

Пренареждане на гените на имуноглобулините и на Т-клетъчния рецептор (TCR).  
Биосинтеза на имуноглобулините. Причини за разнообразието в имуноглобулините и на Т-клетъчния антиген-разпознаващ рецептор

Антителата се синтезират от клас левкоцити – В-лимфоцити или В-клетки. След антигенен стимул тези клетки се диференцират до плазмоцити, които са специализираните Ab синтезиращи клетки. Всяко едно Ab има два задължителни елемента, които са V и C региони, съответно вариабилен и относително постоянен фрагмент. Първоначално се е смятало че за всяко Ab има отделен ген или че настъпват соматични мутации в В клетките. В последствие е доказано чрез хибридизация на ДНК от ембрионални клетки и от плазмоцит че в ембрионалните клетки се получават два фрагмента с различна молекулна маса, отговарящи за синтезата на едно Ab и това е подсказало възможността за осъществяване на пренареждане в ембрионалната ДНК по време на диференциацията на В клетките. Гените, кодиращи информация за Ab не се унаследяват директно, а се асемблират от набор от отделни генни сегменти, представени в генома. Този процес протича по време на развитието на В-клетките от стволови клетки в костния мозък.

Гени за леките вериги

Всяко едно антитяло има две  $\lambda$  или две  $\kappa$  леки вериги. ДНК на ембрионалните клетки и всички клетки през индивидуалното развитие на бозайниците с изключение на зрелите В-лимфоцити съдържат локус, кодиращ  $\kappa$  леките вериги и друг за  $\lambda$  леките вериги. Тези локуси се състоят от вариабилен регион в 5' края си, който представлява библиотека вариабилни гени (V), имащи лидерни последователности (L). Тази област е силно интронирана. След вариабилния регион са разположени няколко J сегменти и един или два константни (C). J сегментите са тандемно разположени на около 20 kb от 3' края на вариабилния регион. Всеки V ген има уникална секвенция и може да е разположен и в двете транскрипционни посоки, докато J и C сегментите са само в 5' → 3' ориентация.

По време на антиген независимата диференцировка на чисто случаен принцип става комбиниране на един V ген с един J сегмент. Това присъединяване се осъществява от ензимите Rag1 и Rag2, които разпознават 3' крайната секвенция на V сегментите и 5' на J сегментите. Района между тях се изрязва и отстранява (делеция), но присъединяването може да стане и чрез инверсия, когато V гена е разположен в обратна на транскрипционната посока. Формира се пренаредена  $\kappa$  верига на ДНК ниво.

След този първи етап пренаредената ДНК се транскрибира до иРНК предшественик. Следва процесинг и формиране на зряла иРНК, като се изрязват всички интрони. Прибавя се поли А опашка, сар структура и накрая се отстранява лидерната секвенция.

### Гени за тежките вериги

Функционалните гени, кодиращи тежките вериги на Ab се формират вследствие на процеси, подобни на тези при гените за леките вериги. Анализите на Ag-Ab взаимодействието са показали че вариабилните домени на тежката верига вероятно са от по-голямо значение за разпознаване на Ag. Затова при тежките вериги разнообразието е дори по-голямо и съществуват три библиотеки от генни сегменти. Третата библиотека е от D-сегменти и е разположена между  $V_H$  и  $J_H$  сегментите.  $V_H$ -гените са повече на брой, има поредица от D-сегменти (около 20), 6 J-сегмента и поредица от C-гени. Част от C-гените кодират отделни константни домени, след които следват тези за експресия на IgM, IgD, после са сегментите за отделните класове IgG, сегментите за IgE и накрая тези за IgA. Това подреждане осигурява пренареждане в областта на вариабилните домени от комбинациите на V, D и J сегментите. Следователно при един и същи клас имуноглобулини може да има различни антиген свързващи свойства, както и имуноглобулини с еднакви антиген свързващи свойства да принадлежат към различни класове. На първия етап от пренареждането се комплектоват D и J сегменти, а на втория етап се присъединява и V-ген. След транскрипция се образува незряла иРНК, която се процесира до крайна иРНК, като е възможно да се извърши и алтернативен сплайсинг. На този етап се предопределя от кой клас ще са имуноглобулините. Синтезата на IgM и на второ място на IgD е благоприятствана. Това са първите имуноглобулини, които се синтезират при имунен отговор. Дефинира се период на превключване на класа при който вследствие алтернативен сплайсинг се транслират имуноглобулини от друг клас, но със запазване на антиген свързващите им свойства.

