę immunoglobuliny. Przyjmując istnienie u człowieka 80 różnych genów $V\kappa$ i 5 różnych genów $J\kappa$, można przewidywać hipotetycznie wystąpienia 400 różnych łańcuchów κ .

Struktura genów dla syntezy łańcuchów lekkich λ jest podobna do organizacji genów dla łańcuchów κ , chociaż jest ona nieco bardziej złożona. W procesie rekombinacji następuje połączenie wyselekcjonowanego genu V_λ z wybranym segmentem J_λ i jednym z genów C_λ . W linii zarodkowej człowieka, jak się ocenia, zawartych jest przynajmniej 40 różnych genów V_λ , 6 różnych genów J_λ oraz przynajmniej 3 funkcjonalne geny C_λ .

Jeszcze bardziej złożona jest organizacja genów dla syntezy łańcuchów ciężkich (H) immunoglobulin. Region zmienny tych łańcuchów podlega kontroli trzech segmentów genowych: VH , D (diversity-różnorodność) i JH . Geny VH kodują 5-liderową sekwencję i około 98-aminokwasowy odcinek domeny zmiennej V , zawierający pierwszy i drugi region nadzmienności (rys. 8). Trzeci region nadzmienności obszaru VH kodowany jest przez geny D i JH . Przyjmuje się, iż w ludzkiej linii zarodkowej może występować 75–250 genów VH , 12 genów D i 6 genów JH , co pozwala zakładać istnienie kilku–kilkunastu tysięcy różnych obszarów zmiennych łańcuchów ciężkich.

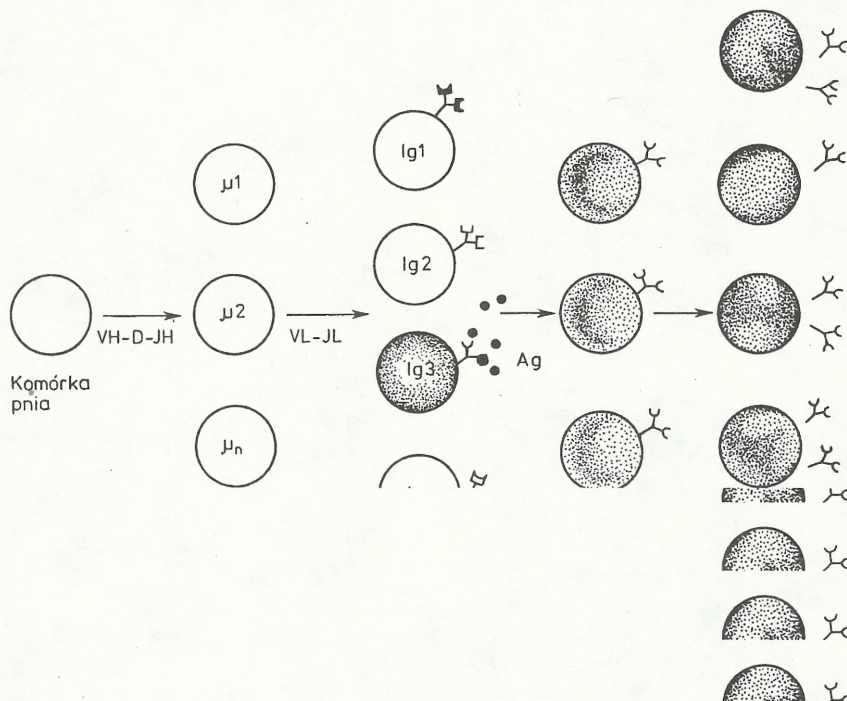
To, co wyróżnia locus łańcuchów ciężkich, to obecność odrębnych eksonów dla syntezy odcinków o stałej sekwencji aminokwasów (CH) poszczególnych klas i podklas tych łańcuchów. Geny CH oddzielone są od segmentów genowych $V/D/J$ długim intronem. Szereg eksonów dla łańcuchów ciężkich poszczególnych klas i subklas przedstawiono na rys. 8. Składanie strukturalnego genu dla łańcuchów ciężkich immunoglobulin w różnicującym się limfocycie B przebiega podobnie do reorganizacji genów dla łańcuchów lekkich. W pierwszym etapie, w wyniku rekombinacji zachodzi połączenie jednego genu D z jednym genem JH , a następnie przyłączany jest jeden gen JH . Przeorganizowany DNA ulega transkrypcji wraz z genami $C\mu$ lub $C\delta$. Powstający transkrypt pierwotnego RNA ulega modyfikacji potranskrypcyjnej, która może przebiegać na dwóch alternatywnych drogach. Wycinane są introny oraz ekson $C\delta$ i powstaje wówczas RNA informacyjny dla łańcucha μ lub wraz z intronami wycięciu ulega ekson $C\mu$ i syntetyzowany jest RNA informacyjny dla łańcucha δ . Informacja zawarta w obu rodzajach mRNA może ulegać transkrypcji w szorstkim retikulum endoplazmatycznym jednej komórki B, która zatem w tym samym czasie może produkować łańcuchy lekkie klasy μ i δ , wykazujące jednak identyczną swoistość w stosunku do antygeny.



