ความหลากหลายของยีนอิมมูโนโกลบูลิน (Diversity of immunoglobulin genes)

อิงอร กิมกง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
E-mail: fsciiok@ku.ac.th, ingorn.kimkong@gmail.com

บทคัดย่อ

อิมมูโนโกลบูลิน เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่ในเลือดและสารคัดหลั่งต่างๆ ในร่างกาย ทำหน้าที่เป็นตัวจับจำเพาะสำหรับแอนติเจนที่จำเพาะและเริ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสำหรับชนิดที่อยู่บนผิวเซลล์ นอกจากนี้ยังมีชนิดที่หลั่งออกมาจากพลาสม่าเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ในการจับกับแอนติเจนและก่อให้เกิดผลต่างๆ เพื่อทำลายแอนติเจนนั้นๆ ซึ่งมีอยู่มากมายนับไม่ถ้วน อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันของเรามีความสามารถในการสร้างอิมมูโนโกลบูลินที่แตกต่างและมีความความจำเพาะได้เพียงพอต่อความต้องการ โดยในระหว่างที่บีเซลล์เจริญเติบโต ยีนของอิมมูโนโกลบูลินจะมีการจัดเรียงตำแหน่งใหม่ โดยอาศัยกลไกการเชื่อมต่อกันของยีน ทำให้ได้อิมมูโนโกลบูลินที่มีความหลากหลายจำนวนมากพอในการจับกับแอนติเจน

คำสำคัญ: อิมมูโนโกลบูลิน, บีเซลล์, การจัดเรียงตำแหน่งใหม่

Abstract

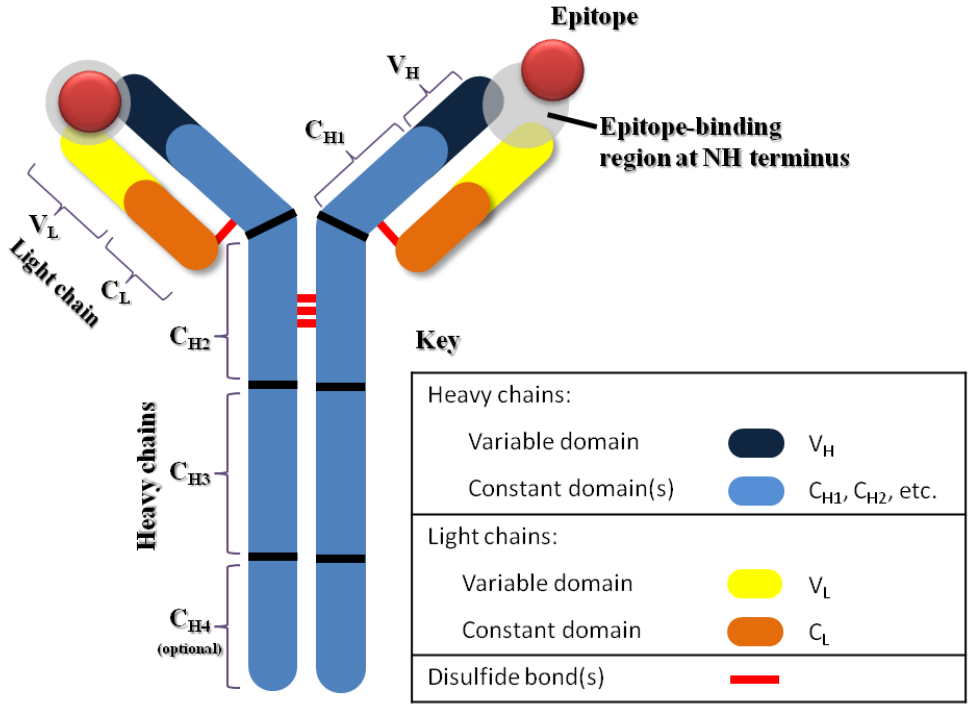
Immunoglobulins are glycoproteins that are found in blood and other bodily fluids. Their functions act as specific antigen receptor and initiate a humoral immune response for membrane-bound type. In addition, there are immunoglobulins secreted from plasma cells, which bind to antigens and trigger several effector mechanisms that eliminate the antigens. A trillion antigens were found. However, the immune system could generate enough different immunoglobulins with different antigen specificities using the mechanism of gene rearrangement. This mechanism occurs during B cell development to generate enormous diversity of immunoglobulins.

