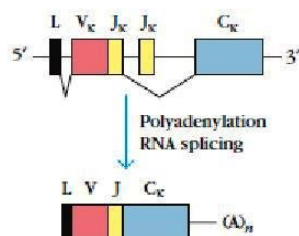


فصل پنجم

سازمان‌دهی و بیان ژن‌های ایمونوگلوبولین

- شکل‌گیری یک مدل ژنتیکی سازگار با ساختار ایمونوگلوبولین
- سازماندهی چند ژنی ژن‌های ایمونوگلوبولین
- بازآرایی‌های ژنی ناحیه متغیر
- مکانیسم‌های بازآرایی DNA ناحیه متغیر
- شکل‌گیری تنوع آنتی‌بادی
- تغییر کلاس در ژن‌های ناحیه ثابت
- بیان ژن‌های ایمونوگلوبولین
- ساخت، تجمع و ترشح ایمونوگلوبولین‌ها
- تنظیم رونویسی ژن ایمونوگلوبولین
- ژن‌ها و مهندسی ژنتیکی آنتی‌بادی



یکی از ویژگی‌های مهم سیستم ایمنی مهره‌داران، توانایی آن برای پاسخ به آنتی‌ژن‌های نامحدود بیگانه می‌باشد. با مطالعه توالی مولکول‌های ایمونوگلوبولین مشخص می‌گردد که هر مولکول آنتی‌بادی در ناحیه متغیر خود، یک توالی اسید آمینه‌ای خاص داشته ولی در ناحیه ثابت، دارای یکی از توالی‌های محدود ناحیه ثابت می‌باشد. اساس ژنتیکی این تنوع دائمی و تدریجی در یک مولکول پروتئینی، در سازماندهی ژنتیکی مولکول ایمونوگلوبولین نهفته می‌باشد.

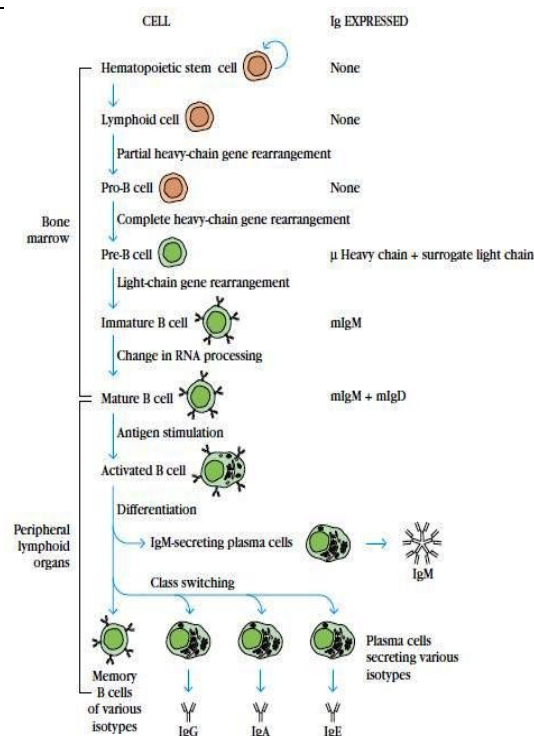
در DNA **رده زایا**^۱، چندین قطعه ژنتیکی وجود دارند که پروتئین‌های زنجیره سبک یا سنگین یک ایمونوگلوبولین را کد می‌کنند. این توالی‌ها در **سلول‌های زایا**^۲ حضور دارند ولی تا زمانی که به صورت ژن‌های عملکردی، سازماندهی نشوند، عمل رونویسی و ترجمه بر روی آنها صورت نگرفته و زنجیره کامل شکل نمی‌گیرد. در طی بلوغ لنفوسیت‌های B در مغز استخوان، قطعات مشخصی از این مجموعه ژنی به صورت تصادفی توسط یک سیستم ژنتیکی پویا انتخاب می‌شوند که قادر به ایجاد بیش از 10^6 ترکیب مختلف خواهند بود. در مرحله بعد که افزایش تنوع در گنجینه جایگاه‌های اتصال مولکول آنتی‌بادی ایجاد می‌شود، این تنوع به بیش از 10^8 خواهد رسید. طی تکامل سلول‌های B، روند بلوغ سلول‌های پیش‌ساز B شامل یک سری وقایع بازآرایی ژنتیکی بوده که با اصلاحات ژنتیکی همراه شدو در نهایت تنوع محصولات نهایی را رقم خواهد زد. در انتهای این روند، یک سلول B بالغ،

1- germ-line

2- germ cells

دارای توالی‌های کدکننده برای یک ناحیه متغیر زنجیره سنگین و یک ناحیه متغیر زنجیره سبک خواهد بود که تعیین کننده ویژگی مولکول آنتی‌بادی و سلول B می‌باشند. پس از تحریک آنتی‌ژنی یک سلول B بالغ در اعضای لنفاوی محیطی، بازآرایی‌های بعدی در قطعات ژنتیکی ناحیه ثابت، منجر به تغییر در ایزوتایپ آنتی‌بادی گردیده که بدون تغییر در ویژگی آن، موجب تغییر در فعالیت‌های بیولوژیک آنتی‌بادی می‌شود. بنابراین، DNA کروموزومی سلول‌های B بالغ، دیگر با DNA سلول‌های رده زایا یکسان نمی‌باشد. با وجودی که تصور بر این است که DNA ژنومی، یک نسخه پایدار می‌باشد، ولی رده سلولی لنفوسیتی این کپی را حفظ نمی‌کند. بازآرایی ژنتیکی یکی از ویژگی‌های اصلی تمایز لنفوسیتی بوده و هیچ‌کدام از سایر سلول‌های مهره‌داران، این روند را طی نمی‌کنند.

این فصل ابتدا به جزئیات سازماندهی ژن‌های ایمونوگلوبولین، فرآیند بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین و مکانیسم‌هایی که توسط آنها سیستم پویای ژنتیکی ایمونوگلوبولین، تمایز یافته و بیش از 10^6 نوع ویژگی آنتی‌ژنی متفاوت تولید می‌کند، می‌پردازد. سپس، مکانیسم تغییر ایزوتایپ، نقش تمایزی پردازش RNA در بیان ژن ایمونوگلوبولین و تنظیم ترجمه ژن ایمونوگلوبولین را توضیح می‌دهد. این بخش، با کاربرد دانسته‌های ما از بیولوژی مولکولی ژن‌های ایمونوگلوبولین در زمینه مهندسی مولکول‌های آنتی‌بادی در کاربردهای درمانی و تحقیقاتی خاتمه می‌یابد. فصل ۱۱ کل روند تکامل سلول‌های B را از بازآرایی‌های اولیه ژنتیکی سلول‌های پیش‌ساز B تا تمایز نهایی و تبدیل آنها به سلول‌های B خاطره‌ای و پلاسماسل‌های ترشح کننده آنتی‌بادی را پوشش می‌دهد. شکل ۱-۵ مراحل تکامل سلول B را نشان می‌دهد.



شکل مروری ۱-۵: تکوین سلولی B. وقایعی که طی بلوغ در مغز استخوان رخ می دهد هیچ نیازی به آنتی ژن ندارد. در حالی که فعال شدن و تمایز سلول های B بالغ در اندام های لنفاوی محیطی مستلزم وجود آنتی ژن می باشد. mIgD و mIgM معرف Ig های غشایی می باشند. IgE، IgA و IgG ایمونوگلوبولین های ترشحی هستند.

- تشریح یک مدل ژنتیکی مطابق با ساختمان ایمونوگلوبولین

نتایج تجزیه و تحلیل توالی ایمونوگلوبولین که در فصل ۴ توضیح داده شدند تعدادی از ویژگی های ساختاری ایمونوگلوبولین را نشان می دهند که به سختی با مدل کلاسیک ژنتیکی تطابق داشتند. هر مدل از ژن های ایمونوگلوبولین باید با ویژگی های آنتی بادی که در ادامه به آنها اشاره می شود، مطابقت داشته باشند:

- تنوع زیاد در ویژگی‌های آنتی‌بادی

- حضور یک ناحیه متغیر در انتهای آمینی و یک ناحیه ثابت در انتهای کربوکسیل زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین.
- وجود ایزوتایپ‌هایی با ویژگی آنتی‌ژنی یکسان که از همراهی نواحی ثابت و متغیر زنجیره‌های سنگین مختلف حاصل می‌شوند.

- مدل‌هایی با تنوع رده زایا و تنوع پیکره‌ای جهت توضیح تنوع آنتی‌بادی

ایمونولوژیست‌ها به مدت چندین دهه به دنبال مکانیسم‌های ژنتیکی بودند که بتوانند تنوع ساختار آنتی‌بادی‌ها را شرح دهند. در این زمینه دو تئوری مختلف شکل گرفت. **تئوری‌های رده زایا**^۱ براین باور بودند که ژنوم توزیع شده توسط سلول‌های زایا-اسپرم و تخمک- دارای یک منبع ژنی ایمونوگلوبولین بزرگ هستند. این تئوری‌ها هیچ‌گونه مکانیسم ژنتیکی خاصی را برای توضیح تنوع آنتی‌بادی‌ها متصور نمی‌شدند. آنها بر سر این موضوع بحث می‌کردند که میزان کارایی سیستم ایمنی، در اثر تخصیص قطعه‌ای از ژنوم که آنتی‌بادی را کد می‌کند، تعیین می‌گردد. در طرف مقابل **نظریه‌های تنوع پیکره‌ای**^۲ بیانگر این نکته هستند که ژنوم حاوی مقادیر نسبتاً کمی از ژن‌های ایمونوگلوبولین بوده که از آنها در اثر **نوترکیبی**^۳ و **جهش**^۴ تعداد زیادی آنتی‌بادی ایجاد می‌شود.

با شناسایی هر چه بیشتر توالی‌های آمینواسیدی ایمونوگلوبولین‌ها، مشخص گردید که حتماً باید مکانیسم‌هایی وجود داشته باشند که نه تنها آنتی‌بادی بسازند، بلکه ثبات آنها را نیز حفظ کنند. در این که تنوع توسط مکانیسم‌های رده زایا یا مکانیسم‌های پیکره‌ای ایجاد شود،

1- Germ-line theories

2- somatic variation theories

3- recombination

4- mutation

یک تضاد به چشم می‌خورد و آن این است که چگونه پایداری ناحیه ثابت^۱ (C) حفظ می‌شود در حالی که برخی مکانیسم‌های تمایزدهنده، ناحیه متغیر^۲ (V) را می‌سازند؟ به هر حال نه نظریه اول و نه نظریه دوم نمی‌توانند یک توضیح قانع‌کننده برای این خصوصیت اصلی ایمونوگلوبولین بدهند. طرفداران نظریه رده زایا در توضیح یک مکانیسم تعامل برای ایجاد تنوع در قسمت‌های مختلف ژن زنجیره‌های سبک و سنگین ناتوان بودند و طرفداران نظریه تنوع پیکره‌ای نیز قادر به توضیح مکانیسمی که یک ناحیه متفاوت را از ژن‌های زنجیره سبک و سنگین در سلول‌های پیکره‌ای همراه با ناحیه ثابت ایجاد کند نبودند.

یک ویژگی ساختاری دیگر در ژن‌های ایمونوگلوبولین که لازم به شرح است، این می‌باشد که در توالی اسید آمینه‌ای پروتئین میلومای انسانی به نام Til، توالی یکسانی از ناحیه متغیر هم با ناحیه ثابت زنجیره سنگین μ و هم با ناحیه ثابت زنجیره سنگین γ همراه می‌باشند. چنین پدیده‌ای توسط فردی به نام C.Todd که بر روی خرگوش‌ها مطالعه می‌کردند نیز مشاهده شد. وی دریافت که یک نشانه آلوتیپیک مشخص در ناحیه متغیر زنجیره سنگین می‌تواند با نواحی ثابت زنجیره سنگین μ ، γ و α همراه باشد. شاهد دیگر مشاهده شده این بود که یک توالی ناحیه متغیر که موجب یک ویژگی آنتی‌ژنی خاص می‌گردد، قادر خواهد بود که با چندین توالی ناحیه ثابت زنجیره سنگین همراه گردد. به عبارت دیگر، کلاس‌ها یا ایزوتایپ‌های مختلفی از آنتی‌بادی مانند IgG و IgM می‌توانند با توالی‌های یکسانی از ناحیه متغیر بیان شوند.

1- constant region

2- variable region

مدل یک پلی‌پپتید - دوژن Bennet و Dreyer

در تلاشی برای شناسایی یک مدل ژنتیکی برای ساختار ایمونوگلوبولین و در راستای تجربیات قبلی، Bennet و Dreyer در مقاله تئوریک کلاسیک خود در سال ۱۹۶۵ بیان کردند که دو ژن جداگانه یک زنجیره سبک یا سنگین ایمونوگلوبولین را کد می‌کنند: یکی برای منطقه متغیر (V) و دیگری برای منطقه ثابت (C). آنها پیشنهاد کردند که این دو ژن در ساختمان DNA می‌توانند به نحوی کنار یکدیگر قرار گیرند تا یک پیام همبستگی و اتصال ایجاد کنند که در نهایت رونویسی و ترجمه آنها منجر به شکل‌گیری یک زنجیره سبک یا سنگین ایمونوگلوبولین گردد. در آن زمان نظریه یک ژن - یک پلی‌پپتید مورد قبول همگان قرار داشت، در نتیجه پیشنهاد آنها یک تحول محسوب می‌شد. به علاوه، آنها نشان دادند که صدها یا هزاران ژن منطقه متغیر در ژنوم رده زایا حضور داشته در حالی که تنها نسخه‌های تکی از ژن‌های کلاس‌ها و زیر کلاس‌های مختلف ناحیه ثابت وجود دارند.

خصوصیت عجیب این مدل ترکیبی که از ترکیب عناصر نظریه‌های تنوع پیکره‌ای و تنوع رده زایا حاصل می‌شد، این بود که این مدل قادر بود تا آن سری از ایمونوگلوبولین‌هایی که در آنها یک ناحیه متغیر با چندین ناحیه ثابت همراه شده بود را توضیح دهد. این مدل همچنین می‌توانست با تخصیص یک ژن منطقه ثابت برای هر کلاس یا زیر کلاس ایمونوگلوبولین، حفظ فعالیت‌های بیولوژیک عملکردی ایمونوگلوبولین‌ها و تنوع زیاد ناحیه متغیر آنها را نیز توضیح دهد.

در ابتدا از مدل بنت - دریر به طور غیر مستقیم حمایت می‌شد. مطالعات اولیه بر روی کینتیک هیبریداسیون DNA، با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با رادیواکتیو و اختصاصی ناحیه ثابت، نشان دادند که پروب تنها به یک یا دو ژن متصل می‌گردید و این پیش‌بینی را که برای هر کلاس یا زیر کلاس، تنها یک یا دو ژن برای منطقه ثابت وجود دارد را ثابت می‌کرد.

انفجار تونگاوا – بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین

در سال ۱۹۷۶ تونگاوا^۱ و هوزومی^۲ اولین شاهد مستقیم دال بر این که نواحی C و V ایمونوگلوبولین‌ها توسط ژن‌های مجزا کد می‌شوند و این که ژن‌ها در مرحله تمایز سلول‌های B بازآرایی می‌شوند را بدست آوردند. با انتخاب DNA از سلول‌های جنینی و سلول‌های میلومای بالغین – سلول‌هایی در مراحل کاملاً مختلف تکامل – تونگاوا و هوزومی از آندونوکلئازهای محدود کننده مختلفی برای تولید قطعات DNA استفاده کردند. این قطعات براساس اندازه جداسازی شدند و از نظر توانایی هیبرید شدن با یک پروب mRNA نشاندار شده با رادیواکتیو، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. دو قطعه مجزای محدود شده از DNA جنینی با mRNA هیبرید شدند. در حالی که تنها یک قطعه محدود شده از DNA میلومای بالغین با همان نمونه هیبرید می‌شد. تونگاوا و هوزومی پیشنهاد کردند که طی تمایز لنفوسیت‌ها از مرحله جنینی به مرحله پلاسما سل‌های کاملاً تمایز یافته (که در این مثال از سلول‌های میلوما استفاده شده بود) ژن‌های نواحی ثابت و متغیر دچار بازآرایی می‌شوند. در چنین، ژن‌های C و V توسط قطعات بزرگ DNA که دارای جایگاه اثر برای آندونوکلئاز محدود کننده هستند، از هم جدا شده‌اند. در طی تمایز، ژن‌های C و V به هم نزدیک شده و توالی DNA حدفاصل آنها حذف می‌گردد. این کار اساس ایمونولوژی را متحول ساخت و در سال ۱۹۸۷ تونگاوا جایزه نوبل را از آن خود نمود.

آزمایشات اولیه تونگاوا خسته کننده و زمان بر بودند و امروزه تکنیک لکه‌گذاری ساترن که بسیار قدرتمندتر می‌باشد جای آن را گرفته است. این روش در کل جهان برای بررسی بازآرایی ژن‌های ایمونوگلوبولین استفاده می‌شود و هیبریداسیون با یک پروب نشاندار شده برای بخشی از ژن ایمونوگلوبولین نیاز به شستشوی قطعات محدود شده DNA از قطعات ژل را برطرف کرده است. شکل ۲-۵ بازآرایی در لوکوس زنجیره سبک کاپا (κ) را با مقایسه

1- S.Tonegawa

2- N. Hozumi

قطعات تولید شده توسط هضم DNA از یک کلون سلول‌های B با نمونه گرفته شده از هضم سلول‌های غیر B (مانند سلول‌های کبدی یا اسپرم) را نشان می‌دهد. بازآرایی یک ژن V بخش عظیمی از DNA رده زایا را حذف می‌کند، در نتیجه تفاوت‌هایی بین لوکوس‌های بازآرایی شده و بازآرایی نشده از نظر تعداد و توزیع جایگاه‌های محدود کننده ایجاد می‌کند و این منجر به تولید الگوهای محدود کننده متفاوت در لوکوس‌های بازآرایی شده و بازآرایی نشده می‌گردد.

سازماندهی چند ژنی ژن‌های ایمونوگلوبولین

با کلون کردن و تعیین توالی DNA زنجیره سبک و سنگین ایمونوگلوبولین‌ها، پیچیدگی بیشتری نسبت به آنچه که Bennet و Dreyer تصور کرده بودند، آشکار گردید. زنجیره‌های سبک κ و λ و زنجیره‌های سنگین توسط خانواده‌های چند ژنی جداگانه که بر روی کروموزوم‌های مختلف قرار دارند کد می‌شوند (جدول ۵-۱).

TABLE 5-1 Chromosomal locations of immunoglobulin genes in human and mouse		
Gene	CHROMOSOME	
	Human	Mouse
λ Light chain	22	16
κ Light chain	2	6
Heavy chain	14	12

DNA در رده زایای هر کدام از این خانواده‌های چندژنی، شامل توالی‌های کدکننده متفاوتی هستند که **قطعات ژنی**^۱ نامیده می‌شوند و توسط بخش‌های غیر کدکننده از هم جدا می‌شوند. در طی بلوغ سلول‌های B، این قطعات ژنی دچار بازآرایی شده و کنار یکدیگر قرار می‌گیرند تا ژن‌های عملکردی ایمونوگلوبولین خاصی تشکیل شوند.

هر خانواده ژنی ویژگی‌های خاصی دارد

خانواده زنجیره‌های سبک K و λ شامل قطعات ژنی V، J و C می‌باشد. قطعات بازآرایی شده VJ نواحی متغیر زنجیره‌های سبک را کد می‌کنند. خانواده زنجیره سنگین شامل قطعات V، D، J و C می‌باشد. قطعات بازآرایی شده ژنی VDJ ناحیه متغیر زنجیره‌های سنگین را کد می‌کنند. در هر خانواده ژنی، قطعات ژنی C، مناطق ثابت را کد می‌کنند. هر قطعه ژنی V در انتهای '۵ خود با یک اگزون کوچک که یک پپتید سیگنال^۱ یا رهبر^۲ را کد می‌کند، آغاز می‌شود. پپتید رهبر، زنجیره سبک و سنگین را در شبکه اندوپلاسمی راهنمایی می‌کند. این پپتید قبل از تکمیل تشکیل ایمونوگلوبولین از زنجیره‌های سبک و سنگین جدا می‌شود. در نتیجه اسیدآمینه‌هایی که توسط این توالی کد می‌شوند در مولکول‌های نهایی ایمونوگلوبولین ظاهر نمی‌شوند.