Rys. 8. Schemat organizacji genów dla syntezy łańcuchów ciężkich immunoglobulin. Prostokąty przedstawiają sekwencje ulegające transkrypcji (eksony) oddzielone od siebie przez sekwencje nie ulegające transkrypcji (introny), które zaznaczono w postaci skosnych równoległych. Geny V poprzedzone są krótkimi sekwencjami liderowymi, których dla uproszczenia nie zaznaczono na rysunku [1]

EKSPRESJA GENÓW DLA IMMUNOGLOBULIN

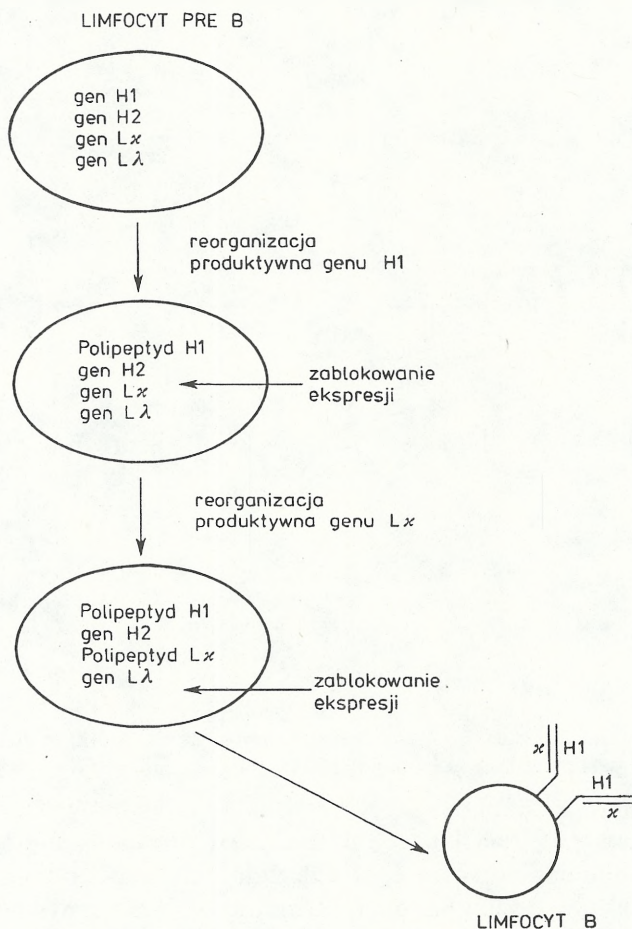
Limfocyty B ssaków powstają w płodowej wątrobie, ale już po urodzeniu funkcję limfopoetyczną przejmuje szpik kostny. W szpiku kostnym limfocyty B powstają z samoodtworządzających się komórek pnia. W nowo różnicujących się limfocytach B zachodzi reorganizacja genów dla łańcuchów ciężkich i synteza wewnątrzcytoplazmatycznych łańcuchów μ (rys. 9). W dalszej kolejności re-