Key words: Immunoglobulins, B cell, gene rearrangement

บทนำ

อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin-Ig) เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่ในเลือดและสารคัดหลั่งต่างๆ ในร่างกาย ในเลือดอิมมูโนโกลบูลินจะอยู่ในส่วนของน้ำเหลือง (serum) เรียกอิมมูโนโกลบูลินชนิดนี้ว่า secreted Ig ถ้านำน้ำเหลืองมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จะพบว่าอิมมูโนโกลบูลินส่วนใหญ่เป็นแกมมาโกลบูลิน (γ-globulin) และประกอบด้วยเบต้าโกลบูลิน (β-globulin) และแอลฟาโกลบูลิน (α-globulin) เป็นส่วนน้อย (Tiselius และ Kabat, 1939) นอกจากสารน้ำแล้ว อิมมูโนโกลบูลินยังพบได้บนผิวของเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocyte (B cell) เรียกอิมมูโนโกลบูลินชนิดนี้ว่า membrane-bound Ig (mIg) หรือ surface Ig (sIg) ทำหน้าที่เป็นตัวจับจำเพาะ (receptor) สำหรับแอนติเจน (antigen-Ag) ที่จำเพาะและเริ่มกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดย B lymphocyte เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น plasma cell สร้าง secreted Ig หรือแอนติบอดี (antibody-Ab) ออกมาเพื่อจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะและก่อให้เกิดผลต่างๆ ตามมาเพื่อทำลายแอนติเจนนั้นๆ (LeBien และ Tedder, 2008)

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน (รูปที่ 1) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 4 สาย ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) สองสายสั้นเรียกว่า Light chain (L) และสองสายยาวเรียกว่า Heavy chain (H) โดยปลายด้าน amino terminal (NH_2) ของทั้งสองสายจะมีส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างมากระหว่างอิมมูโนโกลบูลินแต่ละโมเลกุล จึงเรียกบริเวณนี้ว่า variable region (V) และปลายด้าน carboxy terminal (COOH) จะมีกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่ เรียกว่า constant region (C) (Mix และคณะ, 2006) สำหรับ ส่วน V region ทำหน้าที่ในการจับกับส่วนของแอนติเจน ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 2.58×10^{19} แบบ (Berger, 2004) ดังนั้นถ้าเป็นไปตามทฤษฎี “one gene one polypeptide” (Davis, 2007) จะต้องมียีนของอิมมูโนโกลบูลินมากกว่า 2.58×10^{19} ยีน เพื่อให้เพียงพอในการสร้างแอนติบอดีสำหรับจับกับแอนติเจนมากมายเหล่านี้ แล้ว genomic DNA จะบรรจุข้อมูลมากมายเหล่านี้ได้อย่างไร



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน (ภาพดัดแปลงจาก Doan และคณะ, 2007)

ทฤษฎีความหลากหลายของแอนติบอดี

นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามอธิบายถึงทฤษฎีความหลากหลายของแอนติบอดีดังต่อไปนี้

1. Germ-line theory

ทฤษฎีนี้เชื่อว่าในจีโนม (genome) มียีนของอิมมูโนโกลบูลินจำนวนมากพอที่จะสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะที่หลากหลายได้มากกว่า 2.58×10^{19} แบบ (Berger, 2004) ทฤษฎีนี้เป็นไปไม่ได้ที่จีโนมของมนุษย์สามารถจะบรรจุข้อมูลมากมายเหล่านี้ได้ทั้งหมด และในปัจจุบันหลังจากโครงการจีโนมมนุษย์ หรือ The Human Genome Project (HGP) ได้ทำการถอดรหัส DNA ทั้งหมดในจีโนมออกมาทำให้เราทราบว่าจีโนมมนุษย์มียีนบรรจุอยู่ประมาณ 20,000-25,000 ยีนเท่านั้น (Consortium, I.H.G.S., 2004)