خانواده چند ژنی زنجیره لامبدا (۸)

اولین مدرک دال بر این که منطقه متغیر زنجیره سبک که در حقیقت توسط دو قطعه ژنی کد می‌شوند، زمانی آشکار شد که تونگاوا، DNA رده زایا را که کد کننده ناحیه متغیر زنجیره سبک لامبدای موش بود را کلون کرد و توالی کامل نوکلئوتیدهای آن را تعیین کرد. با مقایسه توالی نوکلئوتیدی با توالی اسیدآمینه‌ای منطقه متغیر زنجیره لامبدا، نتیجه‌ای غیر قابل انتظار مشاهده شد. اگر چه ۹۷ اسیدآمینه اول ناحیه متغیر زنجیره λ با توالی کدون نوکلئوتیدی مطابقت داشتند، در ۱۳ اسیدآمینه انتهای کربوکسیل ناحیه متغیر چنین تطابقی دیده نمی‌شد. این مطلب مشخص می‌ساخت که بیشتر جفت‌بازها خارج شده بودند و یک منطقه ۳۹ جفت بازی به نام بخش اتصال یا L، بقیه ۱۳ اسیدآمینه منطقه متغیر زنجیره λ را کد می‌کنند. در نتیجه یک ژن عملکردی ناحیه λ شامل دو توالی کد کننده است - یک

1- signal peptide

2- Leader

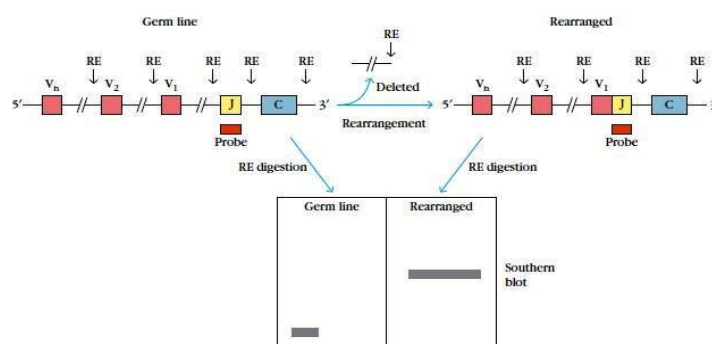
بخش V در سمت ۵' و یک بخش J در سمت ۳' - که توسط یک توالی DNA غیر کد کننده از هم جدا می‌باشند.

خانواده چند ژنی λ در دره زایای موش حاوی ۲ قطعه ژنی $V\lambda$ ، ۳ قطعه ژنی دارای عملکرد $J\lambda$ و دو قطعه ژن $C\lambda$ می‌باشد (شکل ۳a-۵). علاوه بر نسخه‌های عملکردی این ژن‌ها، برخی اشکال کاذب می‌باشند. آنها ژن‌های ناقصی هستند که قادر به کد کردن پروتئین نمی‌باشند؛ چنین ژن‌هایی با حرف یونای سای (ψ) نشان داده می‌شوند. به شکل جالبی، $C\lambda_4$ که مکمل ناحیه ثابت $J\lambda_4$ می‌باشد یک ژن کاملاً عملکردی است. قطعه $V\lambda$ و سه قطعه ژنی $J\lambda$ ، ناحیه متغیر زنجیره سبک را کد می‌کنند و هر یک از سه قطعه عملکردی ژن $C\lambda$ ناحیه ثابت یکی از سه زیرگونه λ را کد می‌کنند (λ_1 ، λ_2 و λ_3). در انسان، لوکوس λ پیچیدگی بیشتری دارد. به طوری که این لوکوس حاوی ۳۰ قطعه عملکردی ژن $V\lambda$ ، ۴ قطعه ژنی $J\lambda$ و ۷ قطعه $C\lambda$ که فقط ۴ عدد از آنها عملکردی هستند، می‌باشد. علاوه بر بخش‌های عملکردی، مجموعه ژنی λ در انسان، حاوی چندین ژن کاذب $V\lambda$ و $J\lambda$ نیز می‌باشد.

خانواده چند ژنی زنجیره کاپا (κ)

این خانواده در موش تقریباً شامل ۷۵ قطعه ژنی $V\kappa$ است که هر کدام در بالا دست همراه یک توالی رهبر می‌باشند (در انتهای ۵'). این خانواده همچنین دارای ۵ قطعه ژنی $J\kappa$ (یکی از آنها ژن کاذب و غیر عملکردی است) و یک قطعه ژن $C\kappa$ نیز می‌باشد (شکل ۳b-۵). همانند خانواده چند ژنی λ ، قطعات $J\kappa$ و $V\kappa$ ، ناحیه متغیر زنجیره سبک کاپا را کد می‌کنند و ژن $C\kappa$ ناحیه ثابت را کد می‌کند. از آنجایی که تنها یک قطعه $C\kappa$ وجود دارد، هیچ زیر نوعی از زنجیره‌های κ وجود ندارد. مقایسه بخش‌های a و b شکل ۳-۵ نشانگر این می‌باشد که آرایش قطعات ژنی در خانواده κ با λ تفاوت دارد. خانواده چند ژنی κ در انسان

که یک سازمان‌یابی مشابه موش دارد، تقریباً دارای ۴۰ قطعه ژنی V_K و ۵ قطعه J_K و یک قطعه C_K می‌باشد.



شکل ۲-۵: اساس آزمایشگاهی جهت تشخیص بازآرایی در یک جایگاه Ig. تعداد و اندازه قطعات محدود شونده در نتیجه مجاورت DNA با آنزیم محدود کننده (RE) بوده که توسط توالی DNA تعیین می‌شود. هضم یک DNA بازآرایی شده با یک آنزیم محدود کننده موجب تشکیل الگویی از قطعات می‌شود که با الگوی حاصل از قطعات بازآرایی نشده متفاوت می‌باشد. این قطعات توسط روش لکه گذاری ساترن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند. در این مثال یک پروب که دارای یک قطعه ژن J می‌باشد، جهت تشخیص قطعات هضم شده با RE استفاده می‌شود که شامل تمام یا بخشی از این قطعه می‌باشد. طبق شکل، بازآرایی در نتیجه حذف یک قطعه DNA رده زایا و از دست رفتن یک جایگاه محدود شونده می‌باشد.

خانواده چند ژنی زنجیره سنگین

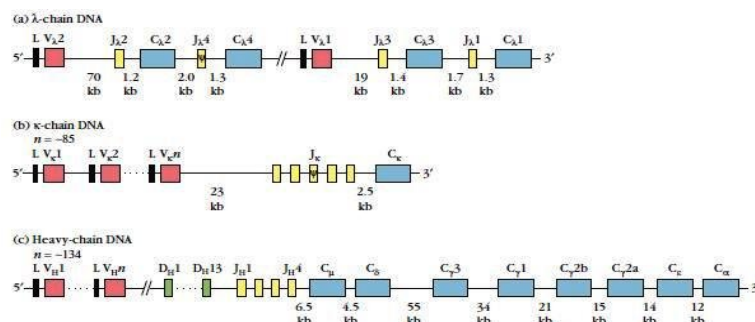
سازماندهی ژن‌های زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین مشابه ولی پیچیده‌تر از زنجیره‌های K و λ می‌باشد (شکل ۳-۵). یک قطعه ژنی اضافی، قسمتی از ناحیه متغیر زنجیره سنگین را کد می‌کند. وجود این قطعه، اولین بار توسط هود^۱ و همکارانش نشان داده شد که توالی اسید آمینه‌های ناحیه متغیر زنجیره سنگین را با توالی‌های نوکلئوتیدی V_H و J_H مقایسه کردند.

قطعه ژنی V_H اسید آمینه‌های ۱ تا ۹۴ را کد می‌کند و قطعه ژنی J_H اسید آمینه‌های ۹۸ تا ۱۱۳ را کد می‌کند هر چند که هیچ کدام از این قطعات، اطلاعات لازم برای کد کردن اسید آمینه‌های ۹۵ تا ۹۷ را حمل نمی‌کنند. وقتی که توالی نوکلئوتیدی DNA بازآرایی شده در میلوما با توالی DNA رده زایا مقایسه شود، یک توالی نوکلئوتیدی اضافی میان V_H و J_H دیده می‌شود که مربوط به اسید آمینه‌های موقعیت ۹۵ تا ۹۷ می‌باشد.

هود از این نتایج، نتیجه‌گیری کرد که یک قطعه سومی در رده زایا وجود دارد که باید به بخش‌های ژنی V_H و J_H اتصال یابد، تا کل ناحیه متغیر زنجیره سنگین را کد کند. این قطعه ژنی که اسید آمینه‌های ناحیه مکمل تعیین کننده ^{۳۱} (CDR3) را کد می‌کند، به دلیل شرکت در ایجاد تنوع آنتی‌بادی با حرف D نمایش می‌دهند. تونگاوا و همکارانش، محل قطعات ژنی D را که در DNA رده زایای موش قرار دارند را با یک پروب cDNA مکمل علیه ناحیه D مشخص کردند و نشان دادند که قطعات D بین قطعات V_H و J_H قرار دارند. تعیین توالی مستقیم خانواده چند ژنی زنجیره سنگین که روی کروموزوم ۱۴ انسان قرار دارد، مشخص کرده که DNA شامل ۳۹ قطعه ژنی V_H است که در بالا دست یک سری ۲۳ تایی از قطعات عملکردی ژن D قرار دارند. همانند زنجیره‌های سبک، هر قطعه ژنی V_H ، با فاصله کمی پشت یک توالی رهبر قرار می‌گیرد. پایین دست قطعات ژنی D_H ، ۶ قطعه ژنی عملکردی J_H وجود دارد که در ادامه به یک سری C_H ختم می‌گردد. هر قطعه C_H یک ایزوتایپ زنجیره سنگین Ig را کد می‌کند. قطعات C_H شامل اگزون‌ها و اینترون‌ها می‌باشد. هر اگزون یک دومن مجزا از ناحیه ثابت زنجیره سنگین را کد می‌کند. یک سازماندهی ژنی مشابه در مورد ژن‌های زنجیره سنگین موش نیز مشاهده می‌شود.

حفظ اعمال مؤثر بیولوژیک مولکول آنتی‌بادی، توسط تعداد محدودی از ژن‌های ناحیه ثابت زنجیره سنگین صورت می‌گیرد. در انسان و موش، قطعات ژنی C_H به صورت متوالی و با ترتیب $C\mu$ ، $C\delta$ ، $C\lambda$ ، $C\epsilon$ و $C\alpha$ قرار دارند (شکل ۳-۵). این ترتیب متوالی تصادفی

نمی‌باشد؛ معمولاً مربوط به توالی بیان کلاس‌های مختلف Ig در جریان تکامل سلول‌های B است. برای مثال در اثر اولین مواجهه با آنتی‌ژن، پاسخ اولیه یک سلول B، سنتز آنتی‌بادی از کلاس IgM می‌باشد.



شکل مروری ۳-۵: سازمان یابی قطعات ژنی رده زبای Ig در موش. (a) زنجیره سبک λ (b) زنجیره سبک κ (زنجیره‌های κ و λ توسط قطعات ژنی V، J و C کد می‌شوند) (c) زنجیره سنگین (توسط قطعات ژنی V، J، D و C کد می‌شوند)

- بازآرایی‌های ژنی ناحیه متغیر

در بخش‌های قبل نشان داده شد که ژن‌های عملکردی که زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین‌ها را کد می‌کنند، توسط وقایع نوترکیبی در سطح DNA شکل می‌گیرند. این وقایع، همراه با وقایع موازی آنها که بر روی پذیرنده‌های سلول T رخ می‌دهند، تنها بازآرایی‌های ژنی شناخته شده در مهره‌داران می‌باشند. بازآرایی‌های ژنی ناحیه متغیر به صورت یک روند متوالی و طی بلوغ سلول‌های B در مغز استخوان رخ می‌دهند. ابتدا ژن‌های ناحیه متغیر زنجیره‌های سنگین و سپس ژن‌های ناحیه متغیر زنجیره‌های سبک بازآرایی می‌شوند. در آخرین فرآیند، هر سلول B دارای یک توالی DNA ناحیه متغیر برای زنجیره سنگین و یکی هم برای زنجیره سبک خود خواهد بود.

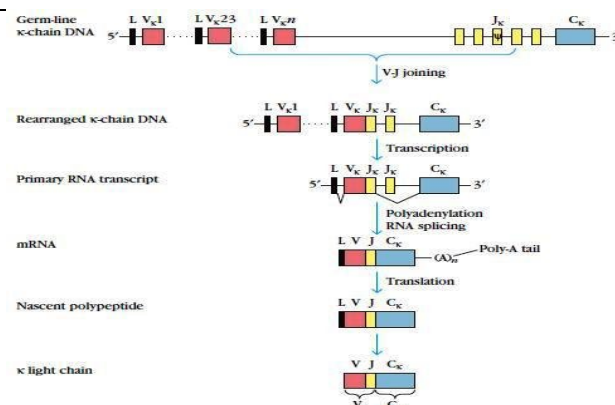
فرآیند بازآرایی ژنی ناحیه V، منجر به تولید سلول‌های B بالغ و صلاحیت‌دار ایمنی خواهد شد که هر کدام از این سلول‌ها متعهد می‌شوند که آنتی‌بادی با یک جایگاه اتصال به

آنتی‌ژن، که توسط توالی خاصی که با ژن‌های بازآرایی شده ناحیه متغیر کد شده‌اند، را تولید کنند. همانطور که در ادامه توضیح داده خواهد شد، در بازآرایی ژن‌های ناحیه ثابت زنجیره سنگین، فرآیندی به نام تغییر کلاس، موجب تولید تغییرات بیشتری در کلاس یا ایزوتایپ آنتی‌بادی‌ها می‌گردد ولی این تغییرات بر ویژگی آنتی‌ژنی محصول (آنتی‌بادی) اثر ندارند.

DNA زنجیره سبک مراحل بازآرایی V-J را طی می‌کند

تولید زنجیره‌هایی سبک K و λ نیاز به بازآرایی قطعات ژنی V و J ناحیه متغیر دارد. در انسان هر ژن $V\lambda$ عملکردی، می‌تواند با هر کدام از ۴ ترکیب $J\lambda-C\lambda$ ترکیب شود. در موش، مراحل کمی پیچیده‌تر است. بازآرایی DNA می‌تواند قطعه ژنی $V\lambda_1$ را یا با قطعه ژنی $V\lambda_1$ یا $V\lambda_3$ متصل کند و قطعه $V\lambda_2$ می‌تواند به $V\lambda_2$ اتصال یابد. در DNA زنجیره سبک K انسان یا موش، هر کدام از قطعات ژنی V_K می‌توانند با هر کدام از قطعات عملکردی ژن J_K متصل شوند.

ژن‌های بازآرایی شده K و λ از سمت ۵' به ۳' به ترتیب زیر می‌باشند: یک اگزون کوتاه رهبر ۵'(L)، توالی غیر کد کننده (اینترون)، یک قطعه اتصال یافته V-J، اینترون دوم و توالی کد کننده ناحیه ثابت. در ناحیه بالا دست هر قطعه ژنی رهبر، یک توالی پیش‌برنده یا پروموتور قرار دارد. توالی بازآرایی شده زنجیره سبک، توسط آنزیم RNA پلیمراز سمت اگزون L تا قطعه C رونویسی می‌شود تا به سیگنال پایان برسد و در نتیجه یک رونوشت اولیه RNA ایجاد می‌شود (شکل ۴-۵).



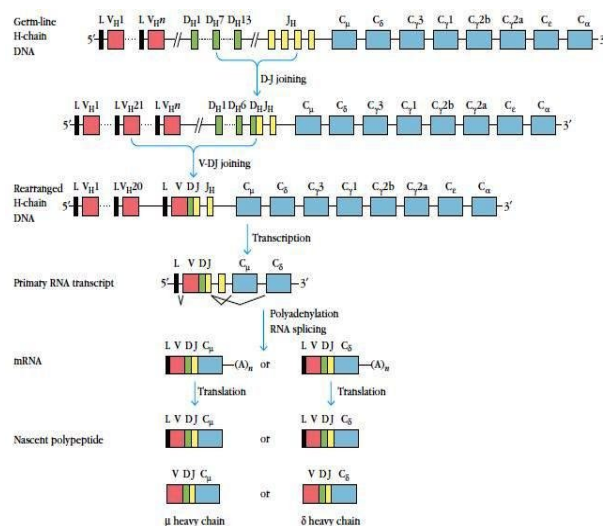
شکل ۴-۵: بازآرایی ژن زنجیره سبک K و وقایع پردازش RNA مستلزم تولید یک پروتئین زنجیره سبک K می باشد. در این مثال، بازآرایی موجب اتصال J_{K4} و V_{K23} می شود.

در رونوشت اولیه، اینترون‌ها توسط آنزیم‌های پردازش کننده RNA حذف شده و mRNA حاصل از هسته خارج می‌شود. mRNA زنجیره سبک به ریبوزوم‌ها چسبیده و به پروتئین زنجیره سبک ترجمه می‌شود. توالی رهبر موجود در انتهای آمینی، موجب هدایت زنجیره پلی‌پپتیدی در حال رشد در لومن شبکه اندوپلاسمی خشن گردیده و سپس تجزیه می‌شود. در نتیجه، این توالی در محصول نهایی یا پروتئین زنجیره سبک حضور ندارد.

DNA زنجیره سنگین دچار بازآرایی V-D-J می‌شود

تولید زنجیره سنگین Ig، به دو فرآیند بازآرایی مجزا در ناحیه متغیر نیاز دارد. همانطور که در شکل ۵-۵ نشان داده شده، ابتدا یک قطعه D_H به J_H اتصال می‌یابد. قطعه D_H-J_H حاصل به قطعه V_H اتصال یافته و واحد $V_H-D_H-J_H$ حاصل می‌شود که کل ناحیه متغیر زنجیره سنگین را کد می‌کند. در DNA زنجیره سنگین، بازآرایی ناحیه متغیر، منجر به شکل‌گیری ژنی می‌گردد که از سمت ۵' خود حاوی توالی‌های زیر می‌باشد. یک اگزون کوتاه رهبر (L)، یک اینترون، یک قطعه VDJ، اینترون دوم، یک سری از قطعات ژنی C. همانند

ژن‌های زنجیره سبک، با فاصله کمی از توالی رهبر هر زنجیره سنگین یک توالی پروموتور به چشم می‌خورد.



شکل ۵-۵: بازآرایی ژن زنجیره سنگین و وقایع پردازش RNA مستلزم تولید یک پروتئین کامل زنجیره سنگین μ یا δ می‌باشد. دو نوع اتصال DNA جهت تولید یک ژن کارآمد زنجیره سنگین نیاز می‌باشند. بیان ژن‌های عملکردی زنجیره سنگین علیرغم مشابهت عمومی آن با بیان ژن‌های زنجیره سبک، مستلزم پردازش RNA می‌باشد که موجب تولید چندین محصول شامل زنجیره‌های سنگین μ و δ می‌باشد. هر یک از ژن‌های C با یک توالی کدکننده خاص مشخص شده است که هر یک به صورت مجموعه‌ای از اگزون‌ها و اینترون‌ها سازمان یافته است.

با اتمام بازآرایی ژن زنجیره سنگین، RNA پلی‌مراز می‌تواند به پروموتور پیوسته و کل ژن را رونویسی کند که شامل اینترون‌ها نیز می‌شود. در ابتدا هم قطعات ژنی $C\mu$ و هم $C\delta$ رونویسی می‌گردند. پلی‌آدنیلایون تمایزی و پیرایش RNA، اینترون‌ها را حذف و mRNA اولیه را پردازش می‌کند تا یک mRNA ایجاد شود که یا $C\mu$ و یا $C\delta$ داشته باشد. این دو mRNA به پروتئین ترجمه شده و پپتید رهبر موجود در پلی‌پپتید خام جدا شده و زنجیره‌های نهایی μ و δ تولید می‌شوند. تولید دو mRNA زنجیره سنگین متفاوت، به یک

سلول B بالغ و صلاحیت دار ایمنی اجازه می‌دهد که هم IgM و هم IgD را که دارای ویژگی‌های آنتی‌ژنی یکسان می‌باشند، بر سطح خود بیان کند.