За леките вериги са открити около 40 V гена за  $\kappa$  типа и около 30 за  $\lambda$ . За тежките вериги гените са около 65. Съответно D-сегментите са 27, J-сегментите са 5  $\kappa$  и 4  $\lambda$ . Разнообразието, което може да се получи е  $10^6$ - $10^7$ , и то само на база брой възможни комбинации между генните сегменти.

Други фактори за внасяне на допълнително разнообразие са прибавянето на допълнителни нуклеотиди. Характерно е главно за гените на тежките вериги. Разделят се на P и N нуклеотиди, като вторите попадат на случаен принцип и не са кодирани от матрица. Внасянето на P нуклеотиди всъщност е вмъкване на къси палиндромни

последователности. Ако при пренареждането се получи приплъзване, това води до смяна на рамката на четене. В този случай може да се стигне до непродуктивно пренареждане поради появата на ранен стоп кодон. В противен случай може да се получи имуноглобулин с променени антиген свързващи свойства. Често срещано явление е възникването на соматични мутации поради висока честота на грешки при репликацията в къс период от диференциацията и със зле функциониращи репарационни системи. В крайна сметка разнообразието достига  $10^{12}$ - $10^{14}$  възможни комбинации.

Rag ензимите са ендонуклеази. Те разпознават типични последователности, фланкиращи генните сегменти. Те са съответно хептамер-23 базови двойки-нонамер и наонамер-12 базови двойки-хептамер, наречени RSS последователности. Реаранжирането се постига с делеция или с инверсия, когато V-гена е ориентиран в обратна на четенето посока.

За разделянето на разтворими и мембранни имуноглобулини има допълнителни сегменти. За секреторните това е s-регион в края на C-сегмента на тежката верига. Ако след алтернативен сплайсинг се добавят други два сегмента се транслира регион от 20-25 хидрофобни аминокиселини и имуноглобулина се интеркалира в мембраната. В този си вид се нарича антиген разпознаващ B-клетъчен рецептор, който се експресира по време на Ag независимата диференцировка. Смятало се е, че след взаимодействие с антигена този рецептор предава сигнал, променя клетъчната експресия и се достига до крайно диференциране и секреция на имуноглобулин. Възможността за трансдукция, обаче, се ограничава от късия вътреклетъчен участък. Освен имуноглобулин, трябва да съществуват по два хетеродимера,  $\alpha$  и  $\beta$  с имуноглобулинов фолдинг, които са членове на имуноглобулиновото суперсемејство. B-клетъчния разпознаващ рецептор е от имуноглобулиновото суперсемејство, мембранно свързан и е изграден от хетеродимери с дълги вътреклетъчни участъци, асоциирани с тирозин кинази.

### Гени за T-клетъчен Ag-разпознаващ рецептор (TCR)

Подобно на имуноглобулините, огромното разнообразие от Ag налага наличието на огромно количество различни TCR, за чието постигане има няколко генетични предпоставки. Основното разнообразие се постига благодарение на наличието на библиотеки от V гени и J сегменти. При свързване на тези сегменти е възможна промяна в рамката на четене и получаване на допълнително разнообразие, стига това пренареждане да не се окаже непродуктивно поради генериране на стоп кодони. Други фактори, които осигуряват заедно над  $10^{12}$  и дори до  $10^{14}$  възможности е внасянето на

допълнителни Р и N нуклеотиди.