Rys. 9. Schemat przedstawiający różnicowanie się limfocytów B w komórki produkujące immunoglobuliny (Ig). slg (surface) — immunoglobuliny powierzchniowe, Ag — antygen. [2]

aranżacji ulegają geny dla łańcuchów lekkich i produkowane są kompletne cząsteczki immunoglobulinowe IgM lub IgD, które po odcięciu sekwencji liderowej są transportowane ku błonie komórkowej i ulegają powierzchniowej ekspresji. W porównaniu z immunoglobulinami sekrecyjnymi, immunoglobuliny powierzchniowe mają dodatkową sekwencję w końcu z wolną grupą karboksylową, umożliwiającą ich zakotwiczenie w błonie. Limfocyt B w tym stadium rozwoju określany jest mianem komórki B-dziewiczej (virgin) lub spoczynkowej. Cały dotychczasowy proces różnicowania limfocytu B jest niezależny od antygeny. W wyniku reorganizacji genów dla immunoglobulin, limfocyt B nabywa swoistość antygenową. Powierzchniowe immunoglobuliny (slg) pełnią funkcję receptorów rozpoznających determinanty antygenowe.

Limfocyt B może rozpoznawać wyłącznie determinanty antygenowe komplementarne do swoich immunoglobulinowych receptorów. Związanie antygenu przez te receptory aktywuje komórkę B, pobudzając jej ekspansję (prolifерacja) i różnicowanie się w komórki plazmatyczne produkujące i wydzielające przeciwciała. Swoistość przeciwciał produkowanych przez potomstwo pobudzonego limfocytu B jest identyczne ze swoistością jego receptorów immunoglobulinowych, które rozpoznały stymulujący antygen.

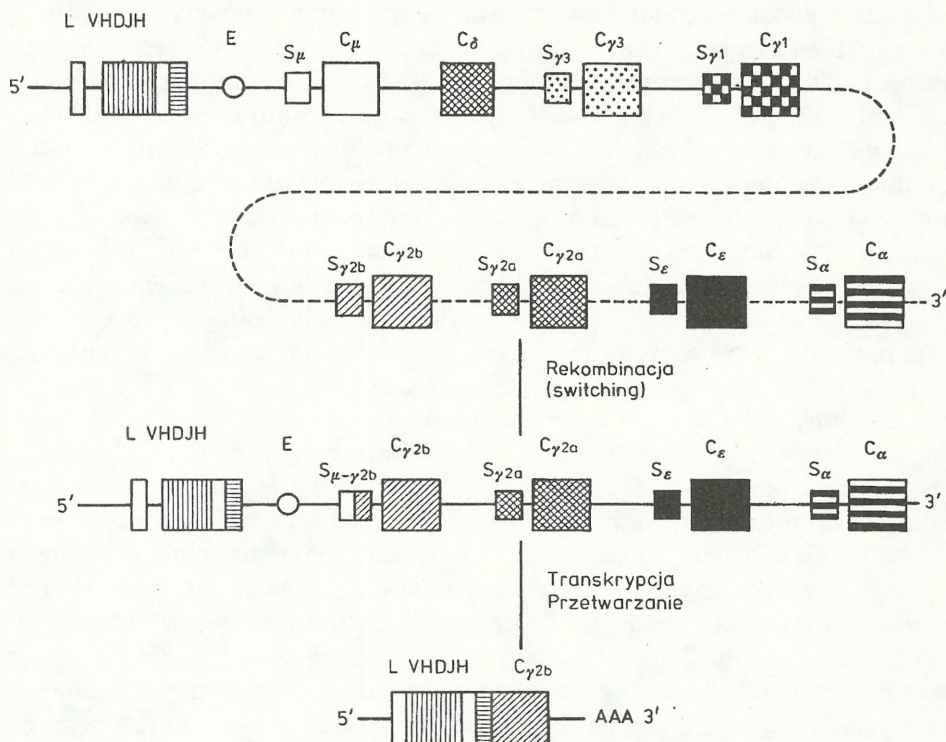


Rys. 10. Schemat przedstawiający zjawisko wykluczenia allelicznego. Geny łańcuchów ciężkich: H1 i H2, oraz łańcuchów lekkich: κ i λ