- مکانیسم بازآرایی DNA ناحیه متغیر

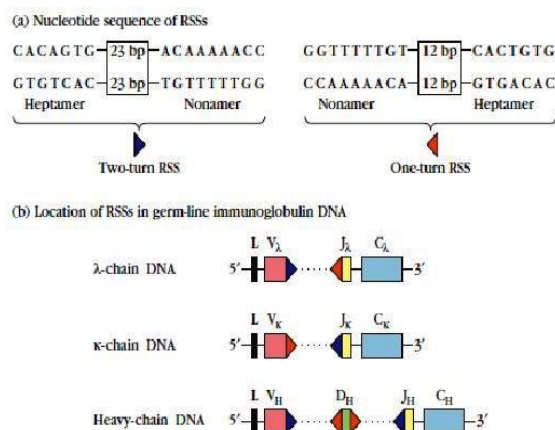
اکنون که نتایج بازآرایی ژنی ناحیه متغیر را با هم مطالعه کردیم، بیایید به طور جزء به جزء به فرآیندی که در طی بلوغ سلول‌های B رخ می‌دهد نگاهی داشته باشیم.

- توالی‌های پیام‌رسان نوترکیبی موجب هدایت نوترکیبی می‌گردند

کشف دو توالی حفاظت شده کاملاً مرتبط با هم در DNA رده زایا و در ناحیه متغیر، راه را برای درک کامل مکانیسم‌های بازآرایی ژن‌ها هموار کرد. مطالعات تعیین توالی DNA حضور توالی‌های پیام‌رسان نوترکیبی^۱ (RSS) را آشکار کرد که در اطراف هر کدام از قطعات ژنی D، V و J حضور داشتند. یک RSS در سر ۳' هر کدام از قطعات ژنی V، ۵' هر کدام از قطعات ژنی J و دو سمت هر قطعه D قرار دارد. این توالی‌ها به عنوان پیام‌هایی برای فرآیند نوترکیبی که ژن‌ها را بازآرایی می‌کند، می‌باشند. RSS شامل یک توالی پالیندرومی حفاظت شده هفت نوکلئوتیدی و یک توالی نه نوکلئوتیدی غنی از AT بوده که توسط یک توالی میانی متشکل از ۲۳-۱۲ جفت باز از یکدیگر جدا می‌شوند (شکل ۶a-۵). این توالی‌های ۱۲ تا ۲۳ جفت بازی به ترتیب با ۱ یا ۲ دور مارپیچ DNA ارتباط داشته و به همین دلیل به نام توالی‌های پیام‌رسان نوترکیبی یک طرفه و دو طرفه نامیده می‌شوند. توالی پیام‌رسان V_K یک جداکننده یک طرفه و توالی پیام‌رسان J_K یک جداکننده دو طرفه دارد. در DNA زنجیره سبک λ ، بر عکس می‌باشد، توالی پیام‌رسان V _{λ} جداکننده دو طرفه و J _{λ} جداکننده یک طرفه دارد. در DNA زنجیره سنگین، قطعات ژنی V_H و J_H جدا

1- Recombination Signal Sequences

کننده‌های دو طرفه دارند و در هر طرف قطعه D_H ، جداکننده‌ها یک طرفه هستند (شکل ۵-۶b).



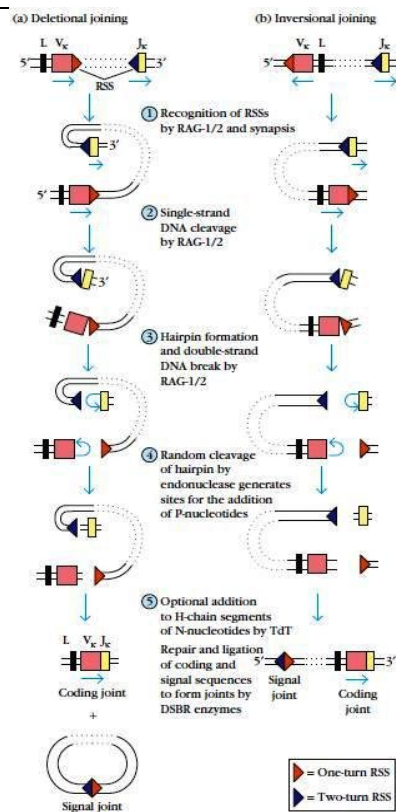
شکل ۵-۶: دو توالی حفاظت شده در DNA زنجیره سبک و سنگین به عنوان توالی‌های پیام‌نوترکیبی (RSSs) عمل می‌کنند. (a) هر دو توالی پیام شامل یک هپتامر پالیندرومی حفاظت شده و نونامر غنی از AT حفاظت شده می‌باشند. این توالی‌ها توسط توالی‌های بینابینی حفاظت نشده ۱۲ یا ۲۳ جفت بازی از یکدیگر جدا می‌شوند. (b) دو نوع RSS با موقعیت مشخص در DNA زنجیره λ و κ و DNA رده زبای زنجیره سنگین وجود دارد. در طی بازآرایی DNA قطعات ژنی مجاور RSS یک پیچ می‌تواند تنها به قطعات مجاور RSS دو پیچ متصل شود.

توالی‌های پیام‌رسانی که جداکننده یک طرفه دارند فقط به توالی‌هایی که جداکننده دو طرفه دارند متصل می‌شوند (قانون اتصال دو طرفه - یک طرفه). این قانون تأکید می‌کند که یک قطعه V_L فقط به J_L متصل شده و به V_L دیگر اتصال نمی‌یابد و همچنین می‌گوید که قطعات V_H ، D_H و J_H در ترتیب نامناسب به هم وصل شده و این که قطعات همسان به هم متصل نمی‌شوند.

- قطعات ژنی توسط آنزیم‌های ریکامبناز به هم اتصال می‌یابند

نوترکیبی V-(D)-J که در اتصالات بین RSS با توالی‌های کد کننده انجام می‌شود، توسط مجموعه‌ای به نام ریکامبناز V(D)J^۱ صورت می‌گیرد. شناسایی این آنزیم‌ها در اواخر دهه ۱۹۸۰ آغاز شد. در سال ۱۹۹۰ شاتز^۲، اوتینگر^۳ و بالتیمور^۴ برای اولین بار **دوژن فعال کننده نوترکیبی**^۵ به نام‌های RAG-1 و RAG-2 را کشف کردند که پروتئین‌های کد شده توسط آنها با یکدیگر همکاری داشتند و برای اتصال V-D-J ضروری بودند. پروتئین‌های RAG-1، RAG-2 تنها محصولات ژنی اختصاصی لنفوئید هستند که در بازآرایی VDJ نقش دارند. نوترکیبی قطعات ژنی ناحیه متغیر شامل مراحل زیر است که توسط مجموعه آنزیم‌های ریکامبناز کاتالیز می‌شوند (شکل ۷-۵):

-
- 1-V(D)J Recombinase
 - 2- David Schatz
 - 3 - Marjorie Oettiger
 - 4 - David Baltimore
 - 5 - Recombination activating genes



شکل ۷-۵: یک مدل شماتیک از روند عمومی نوترکیبی قطعات ژن ایمنوگلوبولین با V_K و J_K (a) اتصال حذفی زمانی رخ می‌دهد که قطعات ژنی متصل شده و جهت نسخه برداری آنها مشابه باشد. این روند موجب تشکیل دو محصول می‌شود. یک واحد V_J بازآرایی شده که شامل اتصال کدکننده بوده و یک محصول حلقوی که شامل توالی‌های پیام نوترکیبی (RSS)، اتصال نشانه و DNA بینابینی می‌باشد. (b) اتصال معکوس زمانی اتفاق می‌افتد که قطعات ژنی جهت نسخه برداری مخالف با یکدیگر دارند. در این مورد RSS اتصال نشانه و DNA بینابینی حاصل شده و جهت یکی از قطعات اتصالی معکوس می‌شود.

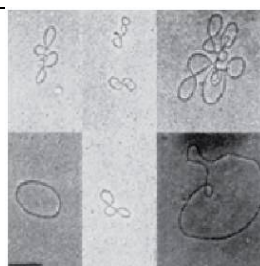
۱- شناسایی توالی‌های پیام رسان نوترکیبی (RSS) توسط ریکامبنازها، که منجر به شکل‌گیری سیناپس‌هایی می‌گردد که در آن، دو توالی پیام‌رسان و توالی‌های کدکننده (قطعات ژنی) کنار یکدیگر قرار می‌گیرند.

- ۲- شکستن یک رشته DNA توسط RAG-1 و RAG-2 در نواحی اتصال توالی‌های پیام‌رسان و کد کننده.
- ۳- واکنشی که توسط RAG-1 و RAG-2 کاتالیز شده و طی آن گروه هیدروکسیل آزاد ۳' در رشته بریده شده، به پیوند فسفودی استری که رشته مکمل را به توالی پیام‌رسان متصل کرده، حمله کرده و یک ساختار سنجاق‌سری در انتهای بریده شده توالی کدکننده ایجاد می‌کند که در سمت ۵' فسفریله شده و ساختار دو رشته‌ای را در توالی پیام‌رسان می‌شکند.
- ۴- بریدن سنجاق‌سر توسط آنزیم اندونوکلاز تک رشته بعد از چند نوکلئوتید از توالی کدکننده به منظور تولید مکان‌هایی برای افزودن نوکلئوتیدهای ناحیه P^۱.
- ۵- افزودن حداکثر ۱۵ نوکلئوتید به نام نوکلئوتیدهای منطقه N^۲ در انتهای بریده شده توالی‌های J، D و V زنجیره سنگین توسط آنزیم داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفر از انتهای^۳.
- ۶- ترمیم و اتصال توالی‌های کدکننده و اتصال توالی‌های پیام‌رسان توسط آنزیم‌های ترمیم کننده شکستگی مارپیچ دو رشته‌ای (DSBR).
- نوثرکیبی منجر به شکل‌گیری اتصالات کدکننده در فواصل بیان توالی‌های کدکننده و یک اتصال پیام‌رسان بین RSSها می‌گردد. جهت نسخه‌برداری قطعات زن که به هم متصل می‌شوند، سرانجام DNA حذف‌فاصل و اتصال پیام‌رسان را تعیین می‌کند. وقتی دو زن در جهت همسان رونویسی قرار داشته باشند، اتصال آنها موجب حذف DNA حذف‌فاصل و اتصال پیام‌رسان به صورت محصول حلقوی می‌گردد (شکل ۸-۵).

1- P-region nucleotides

2- N-region nucleotides

3- terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt)



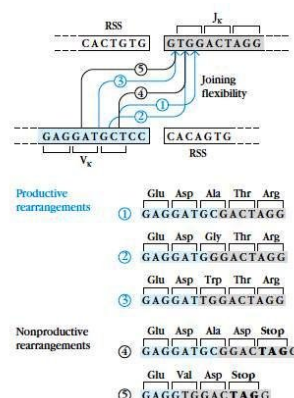
شکل ۸-۵: DNA حلقوی جدا شده از تیموسیت‌ها که TCR را کد می‌کند در فرآیندی مشابه ژن‌های Ig چهار بازآرایی می‌شوند. جداسازی این محصول حلقوی شاهدهی بر سازوکار اتصال حذفی می‌باشد.

به ندرت دو قطعه ژنی در جهت متضاد با یکدیگر قرار دارند. در این حالت، اتصال آنها با معکوس شدن DNA همراه است که منجر به حفظ اتصال کدکننده و اتصال پیام‌رسان (DNA حدواسط) بر روی کروموزوم می‌گردد. در لوکوس ژن کاپا در انسان تقریباً نصف قطعات ژنی V κ در جهت مخالف با J κ قرار داشته و اتصال آنها از طریق معکوس شدن صورت می‌پذیرد.

- بازآرایی‌های ژن Ig ممکن است منجر به تولید محصول نگردد

یکی از ویژگی‌های مهم نوترکیبی قطعات ژنی، تنوع اتصالات کدکننده بوده که بین هر دو قطعه ژنی ایجاد می‌شوند. اگر چه شکستن DNA دو رشته‌ای که موجب آغاز بازآرایی V(D)J می‌شود، دقیقاً در ناحیه اتصال توالی‌های کدکننده و توالی‌های پیام‌رسان صورت می‌گیرد، اتصال بعدی توالی‌های اتصالی دقیق نمی‌باشد. توالی‌های کدکننده V-J و V-(D)-J توسط مکانیسم‌های متعددی ایجاد می‌شود: تنوع در برش ساختار سنجاق‌سر برای افزودن نوکلئوتیدهای P، تنوع در چیدمان توالی‌های کدکننده، تنوع در افزودن نوکلئوتیدهای N و انعطاف‌پذیری در اتصال توالی‌های کدکننده. معرفی تصادفی بودن فرآیند اتصال در توضیح تنوع تولید آنتی‌بادی و جایگاه‌های بسیار متغیر اتصال به آنتی‌ژن، کمک کننده می‌باشد (این پدیده با جزئیات بیشتر در فصل ایجاد تنوع آنتی‌بادی شرح داده خواهد شد).

نتیجه دیگر اتصالات غیر دقیق این است که ممکن است قطعات ژنی خارج از چارچوب به هم متصل شوند و در نتیجه قالب خواندن سه تایی برای ترجمه حفظ نشود. چنین بازآرایی بدون محصولی ممکن است دارای کدون‌های پایانی زیادی شوند که با اختلال در ترجمه همراه می‌باشد (شکل ۹-۵).

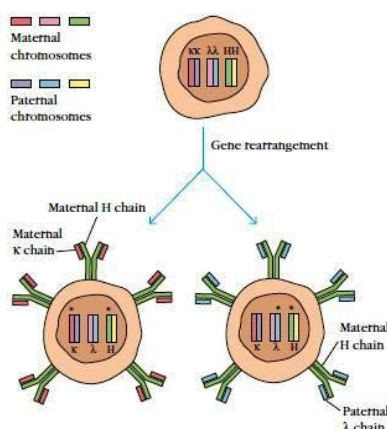


شکل ۹-۵: انعطاف پذیری اتصالات در قطعات ژنی Ig که در مورد V_J و V_K نشان داده شده است. اتصال قالب ۱، ۲ و ۳ موجب تشکیل یک قطعه بازآرایی شده می‌شود که می‌تواند به پروتئین ترجمه شود. اتصال خارج از قالب ۴ و ۵ منجر به تشکیل قطعات بازآرایی شده ناکارآمد شده که حاوی کدون‌های پایان بوده و به پروتئین ترجمه نمی‌شود.

وقتی قطعات ژنی در چارچوب خود به هم اتصال می‌یابند، قالب خواندن نیز ثابت می‌ماند که واحد VJ و V-(D)-J منجر به تولید یک آنتی‌بادی کامل می‌گردد. اگر یک آلل طوری بازآرایی شود که فاقد محصول باشد، سلول B ممکن است هنوز قادر به بازآرایی آلل دیگر باشد تا به تولید محصول بیانجامد. اگر یک ژن زنجیره سبک و زنجیره سنگین بازآرایی شده تولید نشود. سلول B دچار آپوپتوز شده و می‌میرد. تخمین زده می‌شود که تنها یکی از سه اتصال V_L-J_L و فقط یکی از سه اتصال V_H-D_H-J_H محصول تولید می‌کنند. در نتیجه کمتر از $\frac{1}{9}$ (۱۱٪) سلول‌های اولیه Pre-B در مغز استخوان به بلوغ می‌رسند و مغز استخوان را به صورت سلول B صلاحیت دار ایمنی ترک می‌کنند.

- حذف آلی تأمین کننده ویژگی آنتی ژنی می‌باشد

سلول‌های B همانند سایر سلول‌های پیکره‌ای دیپلوئید بوده و شامل کروموزوم‌های پدری و مادری می‌باشند. هر چند که ژن‌های بازآرایی شده زنجیره سنگین را تنها از یک کروموزوم و ژن‌های بازآرایی شده زنجیره سبک را نیز تنها از یک کروموزوم بیان می‌کنند. فرآیندی که توسط آن، این عمل صورت می‌گیرد **حذف آلی**^۱ بوده و تضمین کننده این است که سلول‌های B عملکردی هیچ‌گاه دارای بیشتر از یک واحد $V_H-D_H-J_H$ و یک V_L-J_L نمی‌باشند (شکل ۱۰-۵).



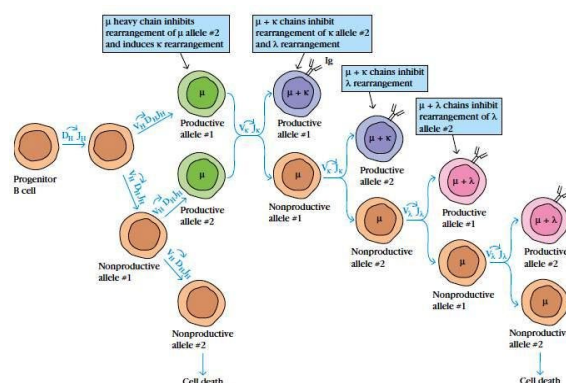
شکل ۱۰-۵: به علت حذف آلی، تنها زنجیره‌های سبک و سنگین Ig از یک کروموزوم والدی بیان می‌شود. این فرآیند موجب می‌شود تا سلول‌های B یک ویژگی آنتی ژنی داشته باشند. آلل انتخابی برای بازآرایی، به صورت تصادفی انتخاب می‌شود.

البته این امر برای اختصاصیت آنتی ژنی سلول‌های B ضروری است زیرا بیان هر دو نوع آلل موجب چند ویژگی شدن سلول B می‌گردد. پدیده حذف یا انحصار آلی پیشنهاد می‌کند که وقتی یک بازآرایی $V_H-D_H-J_H$ محصول‌دار و یک بازآرایی V_L-J_L محصول‌دار رخ

1- Allelic exclusion

می‌دهد، دستگاه نوترکیبی خاموش شده و در نتیجه ژن‌های زنجیره سبک و سنگین روی کروموزوم‌های همولوگ بیان نمی‌شوند.

یانکوپلوس^۱ و آلت^۲ مدلی برای توضیح انحصار آلی ارائه کردند (شکل ۵-۱۱).



شکل ۵-۱۱: مدل حذف آلی. در ابتدا بازآرایی ژن‌های زنجیره سنگین صورت می‌گیرد و یک بازآرایی کارآمد ژن زنجیره سنگین رخ می‌دهد. محصول پروتئینی μ مانع از بازآرایی سایر آلل‌های زنجیره سنگین شده و موجب شروع بازآرایی ژن‌های زنجیره سبک می‌شود.

آنها پیشنهاد کردند، وقتی بازآرایی منجر به تولید محصول گردد، پروتئین کد شده توسط آن بیان گردیده و حضور پروتئین به عنوان یک پیام برای جلوگیری از بازآرایی ژن عمل می‌کند. بر طبق مدل آنها، حضور پیام‌های زنجیره سنگین μ موجب خاموش شدن بازآرایی در آلل دیگر زنجیره سنگین در سلول‌های B در حال بلوغ و روشن شدن بازآرایی ژن زنجیره سبک κ می‌گردد. در صورتی که بازآرایی منجر به محصول در ژن زنجیره سبک κ رخ می‌دهد، زنجیره κ تولید شده و همراه با زنجیره سنگین μ یک آنتی‌بادی کامل را شکل می‌دهد. حضور این آنتی‌بادی، بازآرایی ژن دیگر زنجیره سبک را خاموش می‌کند. در صورتی که بازآرایی ژن‌های κ در هر دو آلل فاقد محصول باشند، بازآرایی ژن‌های زنجیره

1- G.D.Yancopoulos

2- F.W.Alt

λ آغاز می‌شود. اگر هیچ کدام از آلل‌های λ نیز محصول نداشته باشند سلول‌های B بالغ نشده و در اثر آپوپتوز از بین می‌روند.