Генните сегменти, отговорни за синтезата на TCR, са следните:

- V гени на  $\alpha$  веригите.
- V гени на  $\delta$  веригите.
- D и J сегменти на  $\delta$  веригите.
- C гени за константните домени на  $\delta$  веригите.
- J сегменти на  $\alpha$  веригите.
- C гени за константните домени на  $\alpha$  веригите.

Те участват в експресията на  $\alpha$  ППВ от  $\alpha$ - $\beta$  и  $\delta$  от  $\gamma$ - $\delta$  типовете TCR, като за другите два типа ППВ има подобни сегменти.

Пренареждането на V, J и C гени води до получаване на пренаредена ДНК, която носи информация само за  $\alpha$  ППВ. Следва транскрипция, сплайсинг на незрялата иРНК и формиране на TCR от L-ППВ. Възможно е TCR да има удвоен D-сегмент в  $\beta$  ППВ, за разлика от BCR (тежката верига). Чрез третия хипервариабилен регион (CDR3) TCR контактува с представения Ag. При него се наблюдават разлики не само в аминокиселинната последователност, но и в размера му и това се предопределя от наличието на допълнителния D сегмент. За разлика от имуноглобулиновите гени, при TCR не се наблюдават хипермутации. Друга разлика е че сравнително рядко се достига до генериране на стоп кодон при приплъзване и това дава три репродуктивни

възможности за смяна на рамката на четене. Ензимите, осъществяващи пренареждането са същите като при имуноглобулиновите гени (Rag1 и Rag2).

За TCR от типа  $\alpha$ - $\beta$  има около 52 V-гена за  $\alpha$  веригата и около 80 за  $\beta$ . За  $\beta$  веригата има и два D сегмента с три възможни рамки на четене. J сегментите са 13 за  $\alpha$  и 61 за  $\beta$  веригите. Възможното разнообразие след реализиране на всички възможности за генерирането му достига  $10^{18}$  комбинации, което осигурява огромна потенциална възможност за отстраняване на чуждеродни структури.

По време на диференциацията на В-клетките първо се осъществява пренареждане на тежката верига на BCR, като първо се комбинират D и J сегментите и след това се присъединява V гена. Това започва още на ниво про-В-клетка. При непродуктивно пренареждане в едната хромозома започва пренареждане в другата и само ако и там не се получи такова, клетката загива по пътя на апоптозата. При продуктивно пренареждане се синтезира пълноценна тежка верига върху пре-В-клетка, която се експресира в комплекс със сурогатна лека верига, която не е истинската. Тогава започва пренареждане и на леката верига, което отново се осъществява и на втората хромозома, ако първото е неуспешно. Допълнителна възможност за продуктивно пренареждане се дава от пренареждането на генните сегменти за  $\lambda$  веригата. Такова се наблюдава само ако пренареждането на гените за  $\kappa$  веригата е било неуспешно и върху двете хромозоми. Това определя и по-малкото представяне на  $\lambda$  веригите в популацията от В-лимфоцити.

Така пренаредения ген за BCR се експресира на повърхността на наивните В-клетки. При среща с Ag, който да бъде разпознат започва Ag зависима диференцировка и при превръщането на В-клетките в плазмоцити вследствие на алтернативен сплайсинг започва синтеза на Ab от другите имуноглобулинови класове, първоначално разтворима форма на IgM и при следваща среща със същия Ag на основните Ab от IgG класа. Важна характеристика на превключването на класа е запазването на същите Ag свързващи свойства на вече ефекторната В-клетка.

Хронологията на пренареждане на гените за TCR следва същите принципи по време на Ag независимата диференцировка на Т-клетките, като отново първо се пренареждат гените на  $\beta$  веригата, тя първоначално се експресира в комплекс с помощна молекула gp33 и в последствие се комбинира с функционална  $\alpha$  верига.