2. Somatic mutation theory

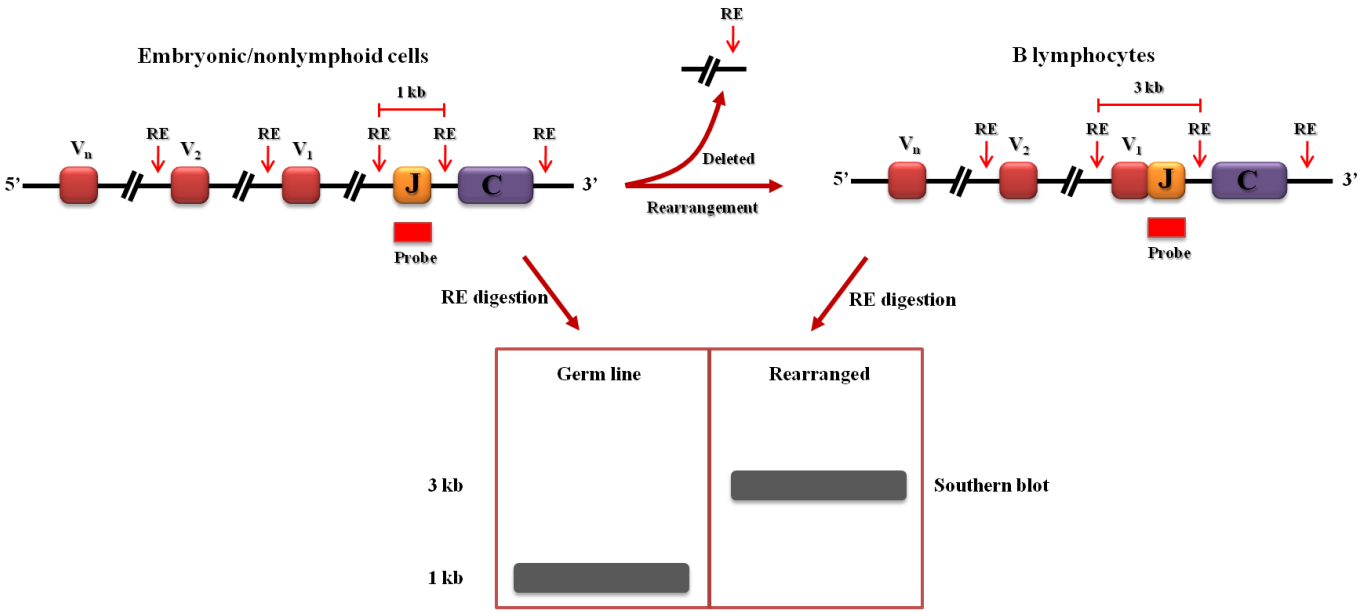
ทฤษฎีนี้กล่าวว่าในจีโนม (genome) ยีนของอิมมูโนโกลบูลินสำหรับการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะมีจำนวนจำกัด แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีที่เกิดขึ้นมาจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกาย (somatic cell) บางชนิด ในระหว่างที่เซลล์เจริญเติบโต (Lederberg, 1959; Jerne, 1971)

3. Two-gene model

ทฤษฎีนี้เสนอโดย Dreyer และ Bennett เป็นทฤษฎีที่ขัดแย้งกับกฎการสร้างโปรตีนที่ว่า “one gene one polypeptide” โดยทั้งสองเชื่อว่าน่าจะมีอย่างน้อย 2 ยีนมาประกอบกันเป็นอิมมูโนโกลบูลิน ยีนหนึ่งสร้าง V region อีกยีนหนึ่งสร้าง C region และยีนสำหรับสร้าง V region มี

เป็นจำนวนมากให้เลือกใน germline โดยในระหว่างที่เป็น DNA ยีน 2 ชุดนี้จะมีการจัดเรียงตำแหน่งใหม่ในจีโนมและรวมกันทำให้ได้อิมมูโนโกลบูลินที่สมบูรณ์ จะเห็นว่าทฤษฎีนี้มีส่วนคล้ายกับ germ-line theory และ somatic mutation theory จึงเรียกว่า somatic recombination theory (Dreyer และ Bennett,1965) ซึ่งไม่ได้จำเพาะเพียงแค่มนุษย์เท่านั้น สัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเกือบทุกชนิดอาศัยทฤษฎีนี้ในการสร้างอิมมูโนโกลบูลินเช่นเดียวกัน (Papavasiliou และ Schatz, 2002)