- ایجاد تنوع آنتی‌بادی

با کشف سازمان یابی ژن‌های ایمونوگلوبولین، منشاء تنوع گسترده ناحیه متغیر نیز شروع به مشخص شدن کرد. نظریه رده زایا که قبلاً بیان شد، در این خصوص بحث می‌کند که کلی ذخیره ناحیه متغیر در رده زایای ارگانسیم کد شده و از طریق سلول‌های زایا (تخمک و اسپرم) از والدین به فرزندان منتقل می‌شود. نظریه تنوع پیکره‌ای بیان می‌کند که رده زایا حاوی تعداد محدودی از ژن‌های ناحیه متغیر است که در سلول‌های پیکره‌ای، طی تکامل سیستم ایمنی، وقایع نوترکیبی و جهش دارای تنوع می‌گردند. با کلون کردن و تعیین توالی ژن‌های Ig، هر دو نظریه فوق تا حدی توجیه گردیدند. تاکنون ۷ روش برای ایجاد تنوع آنتی‌بادی در انسان و موش شناسایی شده‌اند:

- قطعات چندگانه ژنی در رده زایا
- اتصال ترکیبی V-(D)-J
- انعطاف پذیری اتصال
- افزودن نوکلئوتیدهای ناحیه P
- افزودن نوکلئوتیدهای ناحیه N
- هایپر موتاسیون سوماتیک
- همراهی ترکیبی زنجیره‌های سبک و سنگین

اگر چه میزان دقیق مداخله هر کدام از این عوامل در تنوع کلی آنتی‌بادی مشخص نمی‌باشد ولی آنها به طور چشم‌گیری در تعداد بی‌شماری از آنتی‌بادی‌هایی که سیستم ایمنی پستانداران قادر به تولید آنها می‌باشد، شرکت دارند.

- در رده زایا قطعات D، V و J متعددی وجود دارد

کشف قطعات ژنی D، V و J عملکردی در DNA انسان مشخص کرده که تعداد ۴۸ قطعه V_H ، ۲۳ قطعه D، ۶ قطعه JH و ۴۱ قطعه V_K ، ۳۴ قطعه V_L و ۵ قطعه J_L وجود دارد. علاوه بر این قطعات عملکردی، در برخی مطالعات میدانی که به منظور تعیین توالی DNA صورت گرفتند، در لوکوس ایمونوگلوبولین، تعدادی ژن کاذب نیز مشاهده شده‌اند. با وجودی که تعداد این قطعات ژنی در موش نسبت به انسان با دقت کمتری محاسبه شده‌اند. مشخص شده که تعداد قطعات ژنی زنجیره سنگین ۱۳۴ قطعه V_H ، ۴ قطعه J_H و ۱۳ قطعه D و در مورد قطعات V_K ، J_K ، V_L و V_L به ترتیب ۸۵، ۴، ۳ و ۳ قطعه می‌باشد. اگر چه تعداد ژن‌های رده زایای یافت شده در انسان یا موش کمتر از مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل رده زایا می‌باشند.

اتصال V-D-J و V-J تنوع ایجاد می‌کند

بازآرایی تصادفی قطعات ژنی رده زایا منجر به ایجاد تنوع در سلول‌های پیکره‌ای می‌گردد (جدول ۲-۵).

ترکیب هر یک از ۴۸ قطعه V_H با هریک از ۲۳ قطعه DH و ۶ قطعه JH در انسان منجر به تنوع قابل توجهی ($6624 = 48 \times 23 \times 6$ حالت ممکن) در ژن زنجیره سنگین خواهد شد. به طور مشابه به اتصال تصادفی ۳۴ قطعه V_L با ۵ قطعه J_L تا ۱۷۰ ترکیب ممکن را ایجاد خواهد کرد و این تعداد در مورد لوکوس K، ۲۰۵ ترکیب مختلف می‌باشد، توجه به این نکته ضروری است که این اعداد حداقل محاسبات برای پی‌بردن به تعداد تنوع می‌باشند که همراه با انعطاف‌پذیری اتصالی، افزودن نوکلئوتیدهای P و N که قبلاً به آنها اشاره شد و به خصوص هایپر موتاسیون سوماتیک که در ادامه شرح داده خواهد شد، همراه با یکدیگر در تنوع گسترده آنتی‌بادی دخالت دارند.

TABLE 5-2 Combinatorial antibody diversity in humans and mice

Multiple germ-line segments	Heavy chain	LIGHT CHAINS	
		κ	λ
ESTIMATED NUMBER OF SEGMENTS IN HUMANS*			
V	48	41	34
D	23	0	0
J	6	5	5
Combinatorial V-D-J and V-J joining (possible number of combinations)	$48 \times 23 \times 6 = 6624$	$41 \times 5 = 205$	$34 \times 5 = 170$
Possible combinatorial associations of heavy and light chains†	$6624 \times (205 + 170) = 2.48 \times 10^6$		+
ESTIMATED NUMBER OF SEGMENTS IN MICE*			
V	134	85	2
D	13	0	0
J	4	4	3
Combinatorial V-D-J and V-J joining (possible number of combinations)	$101 \times 13 \times 4 = 5252$	$85 \times 4 = 340$	$2 \times 3 = 6$
Possible combinatorial associations of heavy and light chains†	$5252 \times (340 + 6) = 1.82 \times 10^6$		

*These numbers have been determined from studies of single subjects; slight differences may be seen among different individuals. In the cases of both human and mouse, only the functional gene segments have been listed. The genome contains additional segments that are incapable of rearrangement or contain stop codons or both.

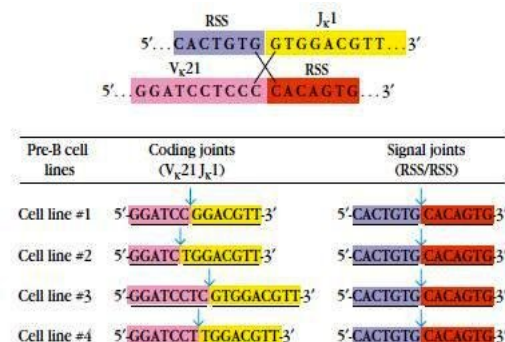
†Because of the diversity contributed by junctional flexibility, P-region nucleotide addition, N-region nucleotide addition, and somatic mutation, the actual potential exceeds these estimates by several orders of magnitude.

*These numbers have been determined from studies of single subjects; slight differences may be seen among different individuals. In the cases of both human and mouse, only the functional gene segments have been listed. The genome contains additional segments that are incapable of rearrangement or contain stop codons or both.

[†]Because of the diversity contributed by junctional flexibility, P-region nucleotide addition, N-region nucleotide addition, and somatic mutation, the actual potential exceeds these estimates by several orders of magnitude.

- انعطاف‌پذیری اتصالی بر میزان تنوع می‌افزاید

تنوع ایجاد شده در اثر ترکیب‌های مختلف V, D, J, توسط پدیده‌ای به نام **انعطاف‌پذیری اتصالی** بیان می‌شود. همانطور که قبلاً بیان شد، نوترکیبی شامل اتصال توالی‌های پیام‌رسان برای ایجاد یک اتصال پیام‌رسان و اتصال توالی‌های کدکننده برای ایجاد یک اتصال کدکننده می‌باشد (شکل ۵-۷). اگر چه توالی‌های پیام‌رسان همیشه با دقت به هم اتصال می‌یابند اما اتصال توالی‌های کدکننده دقیق نمی‌باشند. برای مثال در یک مطالعه، اتصال توالی‌های کدکننده J κ 21 و J κ 1 در چندین رده سلولی Pre-B مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مشخص شد که توالی‌های پیام‌رسان و کدکننده از نظر دقت اتصال با یکدیگر تفاوت داشتند (شکل ۵-۱۲).



شکل ۱۲-۵: شواهد آزمایشگاهی از انعطاف پذیری اتصالی در بازآرایی ژن Ig. توالی های نوکلئوتیدی کد کننده بین V_κ21 و J_κ1 و توالی های پیام متناظر با آنها در چهار رده سلول پیش ساز B تعیین شده است. ثبات و پایداری توالی در جایگاه های اتصال نشانه و تغییرپذیری توالی ها در اتصالات کد کننده نشان داده شده است.

همانطور که قبلاً عنوان شد، انعطاف پذیری اتصالی ممکن است به بازآرایی های بدون محصول منجر شود اما می تواند محصول نیز تولید کند که اسید آمینه جایگزینی را رمز کند (شکل ۹-۵). در نتیجه تنوع آنتی بادی افزایش می یابد. تنوع آنتی بادی و اسید آمینه که در اتصالات کد کننده و در نتیجه انعطاف پذیری اتصال ایجاد می شود در سومین ناحیه مکمل تعیین کننده (CDR3) قرار می گیرند (جدول ۳-۵). از آنجایی که CDR3 معمولاً نقش مهمی در جایگاه اتصال به آنتی ژن مولکول آنتی بادی بازی می کند، تغییرات اسید آمینه در این ناحیه که توسط انعطاف پذیری اتصالی حاصل می شود، در شکل گیری تنوع آنتی بادی از اهمیت بالایی برخوردار است.

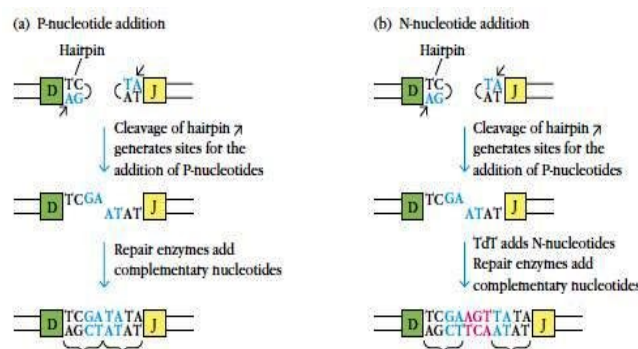
- افزودن نوکلئوتیدهای P موجب تنوع در توالی های پالنیدرومی می شود

بعد از شکسته شدن تک رشته DNA در ناحیه اتصال قطعه ژنی ناحیه متغیر و توالی پیام رسان، نوکلئوتیدهای انتهای توالی کد کننده برمی گردند تا ساختار سنجاق سری تشکیل شود (شکل ۷-۵). این ساختار سنجاق سر، بعداً توسط یک اندونوکلاز جدا می گردد. این

برش دوم ممکن است موجب باقی ماندن یک تک رشته کوتاه در انتهای توالی کدکننده گردد. افزودن نوکلئوتیدهای مکمل به این رشته توسط آنزیم‌های تعمیرکننده موجب شکل‌گیری یک توالی پالیندرومی می‌گردد و به همین خاطر این عمل را **افزودن نوکلئوتیدهای P** می‌نامند (شکل ۱۳a-۵). تنوع در جایگاه بریده شدن ساختار سنجاق‌سر منجر به تنوع در توالی نواحی کدکننده می‌گردد.

– افزودن نوکلئوتیدهای N موجب تنوع چشمگیری می‌شود

اتصالات کدکننده ناحیه متغیر ژن بازآرایی شده زنجیره سنگین حاوی توالی‌های کوتاه اسید آمینه‌ای هستند که توسط قطعات ژنی D, V و J کد نمی‌شوند. این اسید آمینه‌ها توسط نوکلئوتیدهایی کد می‌شوند که طی فرآیند اتصال V به D-J یا D به J توسط آنزیم TdT آنها اضافه می‌گردد (شکل ۱۳b-۵).



شکل ۱۳-۵: اضافه شدن نوکلئوتید N و نوکلئوتید P در طی فرآیند الحاق. (a) در اکثر موارد، شکست حاصل از این توالی‌ها موجب ایجاد یک انتهای تک رشته ای می‌شود. در پی روند ترمیم، نوکلئوتیدهای مکمل تحت عنوان نوکلئوتید P اضافه شده تا این که توالی‌های پالیندرومی تولید شوند. در این مثال، ۴ جفت باز در اتصال کدکننده نشان داده شده است که در نتیجه اضافه شدن نوکلئوتید P می‌باشد. (b) در کنار این اضافه شدن نوکلئوتید P، اضافه شدن نوکلئوتید N تصادفی توسط TdT نیز ممکن است در پی اتصال توالی‌های کدکننده زنجیره سنگین رخ دهد.

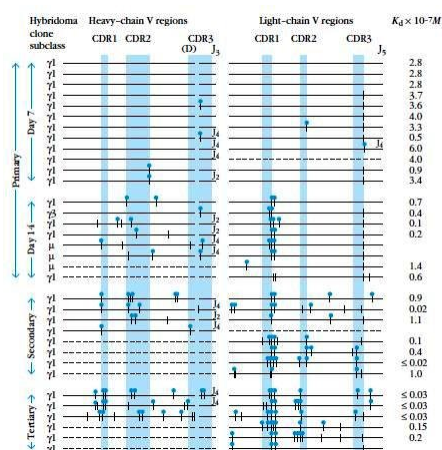
قادر است تا ۱۵ نوکلئوتید را به اتصالات D_H-J_H و $V_H-D_HJ_H$ اضافه کند. در نتیجه یک ناحیه متغیر زنجیره سنگین کامل توسط یک واحد $V_HND_HNJ_H$ کد می‌گردد. تنوع حاصل از افزودن نوکلئوتیدهای N در زنجیره سنگین تقریباً زیاد می‌باشد به دلیل این که نواحی N شامل توالی‌های کاملاً تصادفی بوده و بدلیل این که این تنوع در مفاصل کد کننده $V-D-J$ رخ می‌دهد، نواحی $CDR3$ زنجیره سنگین را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

- هایپر موتاسیون سوماتیک موجب تنوع قطعات بازآرایی شده می‌گردد.

تاکنون تمامی تنوع‌های توضیح داده شده در مورد آنتی‌بادی مربوط به مکانیسم‌هایی بودند که طی شکل‌گیری مناطق متغیر اختصاصی و توسط بازآرایی ژن‌ها ایجاد می‌شدند. یک نوع دیگری از مکانیسم‌های ایجاد تنوع وجود دارد که در واحدهای بازآرایی شده ژن ناحیه متغیر ایجاد می‌شود و طی روندی به نام **هایپر موتاسیون سوماتیک**^۱ شکل می‌گیرد. نتیجه عمل هایپر موتاسیون سوماتیک جایگزینی نوکلئوتیدهای موجود در واحدهای VJ یا VDJ با انواع جایگزین می‌باشد و در نتیجه ویژگی ایمنوگلوبولین کد شده تغییر خواهد کرد. در حالت طبیعی، هایپر موتاسیون سوماتیک تنها در مراکز زایا رخ می‌دهد (فصل ۱۱). این مراکز ساختارهایی هستند که طی یک هفته یا بیشتر پس از ایمنونیزاسیون در اعضای لنفاوی ثانویه ایجاد می‌شوند و پاسخ‌های سلول B وابسته به T را تحریک می‌کنند. هدف هایپر موتاسیون سوماتیک، توالی DNA موجود در ناحیه متغیر بازآرایی شده می‌باشد که حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتید داشته و کل قطعه VJ یا VDJ را در بر می‌گیرد. فراوانی رخ دادن هایپر موتاسیون سوماتیک در هر بار نزدیک 10^{-3} در هر جفت باز می‌باشد. این مقدار حداقل صدهزار برابر بیشتر از جهش‌های خودبه‌خودی در سایر ژن‌ها بوده و به همین دلیل لفظ هایپر موتاسیون برای آن به کار برده می‌شود. از آنجایی که طول ژن‌های نواحی متغیر

1- somatic hypermutation

زنجیره سبک و سنگین حدود ۶۰۰ جفت باز می‌باشد انتظار می‌رود که در هر دو تقسیم سلولی حداقل شاهد یک جهش در ژن‌های V_H و V_L کد کننده آنتی‌بادی باشیم.



شکل ۱۴-۵: شواهد تجربی از جهش سوماتیک در نواحی متغیر ژن‌های ایمونوگلوبولین.

در هایپرمتاسیون سوماتیک به جای حذف و اضافه شدن نوکلئوتیدها بیشتر شاهد جایگزینی نوکلئوتیدی هستیم. عمل جایگزینی نوکلئوتیدها در هایپرمتاسیون سوماتیک به صورت تصادفی است ولی کاملاً تصادفی نمی‌باشد. توالی‌های نوکلئوتیدی مشخص و همچنین توالی‌های پالیندرومی بیشتر مستعد هایپرمتاسیون سوماتیک می‌باشند که نقاط داغ خوانده می‌شوند.

هایپرمتاسیون سوماتیک در قطعات VJ و VDJ رخ می‌دهد ولی در سلول‌های B بالغ این پدیده در توالی‌های CDR مناطق V_H و V_L تجمع می‌یابد که در نهایت میل ترکیبی کلی آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پس از برخورد با آنتی‌ژن، آن دسته از سلول‌های B که پذیرنده‌هایی با میل ترکیبی بیشتری دارند، برای بقا انتخاب می‌گردند.

نتیجه این انتخاب، افزایش میل ترکیبی آنتی ژن در جمعیت سلول‌های B خواهد بود. کل این روند، **بلوغ میل پیوندی**^۱ نامیده شده که در مراکز زایا به وقوع می‌پیوندد.

- آخرین مرحله ایجاد تنوع، ارتباط ترکیبی زنجیره‌های سبک و سنگین می‌باشد

در اثر بازآرایی مناطق متغیر، پتانسیل ایجاد ۶۶۲۴ ژن زنجیره سنگین و ۳۷۵ ژن زنجیره سبک وجود خواهد داشت. در صورتی که هر کدام از ژن‌های فوق به صورت تصادفی و همزمان با یکدیگر در یک سلول واحد شکل گیرند، از ترکیب شدن آنها ۲۴۸۴۰۰۰ حالت ترکیبی مختلف می‌توانند ایجاد شوند. این عدد احتمالاً از مقدار ایجاد شده توسط تنوع ترکیبی بیشتر می‌باشد، بدلیل این که کلیه قطعات V_L و V_H با یکدیگر جفت نمی‌شوند. به علاوه روند نوترکیبی کاملاً تصادفی نمی‌باشد و تمامی قطعات ژنی V_H ، D یا V_L با فراوانی یکسان، به کار برده نمی‌شوند. برخی از آنها همیشه به کار می‌روند، برخی بعضی اوقات و برخی دیگر اصلاً کاربرد ندارند. با وجودی که محاسبه دقیق تعداد جایگاه‌های اتصال آنتی‌بادی که سیستم قادر به ایجاد آنها می‌باشد، مشکل است ولی، ما می‌دانیم که این مقدار نسبتاً زیاد می‌باشد. بدلیل این که تعداد بسیار زیادی از توالی‌های جدید که در اثر انعطاف‌پذیری اتصال، افزودن نوکلئوتیدهای N و افزودن P در سومین CDR جای می‌گیرند، ساختار جایگاه اتصال آنتی‌بادی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر این منابع ایجاد تنوع در آنتی‌بادی، پدیده هایپر موتاسیون سوماتیک پس از تحریک آنتی‌ژنی نیز در گنجینه آنتی‌بادی‌ها تأثیر گذار می‌باشد.