Teoretycznie, nowo różnicujący się limfocyt B ma możliwość wyboru licznych genów *V*, *D* i *J* dla odcinków zmiennych (rys. 10) łańcuchów immunoglobulinowych oraz możliwość wyboru genów κ lub λ dla syntezy

łańcuchów lekkich. Jednak, jak wcześniej wspomniano, pojedynczy limfocyt B produkuje tylko jeden rodzaj identycznych co do swoistości przeciwciał, albo κ albo λ . Dzieje się tak pomimo, że limfocyt B, jak każda komórka somatyczna, jest komórką diploidalną z podwójnym garniturem chromosomów dla łańcuchów ciężkich oraz lekkich κ i λ , od obojga rodziców. Jednak produkowane immunoglobuliny kodowane są przez pojedyncze loci dla łańcuchów ciężkich oraz lekkich κ lub λ . Zjawisko używania informacji genowej zawartej tylko w jednym allelicznym chromosomie nosi nazwę wykluczenia allelicznego. Mechanizm odpowiedzialny za występowanie zjawiska wykluczenia allelicznego pozostaje nieznany. Na podstawie wyników badań prowadzonych z użyciem myszy transgeniczných (do których przeniesiono obce geny uzyskując ich ekspresję) sądzi się, że wyłączenie alleliczne następuje w momencie przeniesienia, do błony różnicującego się limfocyty B, gotowej immunoglobuliny receptorowej. Można zatem przypuszczać, że reorganizacja genów *V*, *D* i *J* zachodzi na obu chromosomach. Jednak w momencie, kiedy rearanżacja genów na jednym chromosomie jest produktywna, tzn. pozwala na wyprodukowanie jednego typu łańcucha polipeptydowego H, działa jakiś nieznany mechanizm supresorowy, blokujący reorganizację genów dla drugiego łańcucha H. Jeśli jednak rearanżacja genów *V*, *D* i *J* na pierwszym chromosomie nie prowadzi do powstania genu funkcjonalnego, reorganizacji ulegają geny locus H na drugim chromosomie i produkowany jest odpowiedni łańcuch ciężki (rys. 10). Podobnie wygląda sytuacja w przypadku łańcuchów lekkich. Jeśli rearanżacja genów locus κ pozwala na wyprodukowanie łańcucha κ , reorganizacja genów locus λ jest blokowana. Jeśli rearanżacja genów locus κ nie prowadzi do powstania genu funkcjonalnego dla łańcucha κ , reorganizacji ulegają geny locus λ i odtąd komórka produkuje immunoglobuliny typu λ . W ten sposób, chociaż jedna komórka B może używać dla danego rodzaju łańcuchów immunoglobulinowych wyselekcjonowanych genów pochodzenia albo ojcowskiego albo matczyńskiego, to zbiór limfocytów B będzie wykorzystywał geny dziedziczone po obojgu rodzicach.

O ile pojedynczy limfocyt B może produkować przeciwciała tylko o jednej swoistości zdeterminowanej przez wybrane geny *VL/JL* i *VH/D/JH*, o tyle klasa produkowanych przeciwciał może ulegać zmianie. Podczas rozwoju komórek B, w pierwszym okresie produkowane są immunoglobuliny klasy IgM (łańcuchy μ) i IgD (łańcuchy δ). Później może następować zmiana klasy produkowanych przeciwciał, określana jako przełączenie (switching) klasy lub izotypu (rys. 11). Mechanizm tego zjawiska polega na rekombinacji delecyjnej, przebiegającej jednak inaczej niż w przypadku składania genów dla obszarów zmiennych przeciwciał. O ile rearanżacja genów *VL/JL* oraz *VH/D/JH* jest antygenowo niezależna, o tyle przełączanie izotypu wymaga stymulacji antygenowej i podlega regulacyjnemu działaniu limfokin uwalnianych przez limfocyty T. Ponadto zjawisko to dotyczy wyłącznie reorganizacji genów dla łańcuchów ciężkich. W końcach 5' każdego eksonu regionu C, z wyjątkiem