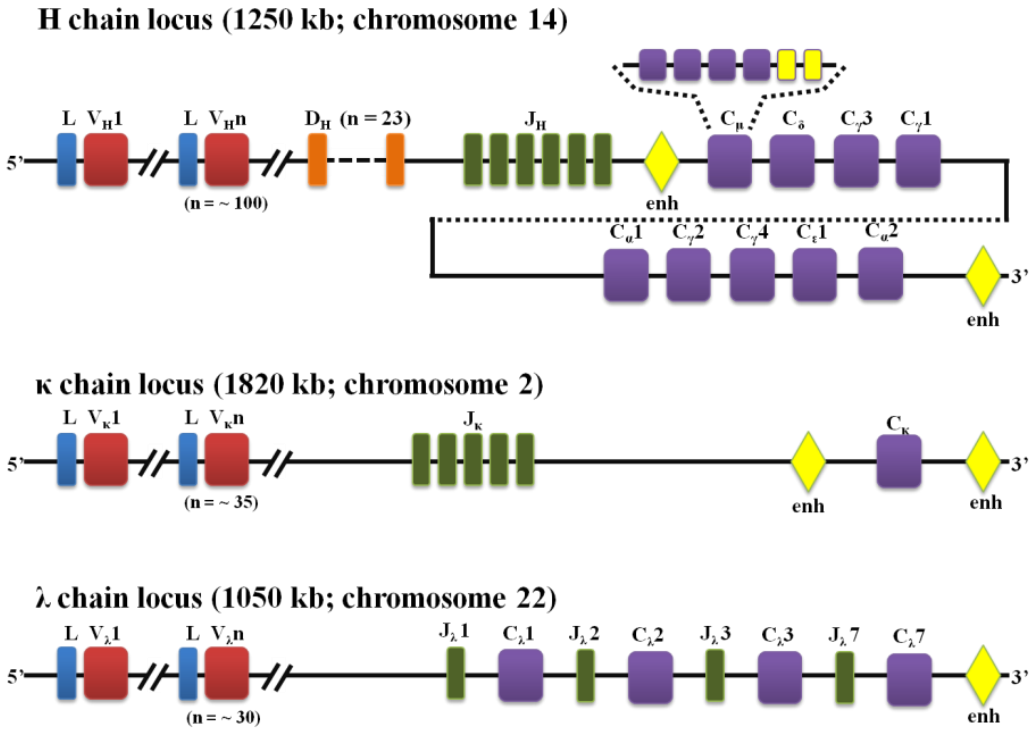
ต่อมาในปี ค.ศ.1976 Susumu Tonegawa ได้พิสูจน์สมมติฐานของ Dreyer และ Bennett โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization ซึ่ง Tonegawa ได้นำ genomic DNA จากเซลล์ตัวอ่อน (embryonic cells) หรือเซลล์ที่ไม่ได้มีหน้าที่สร้างแอนติบอดี (nonlymphoid cells) และ B lymphocytes มาตัดด้วย restriction endonuclease แล้วแยกด้วย gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำ Southern blotting แล้ว hybridized กับ probe ที่เป็นส่วนของ J segment หลังจากทำ autoradiography จะเห็นว่าตำแหน่งของ J segment เปลี่ยนแปลงไป โดย genomic DNA จาก embryonic cells จะมีขนาด 1 kb ส่วน genomic DNA จาก B lymphocytes มีขนาด 3 kb (รูปที่ 2) แสดงว่าระหว่างที่ B lymphocytes เจริญเติบโต อิมมูโนโกลบูลินจะมีการจัดเรียงหรือสับเปลี่ยนตำแหน่งใหม่ (rearrangement) จากงานวิจัยนี้ทำให้ Tonegawa ได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1987 (Tonegawa, 1983)



รูปที่ 2 แสดงการทดสอบว่ามีการจัดเรียงตำแหน่งใหม่ (rearrangement) ของอิมมูโนโกลบูลิน (ภาพดัดแปลงจาก Goldsby และคณะ, 2003)

ยีนของอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin genes)

จากการศึกษาโดยการ clone DNA ของอิมมูโนโกลบูลินทั้ง heavy chain และ light chain พบว่ายีนที่กำหนดการสร้าง heavy chain, κ light chain และ λ light chain ของมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 14, 2 และ 22 ตามลำดับ (Mix และคณะ, 2006) และยีนจะแบ่งออกเป็นหลายๆ ส่วน (gene segment) โดยยีนที่กำหนดการสร้าง heavy chain จะประกอบด้วยกลุ่มยีนที่กำหนดการสร้าง variable region อยู่ทางด้านปลาย 5' ได้แก่ยีน V (variable) มีประมาณ 100 แบบ, ยีน D (diversity) และ J (joining) ประมาณ 23 และ 6 แบบ ตามลำดับ กลุ่มยีนที่กำหนดการสร้าง constant region (ยีน C) จะอยู่ต่อจากกลุ่มยีนที่กำหนดการสร้าง V region มีอยู่ประมาณ 9 แบบ ส่วน κ และλ light chain ประกอบด้วยยีน V ประมาณ 35 และ 30 แบบ, ยีน J มีประมาณ 5 และ 4 แบบ ตามลำดับ สำหรับยีน C มีเพียงแบบเดียวใน κ light chain ส่วน λ light chain มีประมาณ 4 แบบ (รูปที่ 3)