- تنوع ژن ایمونوگلوبولین در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد

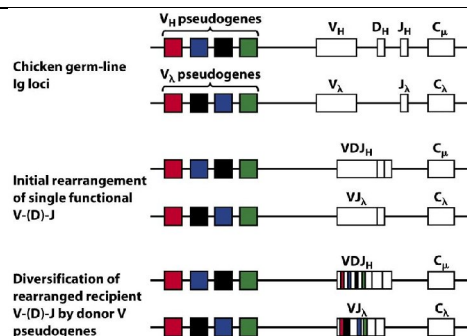
گنجینه ابتدایی ژن‌های ایمونوگلوبولین در انسان و موش به صورت پیکره‌ای و در اثر بازآرایی ترکیبی قطعات V ، (D) و J که در ژنوم رده زایا حضور دارند، ایجاد می‌شود. علاوه

1- affinity maturation

بر آن، این گنجینه اولیه در انسان و موش اغلب در مغز استخوان شکل می‌گیرد. در سایر مهره‌داران مسیری جدا از این الگو به چشم می‌خورد. در گوسفند، پرندگان، خرگوش، گاو و برخی دیگر از گونه‌ها، بیشتر این روند کلیدی در بافت‌های لنفاوی مرتبط با روده (GALT) رخ می‌دهد. همچنین گونه‌های متعددی وجود دارند که از مکانیسم‌هایی به غیر از (یا علاوه بر) بازآرایی ترکیبی ژن‌های V ، (D) و J در رده زایا، جهت ایجاد گنجینه اولیه ژن‌های آنتی‌بادی بهره می‌برند. دو تفاوت عمده میان سایر گونه‌های متعدد و انسان و موش به چشم می‌خورد. اول این که در بسیاری از گونه‌ها تنها یک یا تعداد کمی بازآرایی در ژن‌های $V(D)J$ صورت می‌گیرد که با تعداد زیاد بازآرایی‌های ژنی در انسان و موش تناقض دارد. دوم، پدیده هایپر‌موتاسیون سوماتیک و پدیده‌ای دیگر به نام معکوس شدن ژن، در سایر گونه‌ها به منظور ایجاد تنوع گسترده در ژن‌های بازآرایی شده به کار می‌روند و این در حالی است که در انسان و موش گنجینه ابتدایی ژن‌های بازآرایی شده توسط هایپر‌موتاسیون سوماتیک و معکوس شدن ژن، دچار تنوع بیشتر نخواهد گردید. طی عمل **معکوس شدن ژن**^۱، که یک مورد خاص از موتاسیون سوماتیک می‌باشد، بخشی از یک توالی ژنی به عنوان گیرنده عمل کرده و قطعه متناظر خود را از توالی دهنده دریافت می‌کند. در این روش، ژن دهنده که توالی خود را حفظ کرده است به عنوان الگویی برای معکوس شدن بخشی از توالی گیرنده عمل می‌کند. در حقیقت، معکوس شدن ژن که فقط میان ژن‌های بسیار مشابه (تشابه بیش از ۸۰٪) رخ می‌دهد. گاهی اوقات **موتاسیون سوماتیک دارای الگو**^۲ خوانده می‌شود. در مرغ‌ها، رده زایا تنها حاوی یک ژن عملکردی V_L ، V_H و $J-D$ بوده که می‌تواند بازآرایی گردد و تعداد بسیاری از ژن‌های کاذب که در بالا دست V_H و V_L قرار داشته و نمی‌توانند بازآرایی شوند (شکل ۱۵-۵).

1- gene conversion

2- templated somatic mutation



شکل ۱۵-۵: تنوع ایمونوگلوبولینی در جوجه توسط تبدیل ژنی رخ می دهد. در رده زایای جوجه، ژن های Ig کارآمد V_H و V_K قبل از ژن های کاذب قرار گرفته اند و بازآرایی این ژن ها موجب تشکیل یک V-D-J کارآمد می شود. تبدیل ژنی موجب تنوع در قطعات V ژن های بازآرایی شده V-D-J به همراه ژن های کاذبی می باشد که به صورت الگویی در بالادست ناحیه V قرار دارند.

در پی بازآرایی این ژن های محدود توسط RAG که منجر به تشکیل یک واحد V(D)J می گردد، سلول های B مرغ به عضوی به نام کیسه بورسا که بخشی از GALT در پرندگان می باشد، مهاجرت می کنند. در ریز محیط تخصص یافته بورسا، سلول های B به سرعت تکثیر یافته و معکوس شدن ژنی گسترده موجب ایجاد تنوع در ژن های بازآرایی شده ایمونوگلوبولین خواهد شد. تعداد زیاد ژن های کاذبی که در بالا دست قرار دارند به عنوان دهنده قطعات کوتاه برای ژن های گیرنده که همان V(D)J بازآرایی شده هستند عمل می کنند. همانطور که در شکل ۱۵-۵ نشان داده شده، ژن های کاذب متعددی می توانند به عنوان دهنده برای یک ژن منفرد V(D)J عمل کنند و موجب اصلاح توالی های رده زایا در چندین منطقه گردند. علاوه بر معکوس شدن ژن، هایپرمتاسیون سوماتیک نیز در مرغ ها دیده می شود.

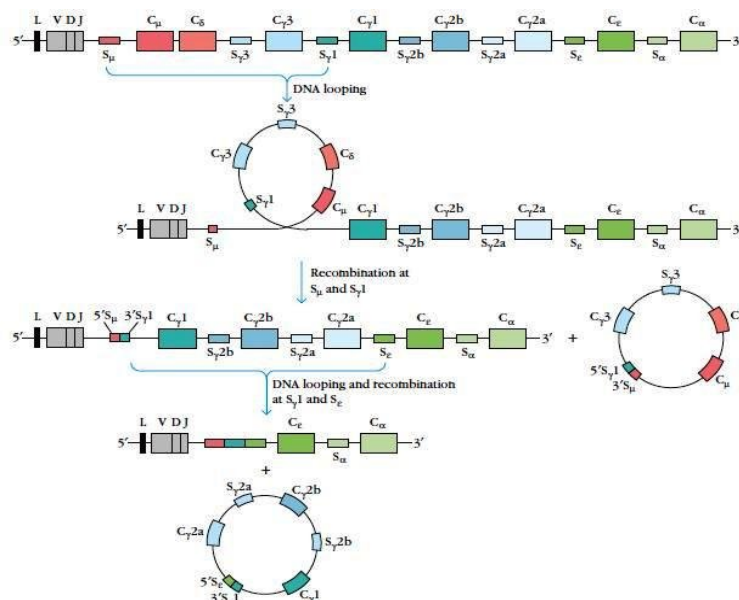
خرگوش ها نیز عمل بازآرایی ژنی را در تعداد کمی از ژن های V_H زنجیره سنگین انجام می دهند و گنجینه آنتی بادی خود را با معکوس شدن ژنی و هایپرمتاسیون سوماتیک، تنوع می بخشند. این عمل در خرگوش ها همانند پرندگان در GALT و خصوصاً در ریز محیط های

تخصص یافته آپاندیس صورت می‌گیرد. نشخوارکنندگانی مثل گاو و گوسفند گنجینه آنتی‌بادی خود را توسط هایپر‌موتاسیون سوماتیک در پلاک‌های پیرروده که نوعی از GALT می‌باشند، متنوع می‌کنند.

- تغییر کلاس در ژن‌های ناحیه ثابت

پس از تحریک آنتی‌ژنی یک سلول B، DNA زنجیره سنگین ممکن است تحت بازآرایی قرار گیرد به طوری که واحد $V_H D_H J_H$ بتواند با هر کدام از قطعات ژنی C_H ترکیب گردد. مکانیسم دقیق این فرآیند که **تغییر کلاس** یا **تغییر ایزوتایپ** خوانده می‌شود، مشخص نمی‌باشد، ولی در این روند توالی‌هایی از DNA که ۲ تا ۳ کیلوباز در بالادست هر کدام از قطعات C_H (به غیز از $C\delta$) قرار داشته و نواحی سویچ^۱ خوانده می‌شوند، دخالت دارند. این نواحی سویچ علیرغم بزرگ بودن (۲ تا ۱۰ کیلوباز) از تکرار توالی‌های کوچک (GAGCT) (TGGGG) حاصل می‌شوند. یک فرضیه وجود دارد و آن این است که یک پروتئین یا مجموعه‌ای از پروتئین‌ها که ریکامیناز سویچ را تشکیل می‌دهند، این تکرارها را شناسایی کرده و پس از اتصال، عمل نوترکیبی DNA را انجام می‌دهند که منجر به تغییر کلاس می‌گردد. پروتئین‌های تنظیمی داخل سلولی که با عنوان سایتوکاین‌ها شناخته می‌شوند، به عنوان فاکتور سویچ عمل کرده و نقش‌های اصلی را در تعیین کلاس خاصی از ایمونوگلوبولین که در نتیجه تغییر کلاس، تولید و بیان می‌گردد، برعهده دارند. برای مثال، اینترلوکین ۴ (IL-4) موجب تغییر کلاس از $C\mu$ به $C\gamma 1$ یا $C\epsilon$ می‌گردد. در برخی موارد، مشاهده شده که IL-4 ابتدا موجب تغییر کلاس از $C\mu$ به $C\gamma 1$ و سپس از $C\gamma 1$ به $C\epsilon$ می‌گردد (شکل ۵-۱۶).

1- switch regions



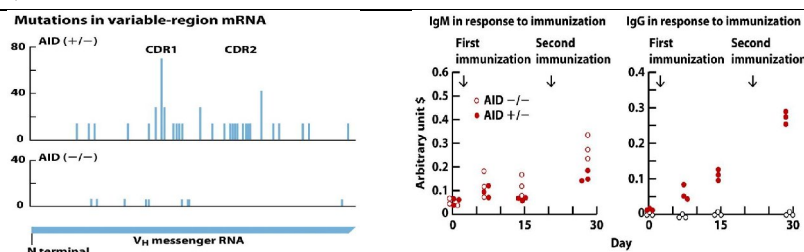
شکل ۱۶-۵: مکانیسم پیشنهادی تعویض رده القا شده توسط IL-4 در زنجیره های سنگین بازآرایی شده Ig. یک جایگاه تعویض در بالادست هر یک از قطعات C_H به جز قطعه C_δ قرار گرفته است. تشکیل محصولات حلقوی شامل بخش هایی از جایگاه های تعویض حاکی از آن است که IL-4 موجب القای تعویض رده متوالی از C_μ به $C_{\gamma 1}$ و $C_{\gamma 1}$ می شود.

آزمایش محصولات خروجی DNA، که طی تغییر کلاس از C_μ به $C_{\gamma 1}$ ایجاد می شوند، نشان می دهد که یک محصول حلقوی که حاوی C_μ همراه با انتهای ۵' ناحیه سویچ $\gamma 1$ ($S_{\gamma 1}$) و انتهای ۳' ناحیه سویچ μ (S_μ) می باشد، ایجاد می شود. به علاوه، تغییر کلاس از $C_{\gamma 1}$ به C_ϵ یک محصول حلقوی تولید می کند که شامل $C_{\gamma 1}$ همراه با قسمت هایی از نواحی سویچ μ ، γ و ϵ می باشد. در مجموع تغییر کلاس به تقابل چهار عنصر وابسته می باشد، نواحی سویچ، یک ریکامبنیاز سویچ، پیام سایتوکاین که ایزوتایپ تولید شده توسط سلول B را تعیین کند و آنزیمی که سیتیدین دامیتاز القا شده در اثر فعالیت (AID) نامیده می شود و نقش حیاتی آن در قسمت بعد شرح داده خواهد شد. توضیح کاملتر نقش سایتوکاین ها در تغییر کلاس در فصل ۱۱ بررسی خواهد شد.

AID - واسطه هایپر موتاسیون سوماتیک و تغییر کلاس می‌باشد

در این بخش سه نوع مختلف ایجاد تغییر در ژن‌های ایمونوگلوبولین در انسان و موش، عرضه شده است: نوترکیبی $V(D)J$ ، هایپر موتاسیون سوماتیک و نوترکیبی تغییر کلاس. (توضیح معکوس شدن ژن در بخش دیگری آورده شده است.) بازآرایی و دسته‌بندی قطعات ژنی رده زایا طی نوترکیبی $V(D)J$ یک ژن ایمونوگلوبولین عملکردی را ایجاد می‌کند. هایپر موتاسیون سوماتیک، ناحیه متغیر ژن‌های ایمونوگلوبولین را تغییر می‌دهد که قادر خواهد بود تا خصوصیات اتصال به آنتی‌ژن را در ایمونوگلوبولینی که کد می‌کند را تحت تأثیر قرار دهد. نوترکیبی تغییر کلاس به یک واحد $V(D)J$ مشخص این امکان را می‌دهد تا با نواحی ثابت مختلف ترکیب گردد و عملکرد مولکول Ig را تعیین کند. ژن‌های فعال کننده بازآرایی $RAG1$ و $RAG2$ مسئول نوترکیبی $V(D)J$ می‌باشند. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که آنزیم AID یا سیتیدین دآمیناز القا شده در اثر فعالیت^۱ میانجی اصلی هایپر موتاسیون سوماتیک، معکوس شده ژن و نوترکیبی تغییر کلاس می‌باشد. AID به خانواده‌ای از آنزیم‌ها تعلق دارد که آنزیم‌های ویرایش کننده RNA خوانده می‌شوند. AID، سیتوزین‌های مشخصی را در mRNAهای خاصی دآمین می‌کند و آنها را به یوراسیل مبدل می‌نماید و در نتیجه موجب تغییر (ویرایش) ساختارهای کدکننده پروتئین در آن mRNA می‌گردد. گزارشاتی نیز وجود دارد مبنی بر این که این آنزیم با دآمیناسیون سیتوزین و تبدیل آن به یوراسیل، مستقیماً DNA را تغییر می‌دهد. نوکلئوتید یوراسیل جزو چهار نوکلئوتید معمول در DNA نبوده و این جایگاه سپس تعمیر شده که یا زوج A-T به جای C-G جایگزین شده و یا یوراسیل خارج شده و به جای آن هر کدام از ۴ نوکلئوتید ممکن، جایگزین می‌شود. هر چند که مکانیسم دقیق فعالیت AID تحت بررسی می‌باشد ولی اهمیت آن در هایپر موتاسیون سوماتیک و نوترکیبی تغییر کلاس تقریباً مشخص شده است (شکل ۱۷a-۵).

1- activation induced cytidine deaminase (AID)



شکل ۵-۱۷: اثبات آزمایشگاهی نقش آنزیم AID در تعویض رده و هایپرmutاسیون سوماتیک. (a) یک موش با بیان AID(+/-) و یک موش زن تخریب شده AID(-/-) دو بار با یک کونزوگه هاپتن - حامل ایمن سازی شده و پاسخ های آنتی بادی ضد هاپتن آنها اندازه گیری شد. پاسخ های IgM در هر دو موش سنجیده شد. تولید IgG که مستلزم تعویض رده می باشد، تنها در موش های بیان کننده AID(+/-) رخ می دهد. (b) mRNA کدکننده نواحی متغیر آنتی بادی های فعال شده با آنتی ژن در موش های ایمن شده و بیان کننده AID و موش های زن تخریب شده AID به طور متوالی قرار گرفته اند و موقعیت فراوانی جهش ها به صورت نقطه هایی مشخص شده است.

در تحقیقی برجسته که در دانشگاه کیوتو در ژاپن صورت گرفت، هونجو^۱ و همکارانش موش های AID(-/-) در تغییر کلاس و هایپرmutاسیون سوماتیک با موش هایی که دارای یک نسخه سالم از ژن AID بودند (AID+/-) مقایسه گردید. اطلاعات شکل ۵-۱۷b نشان می دهند که با شکل گیری پاسخ ایمنی در پی ایمونیزاسیون های موفق، موش های دارای نسخه عملکردی ژن AID ابتدا IgM و بعد IgG تولید کردند. در موش های فاقد ژن AID، پاسخ به ایمونیزاسیون علیه همان آنتی ژن تنها منجر به تولید IgM گردید. جهت ارزیابی هایپرmutاسیون سوماتیک، محققین، mRNA کد کننده ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی بادی ها علیه آنتی ژن را در موش های AID(-/-) و (AID+/-) مورد آزمایش قرار دادند. آنها کشف کردند که در موش های با ژن تخریب شده، به هیچ عنوان هایپرmutاسیون دیده نمی شد. این نتیجه جالب بیانگر این مطلب بود که پروتئین AID هم برای تغییر کلاس و هم برای هایپرmutاسیون سوماتیک ضروری می باشد. این محققان در کار بعدی خود، ژن

AID را وارد سلول‌های فیبروبلاست کردند که نه هایپر‌موتاسیون سوماتیک و نه تغییر کلاس را انجام نمی‌داد. با بیان AID در این سلول‌های غیر لنفوئید، هر دوی این مکانیسم‌ها فعال گردیدند. این یافته بسیار ارزشمند، نشان داد که AID تنها فاکتور مورد نیاز جهت انجام هر کدام از این فرآیندهای سلول B می‌باشد.

- بیان ژن‌های ایمونوگلوبولین

همانند بسیاری از ژن‌ها، پردازش پس از رونویسی نسخه‌های اولیه ایمونوگلوبولین جهت تولید mRNAهای عملکردی ضروری می‌باشد (شکل ۴-۵، ۵-۵). نسخه‌های اولیه حاصل از بازآرایی ژن‌های زنجیره سبک و سنگین حاوی توالی‌هایی از DNA مداخله‌گر بوده که شامل اینترون‌های غیر کدکننده و قطعات ژن J بوده که طی بازآرایی J-(D)-V حذف نشده‌اند. به علاوه، همانطور که قبلاً بیان شد، قطعات ژن C زنجیره سنگین به صورت مجموعه‌ای از اگزون‌های کدکننده و اینترون‌های غیرکدکننده سازماندهی شده‌اند. هر اگزون قطعه ژنی C_H مسئول یک دومن از ناحیه ثابت و یا ناحیه لولا در پلی‌پپتید زنجیره سنگین می‌باشد. رونوشت اولیه می‌بایست پردازش شود تا توالی‌های DNA مداخله‌گر حذف شوند و اگزون‌های باقی مانده توسط روندی به نام **اتصال مجدد RNA**^۱ به هم متصل شوند. به طور کوتاه، توالی‌های نسبتاً حفاظت شده برش و اتصال یا جایگاه‌های برش و اتصال موجود در رونوشت اولیه در مرزهای بین اینترون‌ها و اگزون‌ها واقع شده‌اند و پیامی را القا می‌کنند که می‌بایست عمل برش و اتصال در آن محل صورت گیرد. پردازش رونوشت اولیه در هسته، هر کدام از این توالی‌های مداخله‌گر را حذف کرده تا محصول mRNA نهایی حاصل گردد. سپس، mRNA از هسته خارج شده تا توسط ریبوزوم‌ها ترجمه گردد و زنجیره‌های سبک و سنگین کاملی شکل گیرد.

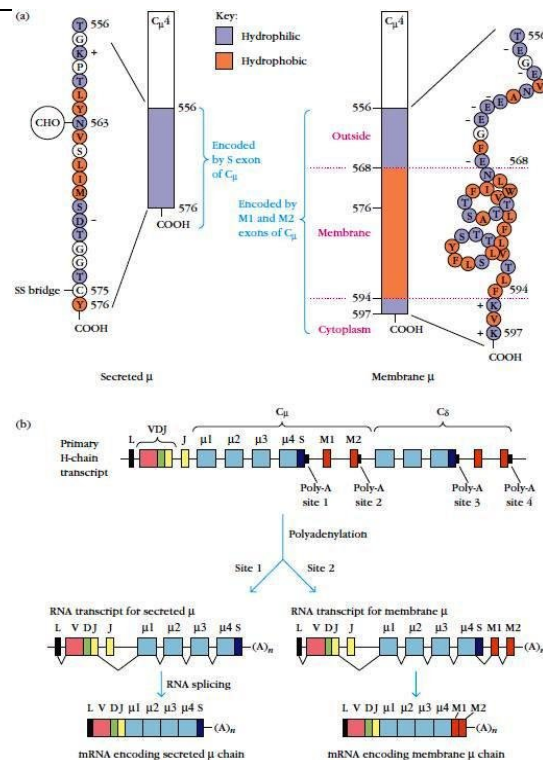
1- RNA splicing

- نسخه‌های اولیه زنجیره سنگین تحت پردازش افتراقی RNA قرار می‌گیرند

پردازش نسخه اولیه زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین می‌تواند منجر به شکل‌گیری چندین mRNA مختلف گردد، که روشن می‌سازد چگونه یک سلول B واحد قادر خواهد بود اشکال ترشحی یا غشای یک ایمونوگلوبولین خاص را تولید کند یا به صورت همزمان IgM و IgD را بیان کند.