Rys. 11. Schemat przedstawiający zmianę klasy (izotypu) immunoglobulin produkowanych przez pojedynczy limfocyt B. W pierwszym okresie komórka B produkuje przeciwciała klasy IgM (łańcuch μ). Następnie następuje przestawienie się tej komórki (switching) na produkcję przeciwciał klasy IgG (łańcuch $\gamma 2b$). Pomimo zmiany izotypu produkowanych przeciwciał, ich swoistość w stosunku do antygeny nie ulega zmianie, gdyż nie dochodzi do zmiany w genie *VH-D-JH* kodującym obszar zmienny przeciwciała. L — sekwencja liderowa, E — wzmacniacz (enhancer) regulujący transkrypcję, S — sekwencje przełączania klasy (switching), odrębne dla różnych genów C kodujących łańcuchy ciężkie: μ , δ , $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ , α [2]

eksonu $C\delta$, znajduje się układ powtarzających się sekwencji zwanych regionami przełączania klasy (S — switching). Regiony S zawarte w poszczególnych eksonach CH różnią się między sobą. Ich długość wynosi 2–10 kb. Rekombinacji delecyjnej, leżącej u podstaw zjawiska przełączania klasy, podlegają introny, a więc sekwencje nie ulegające transkrypcji. Zatem rekombinacja taka nie powoduje zmian w odczytywaniu sekwencji przepisanych. Jak przedstawiono na rys. 11, limfocyt B, który produkuje przeciwciała pod kontrolą genów *VH/D/JH* połączonych z genami $C\mu$ i $C\delta$, w obecności swego antygeny oraz pewnych limfokiny wydzielanych przez limfocyty T (np. $IL-4$ lub $INF\gamma$) reorganizuje swój DNA, doprowadzając do połączenia nie zmienionego regionu *VH/D/JH* z innym genem CH (np. $C\gamma 2b$), poprzedzonym odpowiednią

sekwencją S. Leżące pomiędzy miejscem nowego połączenia eksony i introny ulegają wycięciu, a więc komórka nigdy w przyszłości nie będzie mogła produkować klasy przeciwciał, dla których eksony zostały wyeliminowane (na rys. 11, IgM, IgD, IgG3, IgG1). Przeorganizowany DNA ulega transkrypcji. Następnie wycinane są introny i powstaje informacyjny RNA dla łańcuchów ciężkich, na rys. 11 klasy IgG2b. Zjawisko „switching” ma duże znaczenie fizjologiczne, gdyż zmianie izotypu przeciwciała towarzyszy zmiana właściwości biologicznych produkowanych immunoglobulin, a zatem rozszerzeniu ulega zakres procesów, w których przeciwciała mogą brać udział. Zwłaszcza że przełączenie izotypu nie musi być wydarzeniem jednostkowym. Komórka może powtórnie reorganizować DNA, przedstawiając się na produkcję następnej klasy immunoglobulin, jakkolwiek tylko w kierunku „downstream” (na rys. 11, na produkcję Ig2a, IgE lub IgA).

Występowanie w linii zarodkowej licznych genów dla regionów zmiennych immunoglobulin jest główną, ale nie jedyną przyczyną ogromnej heterogenności tych białek. Powodem dalszego ich zróżnicowania jest możliwość łączenia każdego łańcucha ciężkiego H z każdym łańcuchem lekkim, κ lub λ . Przyjmując istnienie 200 genów *VH*, 12 genów *D* i 6 genów *JH* (razem 218 genów), następnie 200 genów *V κ* i 5 genów *J κ* (razem 205 genów) oraz 40 genów *V λ* , 6 genów *J λ* i prawdopodobnie 6 genów *CL* (razem 52 genów), można przewidywać istnienie około 35×10^6 różnych cząsteczek immunoglobulin. Możliwość dalszego zróżnicowania immunoglobulin wynika z faktu pewnej niestałości pozycji łączenia segmentów *V* i *J* oraz *V*, *D* i *J*, co może powodować pewną zmienność pozycji aminokwasów w produkowanych immunoglobulinach (zmienność łączenia — junctional diversity). Ponadto w wyniku działania terminalnych transferaz deoksynukleotydowych, pewne układy nukleotydów mogą ulegać insercji w miejsca połączeń *V-D* lub *D-J* (zmienność insercyjna — insertional diversity). Zmienność taka dotyczy głównie regionów nadzmienności, decydujących o powinowactwie immunoglobulin do determinantów antygenowych. Wreszcie geny *V* poszczególnych limfocytów B mogą ulegać punktowej mutacji somatycznej. Sądzi się, że zjawisko to leży u podstaw obserwowanego wzrostu powinowactwa przeciwciał podczas przechodzenia odpowiedzi humoralnej pierwotnej w odpowiedź wtórną.