- بیان ایمونوگلوبولین غشایی یا ترشحی

همان‌طور که در فصل ۲ شرح داده شد، یک Ig خاص می‌تواند یا به صورت غشایی و یا ترشحی وجود داشته باشد. این دو شکل از نظر توالی اسید آمینه‌ای دو من‌های انتهای کربوکسیل زنجیره سنگین (C_H3/C_H3 در IgA، IgD و IgG و C_H4/C_H4 در IgE و IgM) با یکدیگر تفاوت دارند. اشکال ترشحی دارای یک توالی آبدوست به طول تقریباً ۲۰ اسید آمینه در دو من انتهای کربوکسیل خود هستند. که این توالی در اشکال غشایی با یک توالی ۴۰ اسید آمینه‌ای آبریز که تا خارج سلول امتداد می‌یابد یک قطعه آبدوست که عرض غشا را طی می‌کند و یک قطعه کوتاه آبدوست سیتوپلاسمی، جایگزین می‌گردد (شکل ۵-۱۸a).



شکل ۱۸-۵: بیان اشکال غشایی و ترشعی زنجیره سنگین از طریق فرآیند پردازش متفاوت RNA. (a) توالی های اسید آمینه انتهای کربوکسیل زنجیره های سنگین μ غشایی. (b) ساختار رونوشت های اولیه از یک ژن زنجیره سنگین بازآرایی شده که اگزون های C_{μ} و جایگاه های پلی A را نشان می دهد. پلی آدنیلایسون هر یک از رونوشت های اولیه در جایگاه های ۱ و ۲ و نواحی پردازش که با خطوط شبیه V نشان داده شده است موجب ایجاد mRNA های کد کننده زنجیره های μ ترشعی و غشایی می شود.

برای مدتی به نظر می رسید که حضور این دوشکل، با ساختار DNA زنجیره سنگین در رده زایا که حاوی یک قطعه ژن C_H برای هر کلاس و زیر کلاس بود، تناقض دارد. حل این معما با تعیین توالی DNA قطعه ژنی C_{μ} که حاوی ۴ اگزون ($C_{\mu}1$, $C_{\mu}2$, $C_{\mu}3$ و $C_{\mu}4$) برای ۴ دومن مولکول IgM بود، صورت گرفت. اگزون $C_{\mu}4$ حاوی یک توالی نوکلئوتیدی (به نام S) در انتهای ۳' خود است که یک توالی آبدوست را در دومن $C_{H}4$

مولکول IgM ترشحي کد می کند. دو اگزون ديگر به نام های M1 و M2 در فاصله ۱/۸ کیلوبازی پایین دست انتهای ۳' اگزون C μ 4 قرار دارند. اگزون M1 قطعه غشایی را کد کرده و اگزون M2 نیز قطعه سيتوپلاسمی دومن C μ 4 را در IgM غشایی کد می کند. تعیین توالی، مشخص کرد که تمام قطعات C μ 4 دارای دو اگزون اضافی M1 و M2 در پایین دست خود بوده که قطعات غشایی و سيتوپلاسمی را کد می کنند.

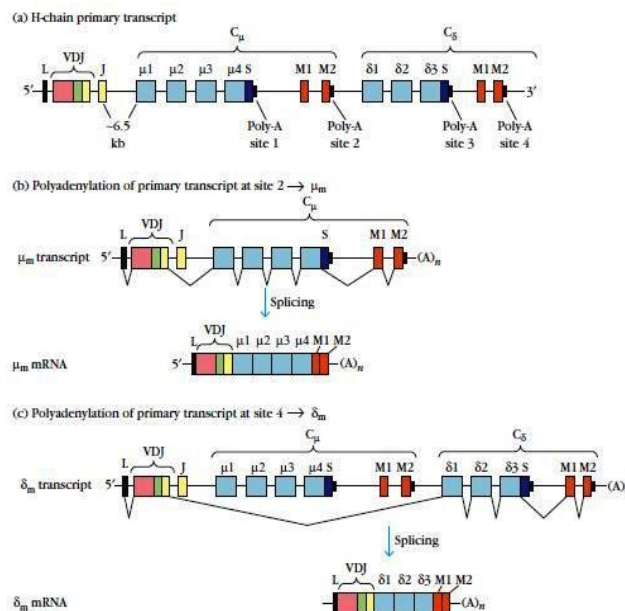
نسخه اولیه ای که در اثر رونویسی از ژن زنجیره سنگین μ بازآرایی شده حاصل می گردد، دارای دو توالی سیگنال برای پلی آدنیلایسیون در قطعه C μ می باشد. جایگاه ۱ در انتهای ۳' اگزون C μ 4 و جایگاه ۲ در انتهای ۳' اگزون M2 قرار دارد (شکل ۱۸b-۵). در صورتی که شکست نسخه اولیه و اضافه شدن دم پلی A در جایگاه ۱ صورت گیرد، اگزون های M1 و M2 حذف می شوند و خارج شدن اینترون ها و اتصال اگزون ها به یکدیگر موجب تولید mRNA کد کننده شکل ترشحي زنجیره سنگین خواهد شد. در صورتی که شکستن و پلی آدنیلایسیون نسخه اولیه در جایگاه ۲ صورت گیرد، الگوی دیگری از برش و اتصال مجدد حاصل می شود. در این مورد توالی S موجود در انتهای ۳' اگزون C μ 4 به اگزون های M1 و M2 اتصال می یابد در نتیجه mRNA شکل غشایی زنجیره سنگین ایجاد می شود. همان طور که قبلاً اشاره شد، سلول های B دست نخورده بالغ، تنها آنتی بادی غشایی تولید می کنند، در حالی که پلاسماسل های تمایز یافته آنتی بادی های ترشحي می سازند. می بایست دقیقاً مشخص شود که چگونه سلول های B دست نخورده و پلاسماسل ها عمل پردازش RNA را به سمتی هدایت می کنند تا mRNA کد کننده هر کدام از اشکال غشایی یا ترشحي را تولید کنند.

- بیان همزمان IgM و IgD

پردازش های افتراقی RNA، همچنین زمینه ای را برای بیان همزمان اشکال غشایی IgM و IgD توسط سلول های B بالغ فراهم می کند. همان طور که عنوان شد، رونویسی از ژن های

بازآرایی شده زنجیره سنگین در سلول‌های B بالغ باعث ایجاد نسخه‌های اولیه‌ای می‌گردد که حاوی هر دو قطعه ژنی $C\mu$ و $C\delta$ است. قطعات ژنی $C\mu$ و $C\delta$ در ژن بازآرایی شده، نزدیک یکدیگر می‌باشند (تنها ۵ کیلو باز از هم فاصله دارند) و عدم حضور جایگاه سویچ بین آنها اجازه می‌دهد تا کل ناحیه $VDJC\mu C\delta$ به یک نسخه اولیه RNA تبدیل شود که ۱۵ کیلو باز طول داشته و حاوی ۴ جایگاه Poly-A باشد (شکل ۵-۱۹). جایگاه ۱ و ۲ با $C\mu$ ارتباط داشته و همان‌طور که در قسمت قبل گفته شد، جایگاه‌های ۳ و ۴ در قطعه ژنی $C\delta$ حضور دارند. در صورتی که عمل شکسته شدن و پلی‌آدنیلایسیون رونوشت زنجیره سنگین در جایگاه ۲ بعد از اگزون‌های $C\mu$ انجام شود، mRNA، شکل غشایی زنجیره سنگین μ را کد خواهد کرد (شکل ۵-۱۹b)، در صورتی که پلی‌آدنیلایسیون در جایگاه ۴ انجام شود، قطع و برش مجدد RNA موجب حذف اگزون‌های مداخله‌گر $C\mu$ گشته و mRNA کد کننده شکل غشایی زنجیره سنگین δ ایجاد خواهد شد (شکل ۵-۱۹c).

به دلیل این که سلول B بالغ هم IgM و هم IgD را بر سطح غشا بیان می‌کند، می‌بایست هر دو مسیر پردازش فوق به صورت همزمان رخ بدهند. به همین ترتیب، شکسته شدن و پلی‌آدنیلایسیون رونوشت اولیه زنجیره سنگین در جایگاه‌های پلی‌آدنیلایسیون ۱ یا ۳ پلاسماسل، و برش و اتصال مجدد RNA، به ترتیب موجب دستیابی به شکل ترشحی زنجیره‌های سنگین μ و δ خواهد شد.

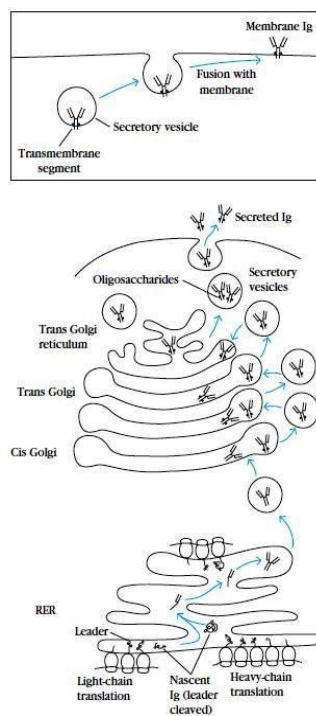


- شکل ۱۹-۵: بیان اشکال غشایی زنجیره های سنگین μ و δ از طریق فرآیند پردازش متفاوت RNA. (a) ساختار ژن زنجیره سنگین بازآرایی شده نماینگر اگزون های C_μ و C_δ و جایگاه های پلی A می باشد. (b) ساختار رونوشت اولیه μ_m و μ_m mRNA ناشی از پلی آدنیلایسون و پردازش در جایگاه ۲ می باشد. (c) ساختار رونوشت δ_m و δ_m mRNA ناشی از پلی آدنیلایسون و پردازش در جایگاه ۴ می باشد.

- سنتز، اجتماع و ترشح ایمونوگلوبولین ها

تولید آنتی بادی دارای مشکلات منحصر به فردی می باشد که با تنوع و میزان محصولات مرتبط می باشند. تنوع فوق العاده گنجینه آنتی بادی ها توسط مکانیسم های بازآرایی ژنتیکی، اتصالات غیر دقیق قطعات V(D)J، افزودن نوکلئوتیدها به انتهای بریده شده این قطعات و در موارد زیادی هایپر موتاسیون سوماتیک حاصل می شود ولی علیرغم هزینه زیادی که صرف این تنوع می شود تعداد قابل توجهی از ژن های آنتی بادی کدون های پایان زود هنگامی را کسب می کنند و یا ایمونوگلوبولین هایی تولید می شوند که تا خوردگی صحیحی ندارند. مشکل دوم مربوط به میزان تولید آنتی بادی توسط پلاسماسل ها می باشد. علاوه بر

پروتئین‌هایی که برای تمام فعالیت‌های متابولیکی و طبیعی آنها لازم می‌باشند، پلاسماسل‌ها اقدام به تولید و ترشح بیش از ۱۰۰۰ مولکول آنتی‌بادی به ازای هر سلول در هر ثانیه می‌کنند. به طور ساده حرکت وزیکول‌های داخل سلولی که حاوی محموله‌های آنتی‌بادی هستند، به سمت غشا جهت تخلیه آنها، نیازمند همکاری دقیق و کنترل ترافیک داخل سلولی می‌باشد. مانند تمامی پروتئین‌هایی که مقصد آنها غشایی سیتوپلاسمی است یا به محیط خارج سلولی تخلیه می‌گردند، پلی‌پپتیدهای ایمونوگلوبولین نیز در شبکه اندوپلاسمی خشن (RER) سنتز می‌گردند. mRNA‌های زنجیره سبک و سنگین ایمونوگلوبولین بر روی پلی‌ریبوزوم‌های مجزای RER ترجمه می‌گردد (شکل ۲۰-۵).

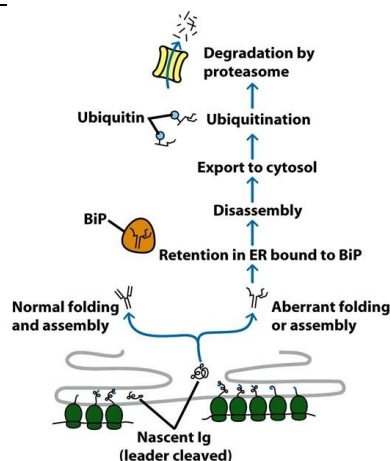


شکل ۲۰-۵: سنتز، تجمع و ترشح مولکول ایمونوگلوبولین.

زنجیره‌های تازه ساخته شده حاوی یک توالی رهبر در انتهای آمینی خود هستند که عمل هدایت زنجیره‌ها را در لومن RER برعهده دارد. سپس این توالی شکسته می‌گردد. ترتیب اجتماع زنجیره‌های سبک (L) و سنگین (H) در کلاس‌های مختلف ایمونوگلوبولین با هم تفاوت دارد. در مورد IgM، زنجیره‌های L و H داخل RER با هم مجتمع گردیده و نیمی از مولکول را می‌سازند و سپس دو نیمه مولکول با هم جمع شده تا مولکول کامل را ایجاد کنند. در مورد IgG، ابتدا دو زنجیره سنگین به هم متصل شده و سپس یک ترکیب واسطه H_2L شکل می‌گیرد و در نهایت مولکول کامل H_2L_2 ایجاد می‌شود. آنزیم‌های حاضر در RER، تشکیل پیوندهای دی‌سولفید میان زنجیره‌ها که برای اجتماع پلی‌پپتیدهای ایمونوگلوبولین ضروری هستند؛ همانطور که پیوند S-S داخل زنجیره‌ای تأمین کننده تاخوردگی صحیح دومن‌ها هستند را کاتالیز می‌کنند، عمل گلیکولیزاسیون مولکول‌های آنتی‌بادی نیز توسط آنزیم‌های RER انجام می‌شود.

آنتی‌بادی‌ها براساس حضور دومن‌های آبدوست و آبگریز در انتهای کربوکسیل خود به سمت مقصد خود (ترشح یا اتصال به غشا) راهنمایی می‌شوند. آنتی‌بادی‌های متصل به غشا دارای توالی آبگریز بوده که در داخل غشای وزیکولی ترشحی فرو می‌رود. با ادغام وزیکول و غشای پلاسمایی، آنتی‌بادی‌ها در داخل غشای پلاسمایی مستقر خواهند شد (شکل ۲۰-۵). آنتی‌بادی‌هایی که دارای توالی آبدوست می‌باشند که مشخصه آنتی‌بادی‌های ترشحی است، به صورت مولکول‌های آزاد به داخل وزیکول‌های ترشحی منتقل می‌شوند و با ادغام وزیکول با غشای پلاسمایی آزاد می‌شوند.

شبکه اندوپلاسمی دارای مکانیسم‌های کنترل کیفی می‌باشد (شکل ۲۱-۵)،



شکل ۲۱-۵: کنترل کیفی در طی تولید آنتی بادی. مولکول‌های Ig که فاقد مرحله تجمع می‌باشند به صورت متصل با پروتئین BiP باقی می‌مانند. واکنش با BiP و عوامل دیگر موجب چین خوردن نامناسب آنتی بادی و عدم تجمع و خروج آن از ER می‌شود.

که تضمین‌کننده خروج مولکول‌های کاملاً تجمع‌یافته و تخریب مولکول‌های Ig که به درستی تاخوردگی حاصل نکرده‌اند، می‌باشند. یکی از میانجی‌های این عملکرد BiP یا پروتئین متصل‌شونده به زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین می‌باشد که به مولکول‌های ایمونوگلوبولین کاملاً تجمع نیافته متصل گردیده و از انواعی که کاملاً تجمع یافته‌اند جدا می‌گردد. توالی اختصاصی (لیزین، گلوتامات، آسپارات، لوسین) BiP موجب حفظ آن در رتیکولوم آندوپلاسمیک می‌گردد و در نتیجه مولکول‌های آنتی‌بادی ناکامل توانایی خروج از ER را نخواهند داشت. آنتی‌بادهایی که به صورت ناقص تاخوردده‌اند یا در RE باقی مانده‌اند در نهایت به منظور تخریب با پروتئینی به نام یوبی کیتین علامت‌گذاری می‌شوند. پروتئین‌های نشاندار شده با یوبی کیتین به خارج از هسته منتقل شده و توسط مجموعه‌های چند آنزیمی به نام پروتئوزوم^۱ دچار پروتئولیز می‌گردند.

1- proteasomes

ژن‌های ایمونوگلوبولین تنها توسط سلول‌های رده B بیان می‌شوند و حتی در داخل این رده نیز، طی رده‌های مختلف تمایزی، ژن‌ها با مقادیر متفاوتی بیان می‌گردند. همانند سایر ژن‌های یوکاریوتی، دو کلاس اصلی از توالی‌های تنظیم کننده cis وظیفه تنظیم نسخه‌برداری از ژن‌های ایمونوگلوبولین را بر عهده دارند:

- **پروموترها^۱:** توالی‌های نسبتاً کوتاه نوکلئوتیدی، که تقریباً ۲۰۰ جفت باز بالاتر از جایگاه شروع نسخه‌برداری واقع شده‌اند و وظیفه پیش‌بردن شروع نسخه‌برداری RNA را در جهت خاصی برعهده دارند.
- **افزاینده‌ها^۲:** توالی‌های نوکلئوتیدی هستند که در فواصلی واقع در بالا دست یا پایین دست ژن قرار داشته و نسخه‌برداری را از توالی پروموتر و به صورت غیر وابسته به جهت، فعال می‌کنند.

H-chain DNA

5' - P L V_H P L V_H D_H J_H E_H C_μ C_δ C_{γ3} C_{γ1} C_{γ2b} C_{γ2a} C_ε C_α 3'E

K-chain DNA

5' - P L V_K P L V_K P L V_K J_K E_K C_κ 3'E

λ-chain DNA

5' - P L V_{λ2} J_{λ2} C_{λ2} J_{λ4} C_{λ4} λ-2-E P L V_{λ1} J_{λ3} C_{λ3} J_{λ1} C_{λ1} λ-3-E 3'

Key

- Promoter (Red circle)
- Enhancer (Green circle)
- Silencer (Yellow circle)

شکل ۲۲-۵: موقعیت پروموتورها و افزاینده ها در DNA رده زایای زنجیره سنگین، زنجیره سبک K و λ در موش.

- 1- promoters
- 2- enhancers

تمامی این عناصر دارای تجمعاتی از موتیف‌هایی می‌باشند که قادرند به صورت اختصاصی به یک یا تعداد بیشتری از پروتئین‌های هسته‌ای اتصال یابند.

هر کدام از قطعات V_H و V_L دارای پروموتری در بالادست توالی رهبر می‌باشند. به علاوه، اجتماع J_K و هر کدام از ژن‌های D_H در ناحیه زنجیره سنگین با پروموتر آغاز می‌شوند. همانند سایر پروموترها، پروموت‌های ایمونوگلوبولین حاوی یک توالی حفاظت شده غنی از AT می‌باشند که جعبه TATA خوانده شده و محلی است برای اتصال پروتئین‌هایی که برای نسخه‌برداری RNA ضروری هستند. عمل اصلی رونویسی توسط RNA پلی‌مراز II صورت می‌گیرد که این عمل از نقطه شروع که ۲۵ جفت باز در پایین دست جعبه TATA قرار دارد آغاز می‌کند. پروموت‌های Ig همچنین دارای توالی‌های اکتامر حفاظت‌شده‌ای هستند که ویژگی سلول B در پروموتر را تعیین می‌کنند. توالی اکتامر به دو فاکتور نسخه‌برداری اتصال می‌یابد. یکی oct-1 که در بسیاری از انواع سلول‌ها یافت می‌شود و دیگری oct-2 که تنها در سلول‌های B به چشم می‌خورد.

با وجودی که بسیاری از اعمال افزایشنده‌ها هنوز مشخص نمی‌باشد ولی آنها جایگاه‌های اتصال برای تعدادی از پروتئین‌ها را فراهم می‌کنند که فاکتورهای نسخه‌برداری هستند. یک نقش بسیار مهم برعهده پروتئین‌هایی می‌باشد که توسط ژن E2A کد شده و مسئول برش و اتصال مجدد به منظور ایجاد دو پروتئین مشارکتی می‌باشند. این دو پروتئین که توسط E2A کد می‌شوند به افزایشنده‌های اینترونی μ و κ اتصال می‌یابند و برای تکامل سلول‌های B ضروری هستند. موش‌های فاقد E2A دارای تعداد طبیعی از سلول‌های T بوده ولی کاملاً فاقد سلول B می‌باشند. نکته جالب توجه این است که انتقال این پروتئین‌های متصل شونده به افزایشنده به سلول‌های T منجر به افزایش چشم‌گیری در نسخه‌برداری mRNA زنجیره μ و حتی القای بازآرایی D_H+J_H در سلول T می‌گردد.

یک افزایشنده زنجیره سنگین در اینترون آخرین قطعه ژن J (3') و اولین قطعه ژن C (5') قرار داشته ($C\mu$) که زنجیره سنگین μ را کد می‌کند. بدلیل این که این افزایشنده زنجیره

سنگین ($E\mu$) در سمت ۵' جایگاه سویچ $S\mu$ واقع شده، پس از تغییر کلاس، هنوز قادر به ادامه فعالیت خواهد بود. افزاینده دیگر زنجیره سنگین ($3'E$) در سمت ۳' قطعه $C\alpha$ قرار دارد. یک افزاینده زنجیره سبک κ ($E\kappa$) میان قطعات $J\kappa$ و $C\kappa$ قرار داشته و افزاینده دیگر ($3'E$) در سمت ۳' قطعه $C\kappa$ واقع شده است. افزاینده‌های زنجیره سبک λ در سمت ۳' $C\lambda 4$ و $C\lambda 13$ قرار گرفته‌اند.

- بازآرایی DNA، رونویسی را شدت می‌بخشد

اتصال پروموتورهای مرتبط با قطعات ژن V به RNA پلی‌مراز II بسیار ضعیف می‌باشد و افزاینده‌های ناحیه متغیر در DNA با فاصله نسبتاً زیادی از افزاینده‌ها (۲۵۰ تا ۳۰۰ کیوباز) قرار گرفته‌اند. به همین دلیل میزان نسخه‌برداری نواحی کد کننده V_H و V_L در DNA بازآیی نشده بسیار ناچیز می‌باشد. بازآرایی ژن ناحیه متغیر منجر به نزدیک شدن پروموتور و افزاینده به یکدیگر به مقدار ۲ کیلوباز و در نتیجه تأثیر افزاینده بر پروموتور مجاور خود می‌گردد. در نتیجه، میزان نسخه‌برداری از یک واحد بازآرایی شده $V_L J_L$ یا $V_H D_H J_H$ ، 10^4 بار بیشتر از نسخه‌برداری از ژن بازآرایی نشده V_L یا V_H می‌باشد.

گاهی اوقات ژن‌هایی که تکثیر سلولی را تنظیم می‌کنند یا آپوپتوز را مهار می‌نمایند، به داخل لوکوس زنجیره سبک یا سنگین ایمونوگلوبولین انتقال می‌یابند و در اینجا تحت تأثیر افزاینده‌های ایمونوگلوبولین، بیان این ژن‌ها نیز به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد که منجر به مقادیر بالای رشد یا پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز می‌گردد. جابه‌جایی کروموزومی اونکوژن‌های $C-myc$ و $bcl-2$ با لنفوم‌های بدخیم سلول B ارتباط دارد. جابه‌جایی کروموزومی $C-myc$ موجب بیان دائمی $C-myc$ و یک لنفوم بدخیم سلول B به نام لنفوم بورکیت می‌گردد. جابه‌جایی کروموزومی $bcl-2$ موجب تعلیق مرگ برنامه‌ریزی شده سلول B و در نتیجه لنفوم فولیکولی سلول B می‌شود. جزئیات این جابه‌جایی‌های ایجادکننده سرطان در فصل ۲۱ بیان خواهد شد.

- بیان ژن ایمونوگلوبولین در سلول‌های T مهار شده است

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، جهش‌های اختصاصی جایگاه در سلول‌های B، دارای معادلی در سلول‌های T می‌باشند. DNA کدکننده پذیرنده سلول T (TCR) دچار بازآرایی V-(D)-J شده تا ژن‌های TCR عملکردی را ایجاد کند. بازآرایی هر دو ژن ایمونوگلوبولین و TCR با یک روند نوترکیبی یکسان توسط RAG-1 و RAG-2 و دخالت توالی‌های پیام‌نوترکیبی صورت می‌گیرد (شکل ۵-۷). علیرغم شباهت‌های این روندها، بازآرایی کامل ژن Ig تنها در سلول‌های B اتفاق افتاده و بازآرایی کامل ژن TCR نیز تنها محدود به سلول‌های T می‌شود. هیتوشی ساکانو^۱ و همکارانش نتایجی را بدست آوردند مبنی بر این که توالی موجود در افزاینده ۳' زنجیره κ (3'E κ) نقش تنظیم اتصال V κ به J κ در سلول B و T را برعهده دارد. این توالی جایگاه اتصال PU.1 نام داشته و هنگامی که جهش در آن ایجاد شود، سلول T نیز همانند سلول B دچار اتصال V κ -J κ می‌گردد. آنها پیشنهاد کردند که اتصال یک پروتئین که تنها توسط سلول‌های T بیان می‌شود، به افزاینده جهش نیافته زنجیره κ ، از اتصال V κ -J κ در سلول‌های T ممانعت به عمل می‌آورد. چنین روندی ممکن است از بازآرایی زنجیره سنگین و همچنین زنجیره سبک λ نیز در سلول T جلوگیری کند.

- ژن‌های آنتی‌بادی و مهندسی آنتی‌بادی

در بسیاری از کاربردهای بالینی، ویژگی بالای یک آنتی‌بادی منوکلونال موشی از اهمیت زیادی برخوردار است. هر چند که با ورود آنتی‌بادی موشی به بدن انسان، به عنوان بیگانه قلمداد شده و منجر به شکل‌گیری آنتی‌بادی انسانی ضد موش (HAMA) گشته که موجب پاکسازی سریع آنتی‌بادی منوکلونال موشی از جریان خون و کاهش ظرفیت درمانی آنتی‌بادی تجویز شده می‌گردد. مجموعه‌های در گردش آنتی‌بادی‌های انسان و موش می‌توانند منجر به واکنش‌های آلرژیک و در برخی موارد تشکیل چنین مجموعه‌هایی در

1- Hitoshi Sakano

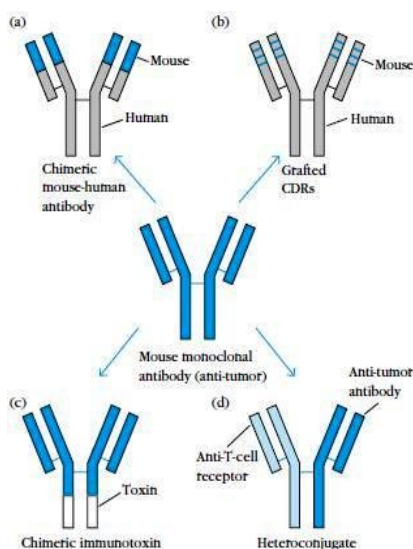
اعضایی مانند کلیه باعث واکنش‌های جدی و حتی مرگ گردند. یک راه اجتناب از این واکنش‌های نامطلوب، استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال انسانی در کاربردهای بالینی می‌باشد. هر چند که استفاده از تکنولوژی هیبریدوما جهت تهیه آنتی‌بادی‌های منوکلونال انسانی با مشکلات متعدد تکنیکی همراه بوده و تولید هیبریدوماهای ترشح کننده آنتی‌بادی‌های انسانی سخت می‌باشد. جهت غلبه بر این مشکلات، روش‌های جایگزین مهندسی آنتی‌بادی که از تکنولوژی DNA نو ترکیب استفاده می‌کنند، شکل گرفته‌اند.

آگاهی از توالی‌های ژن آنتی‌بادی و ساختمان آن با تکنیک‌های بیولوژی مولکولی ترکیب شده و «آنتی‌بادی‌های ساخت انسان» را ایجاد کرده است. اکنون این امکان فراهم می‌باشد تا بتوان آنتی‌بادی‌هایی را طراحی و سنتز کرد که ناحیه متغیر آن از یک گونه مثل موش و ناحیه ثابت آن از گونه‌ای دیگر مثل انسان باشد. ژن‌های جدیدی ایجاد شده‌اند که توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین‌های غیر آنتی‌بادی را به توالی‌های کدکننده ناحیه متغیر آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های خاصی را مرتبط می‌کنند. این هیبریدهای مولکولی که **کایمرا**^۱ خوانده می‌شوند قادرند سموم قوی را به اهداف آنتی‌ژنی خاص مثال سلول‌های توموری تحویل دهند. با تهیه یک نمونه از تمامی ژن‌های ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین ایمونوگلوبولین در کتابخانه‌های باکتریوفاژها، این امکان وجود خواهد داشت با توان کل گنجینه آنتی‌بادی افراد را بازسازی کرد. در انتها، با جایگزینی لوکوس ایمونوگلوبولین یک گونه در یک گونه دیگر، حیوانات متعلق به یک گونه مثل گاو یا موش مجهز به ظرفیت پاسخگویی به ایمونیزاسیون و تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌شوند که توسط ژن‌های پیوندی ایمونوگلوبولین انسانها کد می‌گردند.

1- chimeras

- آنتی‌بادی‌های کایمریک و انسانی شده ظرفیت بالینی قدرتمندی دارند

یک روش مهندسی آنتی‌بادی، کلون کردن DNA نوترکیب حاوی پروموتر، توالی رهبر و توالی‌های ناحیه متغیر از یک ژن آنتی‌بادی موشی و اگزون‌های ناحیه ثابت از یک ژن آنتی‌بادی انسانی می‌باشد (شکل ۲۳-۵).



شکل ۲۳-۵: مهندسی آنتی‌بادی با تکنولوژی DNA نوترکیب. (a) آنتی‌بادی منوکلونال کایمریک موش - انسان دارای دومن‌های V_L و V_H از آنتی‌بادی منوکلونال موش و دومن‌های C_L و C_H از آنتی‌بادی منوکلونال انسان می‌باشند. (b) یک آنتی‌بادی منوکلونال انسانی شامل تنها CDR های یک آنتی‌بادی منوکلونال موش می‌باشد که به نواحی داربست یک آنتی‌بادی منوکلونال انسانی پیوند زده شده است. (c) یک آنتی‌بادی منوکلونال کایمریک که در آن دومن Fc انتهایی با زنجیره ی توکسین جایگزین شده است. (d) یک هتروکونژوگه که در آن نیمی از مولکول آنتی‌بادی موشی ویژه یک آنتی‌ژن تومور و نیمی از آن ویژه $CD3/TCR$ می‌باشد.

آنتی‌بادی کدشده توسط چنین ژن نوترکیبی یک کایمرای موشی - انسانی بوده که تحت عنوان **آنتی‌بادی کایمریک**^۱ شناخته می‌شود. ویژگی آنتی‌ژنیک آن که توسط ناحیه تغییر

1- chimeric antibody

تعیین می‌شود از DNA موش مشتق می‌شود و ایزوتایپ آن توسط ناحیه ثابت DNA انسان تعیین می‌گردد. بدلیل این که نواحی ثابت این آنتی‌بادی‌ها توسط ژن‌های انسان کد می‌شوند، این آنتی‌بادی‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی دارای شاخص‌های آنتی‌ژنی موشی کمتری بوده و در نتیجه ایمنی‌زایی کمتری خواهند داشت (شکل ۲۳a-۵). یکی از چنین آنتی‌بادی‌های کایمریک موشی- انسانی برای درمان برخی از بیماران مبتلا به لنفوم غیرهوجکین به کار رفته است (قسمت تمرکز بالینی). بدلیل این که تمامی نواحی V_H و V_L آنتی‌بادی‌های کایمرک، موشی می‌باشند، این نواحی حاوی مقادیر قابل توجهی از توالی‌های Ig موش بوده که می‌توانند موجب برانگیختن پاسخ HAMA گردند. خوشبختانه می‌توان آنتی‌بادی‌هایی را مهندسی کرد که تمامی قسمت‌های آن به جز نواحی CDR انسانی باشد. طرح شماتیک این **آنتی‌بادی انسانی شده**^۱ در شکل ۲۳b-۵ به نمایش گذاشته شده است. آنتی‌بادی‌های انسانی شده دارای عملکردهای بیولوژیک آنتی‌بادی انسانی بوده و در شروع فعال کردن کمپلمان و اعمال با واسطه پذیرنده Fc مثل فاگوسیتوز، بسیار مؤثرتر از آنتی‌بادی‌های موشی می‌باشند. آنتی‌بادی‌های منوکلونال کایمریک می‌توانند به عنوان ایمونوتوکسین نیز عمل کنند. برای مثال، می‌توان دومن انتهایی ناحیه ثابت یک آنتی‌بادی اختصاصی تومور را به یک ماده نشاندار رادیواکتیو مثل ایتريوم-۹۰ یا توکسینی مثل دیفتری متصل کرد (شکل ۲۳c-۵). این ایمونوتوکسین‌ها به صورت انتخابی به سلول‌های توموری اتصال یافته و آنها را به صورت اهدافی بسیار اختصاصی برای معرف‌های درمانی در آورند.

هتروکونژوگه‌ها^۲ یا **آنتی‌بادی‌های دو اختصاصیتی**^۳، هیبریدهایی از دو مولکول متفاوت آنتی‌بادی می‌باشند (شکل ۲۳d-۵). این آنتی‌بادی‌ها در اثر اتصال متقاطع شیمیایی دو آنتی‌بادی مختلف یا از ادغام دو رده سلولی تولید کننده آنتی‌بادی منوکلونال در هیبریدوما

1- humanized antibody

2- heteroconjugates

3- bispecific antibodies

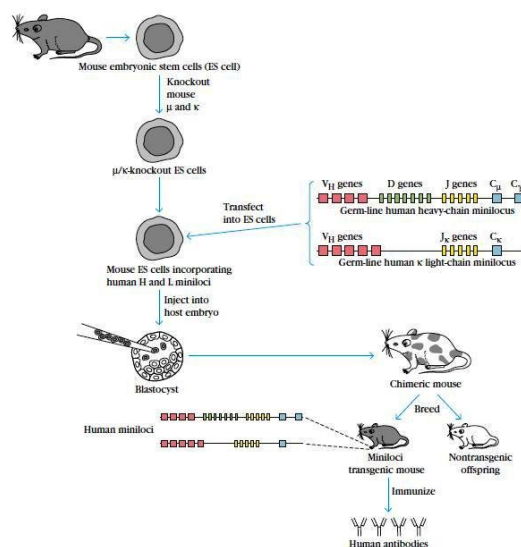
حاصل می‌شوند. در هر دوی این روش‌ها آنتی‌بادی‌های تک اختصاصیتی و دو اختصاصیتی تولید می‌شوند و در صورتی که آنتی‌بادی دو اختصاصیتی مدنظر باشد، این مولکول می‌بایست خالص‌سازی شود. روش ساده‌تر کاربرد مهندسی ژنتیک در ساخت ژن‌هایی است که مولکول‌هایی که تنها دارای دو ویژگی می‌باشند را کد می‌کنند. چندین مولکول طراحی شده‌اند که نیمی از مولکول آنتی‌بادی دارای ویژگی برای سلول توموری و نیمه دیگر دارای ویژگی برای مولکول سطحی یک سلول مؤثر ایمنی مثل سلول NK یا CTL هستند که در نتیجه سلول توموری توسط یک سلول عملکردی از بین خواهد رفت.

- موش‌هایی که تحت مهندسی لوکوس ایمونوگلوبولین انسان قرار گرفته‌اند

با استفاده از تکنیک از کار انداختن ژن می‌توان ظرفیت بازآرایی زنجیره‌های سبک و سنگین را در موش از کار انداخت. این موش‌ها هیچگونه Ig موشی نساخته و بدلیل این که تکامل سلول‌های B به تولید ایمونوگلوبولین μ عملکردی نیاز دارد. این موش‌ها فاقد سلول‌های B نیز می‌باشند. هر چند که با معرفی لوکوس عملکردی Ig موشی به چنین موش‌هایی می‌توان توانایی تولید سلول‌های B و آنتی‌بادی را در آنها بازیابی کرد. برخی محققین نشان داده‌اند که معرفی بخش‌هایی از لوکوس H, L انسانی به این موش‌ها می‌تواند منجر به تکامل سلول‌های B تولید کننده آنتی‌بادی انسانی می‌شود. هر چند که لوکوس کامل Ig انسانی بخش بزرگی از DNA رده زایا را به خود اختصاص می‌دهد (لوکوس H انسانی ۱/۵ میلیون باز و لوکوس λ انسان ۱ میلیون باز) و مشکلات تکنیکی مانع از معرفی کل لوکوس H و L انسانی به موش می‌گردد، تنها می‌توان بخشی از قطعات این لوکوس‌ها را معرفی کرد و در نتیجه تمام اجزای این لوکوس بزرگ و پیچیده عرضه نخواهد شد. در تحقیق جدیدی که توسط ایشیدا^۱ و همکارانش جهت مقابله با این مشکل انجام شده است، یک کروموزوم انسانی مصنوعی (HAC) ساخته شد که حاوی کل لوکوس زنجیره سنگین و

1- Ishida

زنجیره λ بود. سپس آنها HAC را وارد سلول‌های بنیادی جنینی موشهایی که فاقد ژن زنجیره سبک و سنگین بودند، کردند و رده‌هایی از موش‌های ترانس ژنیک را ایجاد کردند که در اثر تحریک آنتی‌ژنی با سرم آلبومین انسانی، آنتی‌بادی‌های انسانی ضد سرم آلبومین انسانی تولید خواهند کرد.

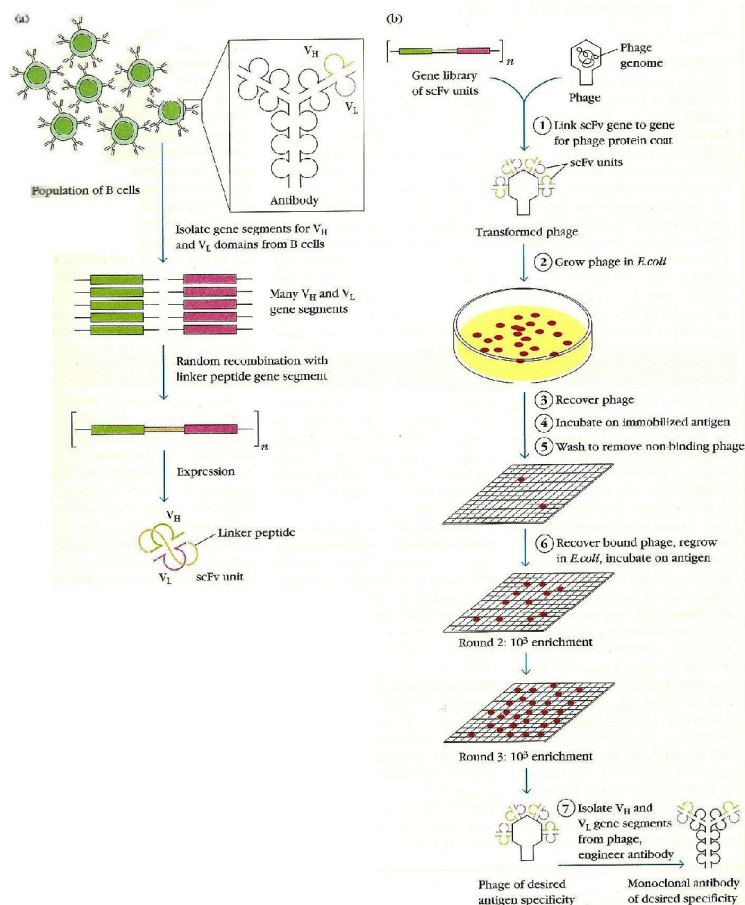


شکل ۲۴-۵: آنتی بادی انسانی از موش حامل یک کروموزوم مصنوعی انسانی (HAC) می باشد که حاوی جایگاه کامل زنجیره سنگین و سبک انسانی می باشد.