WIESŁAWA RUDNICKA

THE STRUCTURE OF IMMUNOGLOBULINS

S u m m a r y

A short definition of antibodies is followed by the essentials on the relation of antibody structure to antigenic specificity (idiotypes) and biological activity. On this ground the unique genetic mechanism responsible for enormous diversity of immunoglobulins is presented. Finally, the process of the regulation of immunoglobulin gene expression is discussed.

LITERATURA

1. Benjamini E., Leskowitz S. — *Immunology: a short course*, A. J. Willey and Sons Inc. Publ., 49—65, 83—95, 1991.
2. Blackwell T. K., Alt F. W. — Immunoglobulin genes. [W] *Molecular Immunology* (red. B. D. Hames i D. M. Glover) IRL Press, Oxford, 1—60, 1989.
3. Brüggemann M., Winter G., Waldmann H., Neuberger M. S. — *The immunogenicity of chimaeric antibodies*. J. Exp. Med. 170: 2153—2157, 1989.
4. Edelman G. M., Cunningham B. A., Gall W. E., Gottlieb P. D., Rutishauser U., Waxdal M. J. — *The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63: 78—85, 1969.
5. Feinstein A. — *The three dimensional structure of immunoglobulins*. [W] *The immune system; a course of the molecular and cellular basis of immunity* (red. M. J. Hobart i Ian McConnell) Blackwell Sci. Publ., Oxford, s. 30, 1976.
6. Güssow D. — *Cloning for expression of immunoglobulin variable region genes and generation of variable region gene repertoires*. Behring Inst. Res. Com. 87: 25—32, 1990.
7. Köhler G., Milstein C. — *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256: 495—497, 1975.
8. Korsmeyer S. J., Bakhshi A., Arnold A., Siminovitch K. A., Waldmann T. A. — *Genetic rearrangements of human immunoglobulin genes*. [W] *The biology of idiotypes* (red. Mark I. Greene i Alfred Nisonoff) Plenum Press. New York, 75—96, 1984.
9. Plückthun A., Glockshuber R., Skerra A., Stadlmüller J. — *Properties of Fv and Fab fragments of the antibody McPC603 expressed in E.coli*. Behring Inst. Res. Comm. 87: 48—55, 1990.
10. Poljak R. J., Amzel L. M., Avey H. P., Chen B. L., Phizackerley R. P., Saul F. — *Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3305—3310, 1973.
11. Ptak W. — *Podstawy immunologii*. PZWL, Warszawa, 18—24, 27—30, 34—41, 1987.
12. Roitt I. — *Essential Immunology*. Blackwell Sci. Publ., 7 wyd., Oxford, Chapter 3: 31—54, 1988.
13. Shimizu A., Honjo T. — *Immunoglobulin class switching*. Cell. 36: 801—803, 1984.
14. Ślopek S. — *Immunoglobuliny*. [W] *Immunologia* (red. S. Mackiewicz) PZWL, Warszawa, 71—78, 1991.
15. Tonegawa S. — *Somatic generation of antibody diversity*. Nature 302: 575—581, 1983.
16. Winter G. — *Gene technologies for antibody engineering*. Behring Inst. Res. Comm. 87: 10—20, 1990.