– در کتابخانه‌های ژنی فاژری بدون ایمن‌سازی می‌توان آنتی‌بادی منوکلونال تهیه کرد

دیگر روش نزدیک شده به تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال، کنار گذاشتن تکنولوژی هیبریدوما به طور کامل است. این کار بر روی جمعیتی از سلول‌های B و قطعاتی از ژن بازآرایی شده نواحی V_H و V_L آنتی‌بادی‌های سلول B انجام می‌شود. نتیجه حاصل، یک کتابخانه گسترده و بزرگ از ژن‌های V_H و V_L خواهد بود که گنجینه ژن‌های V بازآرایی شده را در جمعیت سلول‌های B نشان می‌دهد. سپس این ژن‌های V_H و V_L توسط یک توالی

پپتیدی رابط به یکدیگر متصل می‌شوند تا مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده پلی پپتیدی تحت عنوان **قطعه متغیر تک‌زنجیره‌ای (scFv)** ایجاد شود (شکل ۲۵a-۵). در هر واحد scfv، یک دومن V_H با یک V_L جفت می‌شود تا کوچکترین واحد اتصال به آنتی‌ژن شکل گیرد. در قطعت scfv هر کدام از قطعات V_H می‌توانند به هریک از قطعات V_L اتصال یافته تا کتابخانه ژن فاژی شکل گیرد. کتابخانه‌های فاژی حاوی بیش از 10^{11} عضو واحد می‌باشند. این سطح تنوع با گنجینه انسانی قابل مقایسه بوده و این کتابخانه‌های بسیار متنوع حاوی جایگاه‌های اتصال آنتی‌ژنیک برای طیف گسترده‌ای از آنتی‌ژن‌ها می‌باشند. قدرت ژن‌های یک کتابخانه بزرگ از واحدهای scFv در پروتکلی بنام **تکنولوژی نمایش فاز^۱** به خدمت گرفته شده است (شکل b ۲۵-۵).



شکل ۲۵-۵: تولید یک کتابخانه بیان فازی حاوی جایگاه اتصال آنتی بادی. (a) تولید کتابخانه scFvb (b) کتابخانه scFv که در فازها کلون می شود در آلودگی باکتری *E. coli* استفاده می گردد. رشد باکتری آلوده با فاز موجب تولید یک کتابخانه فازی می شود که بر روی پلیت های پوشیده با آنتی ژن غربالگری شده تا این که وجود فازی که به آنتی ژن مشخص متصل می شود، بررسی شود. چرخه های تکراری از رشد این ارگانیزم ها منجر به غنی سازی فازهای ویژه آنتی ژن می شود. کلون های فاز ویژه آنتی ژن را می توان ایزوله کرد و تکنیک هایی از تکنولوژی DNA نوترکیب جهت پیوند ژن های دومن های V_H و V_L از فازهای انتخابی به نواحی ثابت یک آنتی بادی به کار برد تا این که یک mAb با ویژگی آنتی ژنی مشخص مهندسی شود.

فاژها (مخفف باکتریوفاژها) ویروس‌های باکتریایی بوده که از یک ژنوم و یک پوشش پروتئینی تشکیل شده‌اند. از مهندسی ژنتیک جهت اتصال ژن‌های کد کننده واحدهای scFv با ژن کد کننده یکی از پوشش‌های پروتئینی که بر سطح فاژ بارز می‌شوند، استفاده می‌گردد. سپس فاژنی که انتقال ژن به آن صورت گرفته، پروتئین‌های سطحی تغییر یافته‌ای را بارز می‌کنند که واحد scFv را به نمایش می‌گذارند. ذخایر عظیم ژن‌های scFv (10^6 تا 10^9 جایگاه اتصال مختلف) را می‌توان با کلون کردن به داخل فاژها تهیه کرد که **کتابخانه نمایشی فاژ خوانده می‌شود**.

جمعیت‌های فاژ با ورود به E.coli تقویت می‌گردند. سپس بوسیله انکوباسیون فاژهای بدست آمده با یک آنتی‌ژن بی‌حرکت شده می‌توان آنها را غربال کرده فاژهایی که به آنتی‌ژن متصل نمی‌شوند، توسط شستشو خارج می‌شوند و تنها فاژهایی که واحدهای scFv اختصاصی آنتی‌ژن را بیان می‌کند بعلاوه تعدادی که به صورت غیر اختصاصی به پلیت متصل شده‌اند، باقی می‌مانند. به منظور غنی‌سازی بیشتر، عفونت E.coli دوباره تکرار شده و پس از آن، مراحل انتخاب مجدداً صورت می‌پذیرد. با تکرار مراحل رشد، انتخاب آنتی‌ژنی و برداشت محصول، امکان جداسازی یک فاژ از 10^9 فاژ اختصاصی آنتی‌ژن بوجود خواهد آمد.

با شناسایی فاژهای حامل جایگاههای اتصال مناسب، تکنیک‌های مهندسی ژنتیک جهت بازیابی نواحی کد کننده V_L و V_H از ژنوم فاژ به کار می‌روند تا آنها را به داخل ژنوم کد کننده نواحی سبک و سنگین ایمونوگلوبولین پیوند بزنند. با بیان ژن‌های مهندسی شده زنجیره‌های سبک و سنگین در سلول‌ها، یک آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی برای آنتی‌ژنی دلخواه تولید می‌شود. بنابراین این امکان وجود خواهد داشت تا مسیرهای ایمونیزاسیون و استفاده از تکنیک‌های هیبریدوما را کاملاً کنار گذاشت. علاوه بر آن، در صورتی که کتابخانه فاژی با استفاده از سلول‌های B انسانی به عنوان منبع V_L و V_H تولید شوند، و این قطعات به نواحی ثابت سبک و سنگین انسانی اضافه شوند، آنتی‌بادی تولید شده کاملاً انسانی خواهد

بود. در واقع، این روش با موفقیت در تولید آنتی‌بادی منوکلونال انسانی علیه سایتوکاین التهابی $TNF-\alpha$ به کار رفته است. این آنتی‌بادی، مجوز دریافت کرده و به منظور درمان آرتریت روماتوئید مورد استفاده بالینی قرار می‌گیرد.

- خلاصه

- زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین توسط سه خانواده چند ژنی مجزا که هر کدام از چندین قطعه ژنی تشکیل شده‌اند و روی کروموزوم‌های مختلفی قرار گرفته‌اند، کد می‌شوند.
- ژن‌های عملکردی زنجیره‌های سبک و سنگین، بواسطه بازآرایی‌های تصادفی قطعات ژنی ناحیه متغیر موجود در DNA رده زایا ایجاد می‌شوند.
- اتصال V(D)J توسط RAG1 و RAG2 و دخالت سایر آنزیم‌ها و پروتئین‌ها صورت می‌گیرد. و اتصال قطعات توسط توالی‌های پیام نوترکیبی (RSSs) که توالی‌های حفاظت‌شده DNA در طرفین قطعات ژنی V، D و J هستند، راهنمایی می‌شود.
- هر کدام از توالی‌های پیام نوترکیبی حاوی یک توالی هپتامر حفاظت شده، یک توالی نونامر حفاظت شده و یک فاصله گذار ۱۲ جفت بازی (یک طرفه) یا ۲۴ جفت بازی (دو طرفه) می‌باشد. طی بازآرایی، قطعات ژنی دارای فاصله گذار یک طرفه تنها به قطعات ژنی دارای فاصله گذار دو طرفه اتصال می‌یابند که تضمین کننده اتصال مناسب $V_H-D_H-J_H$ و V_L-J_L می‌باشد.
- بازآرایی ژنی ایمونوگلوبولین به صورت ترتیبی انجام می‌شود: ابتدا بازآرایی‌های زنجیره سنگین و سپس بازآرایی‌های زنجیره سبک، انحصار آلی نتیجه بازآرایی عملکردی DNA ایمونوگلوبولین می‌باشد و به منظور تضمین این که هر سلول B، ایمونوگلوبولینی با یک ویژگی آنتی‌ژنی را بیان کند، ضروری می‌باشد.

- منبع اصلی تنوع آنتی‌بادی که می‌تواند بیش از 10^{10} جایگاه اتصال را تولید کند، اتصال تصادفی قطعاتی ژنی V، D و J، ارتباط تصادفی زنجیره‌های سبک و سنگین، انعطاف‌پذیری اتصالی، افزودن P، افزودن N و جهش‌های سوماتیک می‌باشد. هر چند که در برخی گونه‌ها، مثل پرندگان و نشخوارکنندگان، فرآیندهای تنوع بخشی سوماتیک، ایجاد کنندگان اصلی تنوع می‌باشند.
- در پی ایمونیزاسیون، عامل اصلی تولید آنتی‌بادی‌های با میل ترکیبی زیاد به آنتی‌ژن مورد استفاده، هایپر‌موتاسیون سوماتیک می‌باشد.
- پس از تحریک آنتی‌ژنی سلول‌های B بالغ، تعویض کلاس، منجر به بیان کلاس‌های متفاوت آنتی‌بادی (IgG، IgA و IgE) با یک ویژگی آنتی‌ژنی می‌گردد.
- ستیدین‌دآمنیاز القا شده در اثر فعالیت (AID) برای هایپر‌موتاسیون سوماتیک، تعویض کلاس و معکوس کردن ژن، ضروری می‌باشد.
- پردازش افتراقی RNA منجر به تولید آنتی‌بادی متصل به غشا در سلول‌های B بالغ، آنتی‌بادی ترشحی در پلاسماسل‌ها و بیان همزمان IgM، IgD توسط سلول‌های B بالغ می‌گردد.
- نسخه‌برداری از ژن‌های ایمونوگلوبولین، حداقل توسط دو نوع از توالی‌های تنظیمی DNA به نام‌های پروموتورها و تشدید کننده‌ها تنظیم می‌شود.
- افزایش دانسته‌های ما در زمینه بیولوژی مولکولی ژن‌های ایمونوگلوبولین، مهندسی کردن آنتی‌بادی‌ها به منظور کاربردهای تحقیقاتی و درمانی را فراهم کرده است. روش‌های مورد استفاده شامل آنتی‌بادی‌های کایمریک، کتابخانه‌های ژن Ig بر پایه فاز و وارد کردن کل لوکوس ایمونوگلوبولین انسانی در ژنوم موش و گاو به منظور تولید آنتی‌بادی‌های انسانی می‌باشند.

سئالات درسی

- ۱- درست یا نادرست بودن هر کدام از عبارات زیر را مشخص کنید. در صورتی که تصور می‌کنید عبارتی نادرست است، دلیل آن را توضیح دهید.
 - الف) قطعات ژنی V_K گاهی اوقات به قطعات C_L اتصال می‌یابند.
 - ب) به غیر از تغییر به IgD ، تغییر کلاس ایمونوگلوبولین بواسطه بازآرایی‌های DNA صورت می‌گیرد.
 - پ) اگزون‌های مجزا، بخش غشایی هر مولکول آنتی‌بادی غشایی را کد می‌کنند.
 - ت) با وجودی که هر سلول B دو آلل کدکننده زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین را کد می‌کنند، تنها یک آلل بیان خواهد شد.
 - ث) نسخه‌های اولیه به mRNA عملکردی پردازش می‌شوند که این کار توسط حذف اینترون‌ها، کلاهِک‌گذاری و اضافه کردن دم‌پلی A انجام می‌شود.
 - ج) نسخه اولیه یک RNA مکمل زنجیره کدکننده DNA بوده و دارای اگزون و اینترون می‌باشد.
 - ۲- توضیح دهید که چرا یک قطعه V_H نمی‌تواند مستقیماً به یک قطعه J_H در زنجیره سنگین اتصال یابد.
 - ۳- با توجه به اتصال ترکیبی ژن‌ها و ارتباط زنجیره‌های سبک و سنگین، از یک DNA حاوی ۵۰۰ قطعه V_L ، ۴ قطعه ژنی J_L ، ۳۰۰ قطعه V_H ، ۱۵ قطعه D_H و ۴ قطعه ژنی J_H چند مولکول آنتی‌بادی می‌تواند ایجاد شود؟
 - ۴- برای هر کدام از عبارات ناقص زیر (الف تا ج) عبارت (های) مکمل را انتخاب کنید.
 - الف) نوترکیبی قطعات ژنی ایمونوگلوبولین به منظور ----- انجام می‌شود.
- ۱- ایجاد تنوع آنتی‌بادی

۲- جمع کردن توالی کامل کدکننده Ig

۳- اجازه دادن به ایجاد تغییر در توالی کدکننده طی بلوغ سلول B

۴- افزایش میل ترکیبی Ig به آنتی‌ژن

۵- تمامی موارد فوق

ب) جهش سوماتیک ژن‌های ایمنوگلوبولین مسئول ----- می‌باشد

۱- انحصار آلی

۲- تغییر کلاس از IgM به IgG

۳- بلوغ میل ترکیبی

۴- تمامی موارد فوق

۵- هیچ‌کدام

پ) فراوانی جهش سوماتیک ژن‌های Ig طی ----- بیشترین مقدار می‌باشد.

۱- تمایز از سلول‌های Pre-B به سلول‌های B بالغ

۲- تمایز از سلول‌های Pre-T به سلول‌های T بالغ

۳- ایجاد سلول‌های B خاطره‌ای

۴- ترشح آنتی‌بادی توسط پلاسماسل‌ها

۵- هیچ‌کدام

ت) ژن‌های زنجیره سبک کاپا و لامبدا

۱- بر روی یک کروموزوم واقع شده‌اند.

۲- تنها با یک نوع زنجیره سنگین ارتباط دارند.

۳- می‌تواند به صورت همزمان توسط یک سلول B بیان شوند.

۴- تمامی موارد فوق

۵- هیچ کدام

ث) در ایجاد تنوع اتصال ایمونوگلوبولین ها موارد ----- دخالت دارند.

۱- برش و اتصال RNA

۲- بازآرایی DNA

۳- توالی های پیام نوترکیبی

۴- قانون اتصال یک طرفه / دو طرفه

۵- جایگاههای سویچ

ج) یک سلول B هنگامی صلاحیت دار می شود که

۱- در پی بازآرایی محصول دار قطعات ژنی ناحیه متغیر زنجیره سنگین

۲- در پی بازآرایی محصول دار قطعات ژنی ناحیه متغیر زنجیره سبک

۳- در پی تغییر کلاس

۴- طی بلوغ میل ترکیبی

۵- در پی اتصال سایتوکاین های T_H به پذیرنده هایشان بر سطح سلول B

چ) مکانیسمی که منجر به تولید ایمونوگلوبولین به اشکال ترشحي و غشایی می گردد کدام است

۱- انحصار آلی

۲- بیان هم غالب

۳- تغییر کلاس

۴- قانون اتصال یک طرفه / دو طرفه

۵- پردازش تمایزی RNA

۵- چه مکانیسم‌هایی، سه ناحیه فوق‌العاده متغیر (CDR) را در زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین ایجاد می‌کنند؟ چرا سومین ناحیه فوق‌العاده متغیر (CDR3) از دو تای دیگر متغیرتر می‌باشد؟

۶- به شما یک رده سلولی میلومای کلون شده داده شده که IgG با فرمول مولکولی $\gamma 2\lambda 2$ ترشح می‌کند. هر دو زنجیره سبک و سنگین این رده سلولی توسط ژن‌های آلل ۱ کد می‌شوند. اشکالی را که هر یک از ژن‌های زیر می‌تواند در این رده سلولی رخ دهد را با نمادهای زیر مشخص کنید: G: شکل رده زایا، R: شکل بازآرایی شده محصول دار. NR: شکل بازآرایی شده فاقد محصول. دلیل انتخاب خود را بیان کنید:

- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| الف. آلل ۱ زنجیره سنگین | ت. آلل ۱ زنجیره A |
| ب. آلل ۲ زنجیره سنگین | ث. آلل ۱ زنجیره λ |
| پ. آلل ۱ زنجیره κ | ج. آلل ۱ زنجیره λ |

۷- شما یک رده سلولی لنفوم B دارید که برای هر دو آلل زنجیره سنگین، بازآرایی فاقد محصول صورت می‌دهد. بازآرایی زنجیره سبک DNA آن چیست؟ چرا؟

۸- مشخص کنید هر یک از تغییرات کلاس زیر قابل انجام می‌باشد (بله) یا نمی‌باشد (خیر).

- | | |
|---------------|---------------|
| a. IgM به IgD | d. IgA به IgG |
| b. IgM به IgA | e. IgM به IgG |
| c. IgE به IgM | |

۹- یک مزیت و یک اشکال افزودن نوکلئوتید N را هنگام بازآرایی قطعات ژنی زنجیره سنگین Ig را توضیح دهید.

۱۰- کریستالوگرافی اشعه x بسیاری از مولکول‌های آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های متناظر خود، مشخص کرده که CDR3 هر دو زنجیره سبک و سنگین به اپی‌توپ اتصال

می‌یابند. علاوه بر آن، آنالیزهای توالی نیز مشخص کرده‌اند که تنوع CDR3 بیشتر از CDR1 و CDR2 می‌باشد. مکانیسمی که موجب تنوع بیشتر CDR3 می‌شود چیست؟

۱۱- تعداد شانس‌های یک سلول B در تولید یک ژن عملکردی زنجیره سبک ایمونوگلوبولین چقدر است؟

۱۲- کلمات زیر را با توضیحات آورده شده (۱ تا ۱۱) مطابقت دهید. هر توضیح می‌تواند یک بار یا بیش از یک بار به کار رود یا اصلاً استفاده نشود.

الف) RAG و RAG2

ب) آنزیم‌های ترمیم شکستگی دو رشته (DSBR)

پ) اتصالات کد کننده

ت) RSSها

ث) نوکلئوتیدهای P

ج) نوکلئوتیدهای N

چ) پروموتورها

ح) تشدید کننده‌ها

۱- اتصالات میان قطعات ژنی ایمونوگلوبولین که حین بازآرایی ایجاد می‌شوند.

۲- منبع تنوعی زنجیره‌های سنگین آنتی‌بادی

۳- توالی‌های تنظیمی DNA

۴- توالی‌های محافظت شده DNA که در مجاورت قطعات V، D و J قرار گرفته‌اند و به بازآرایی مستقیم ژن‌ها کمک می‌کنند.

۵- آنزیم‌هایی که در Bهای در حال تکامل بارز می‌شوند.

۶- آنزیم‌هایی که در Bهای بالغ بیان می‌شوند.

۷- توالی نوکلئوتیدی که در نزدیکی هر قطعه رهبر در ژن ایمونوگلوبولین واقع شده و RNA پلی‌مراز به آن متصل می‌شود.

۸- محصول حاصل از شکست ساختار سنجاق‌سری

۹- آنزیم‌هایی که در موش‌های SCID نقص دارند.

۱۰- توالی‌های نوکلئوتیدی که میزان نسخه‌برداری از ژن‌های بازآرایی شده ایمونوگلوبولین را در مقایسه با DNA رده زایا به شدت افزایش می‌دهند.

۱۱- نوکلئوتیدهای اضافه شده توسط آنزیم TdT

۱۲- بسیاری از لنفوم‌های سلول B، Ig سطحی را بر روی غشای پلاسمایی خود بیان می‌کنند. می‌توان این آنتی‌بادی لنفوم را جداسازی کرد و یک آنتی‌بادی منوکلونال ضد ایدئوتایپ موشی با ویژگی و میل ترکیبی بالا تولید کرد. چرا مراحل باید طی شود تا این آنتی‌بادی منوکلونال موشی را بتوان در انسان مورد استفاده قرار داد؟ آیا این احتمال وجود دارد که این آنتی‌بادی مهندسی شده بتواند به صورت کلی برای بیماران مبتلا به لنفوم مفید باشد؟

۱۳- هر کدام از فعالیت‌های زیر در چه سطحی (DNA یا RNA) تعیین می‌شوند؟

الف) آنتی‌بادی غشایی در برابر ترشحی

ب) IgM در برابر IgD

پ) اتصال V-J

ت) IgA در برابر IgE

ث) اتصال V-D-J

۱۴- براساس پیش‌گویی ژنتیکی تمایل به تولید IgE، گرایش به آلرژی شدن می‌تواند به ارث برسد. هر چند که آنتی‌ژنی که فرد به آن آلرژی دارد (آلرژن) به ارث نمی‌رسد. با توجه به چگونگی ایجاد ویژگی آنتی‌بادی، این تضاد آشکار را توضیح دهید.