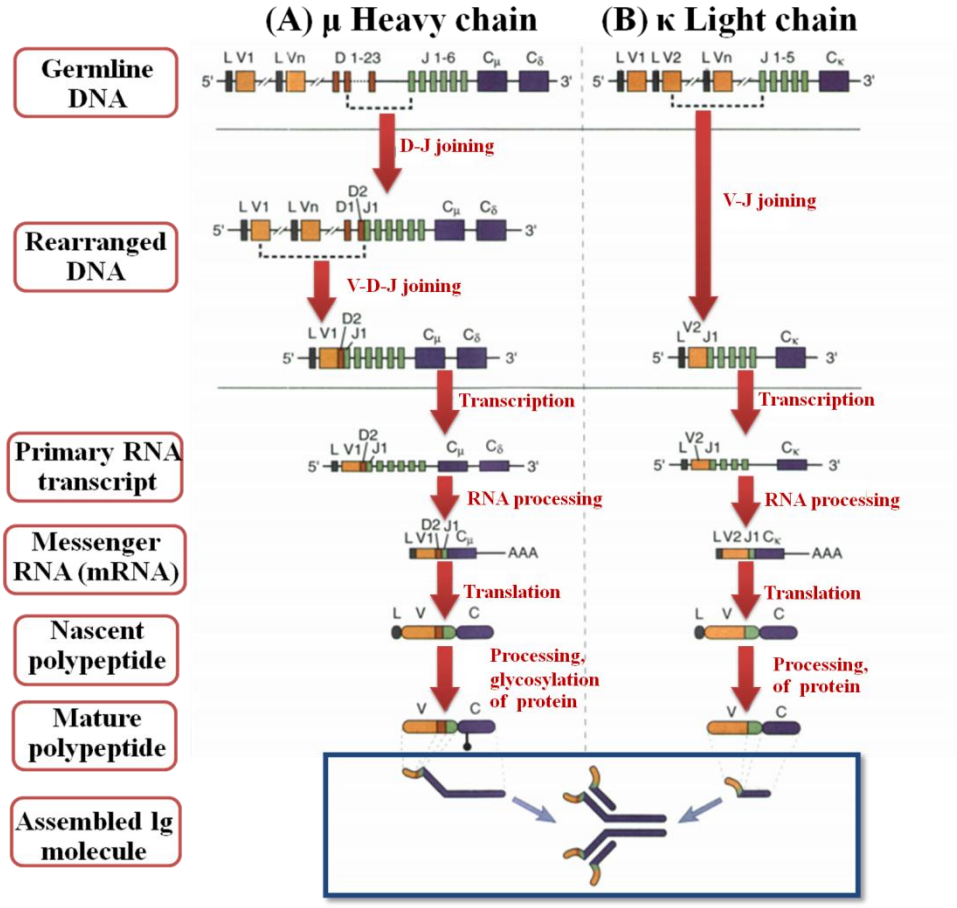


รูปที่ 3 แสดง Germline organization ของยีนอิมมูโนโกลบูลิน (ภาพดัดแปลงจาก Abbas และคณะ, 2007)

กลไกการสร้าง Heavy chain **และ** Light chain

ในเซลล์ตัวอ่อน (embryonic cell) ยีนที่ควบคุมการสร้าง heavy chain ประกอบไปด้วยยีน V, D, J และ C นอกจากนี้บริเวณหน้ายีน V จะมี leader sequence (L) ควบคุมการสร้างโปรตีนซึ่งมีหน้าที่ในการนำโปรตีนที่สร้างแล้วออกนอกเซลล์ ในระหว่างที่เซลล์ตัวอ่อน

เปลี่ยนแปลงไปเป็น B cell ยีนเหล่านี้จะมีการจัดเรียงตำแหน่งของ DNAใหม่ โดยส่วนของ DNA ที่ไม่เกี่ยวข้องจะถูกตัดออกไปจนได้ยีนที่กำหนดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะชนิดเดียว การจัดเรียงตัวยีนของ heavy chain เริ่มจากการเชื่อมกันระหว่างยีน D และ J (D-J joining) บริเวณที่ไม่ต้องการจะถูกตัดออกไปเพื่อดึง D2 เข้ามาใกล้กับ J1 (รูปที่ 4A) จากนั้นยีน V1 จะเข้ามาเชื่อมกับยีน D2 (VDJ joining) ทำให้ได้ V1D2J1 ซึ่งเป็น active gene แต่ยังไกลจากยีน C มาก ซึ่งขั้นตอนต่อมา active gene นี้จะเป็นแม่พิมพ์ให้สร้าง primary RNA transcript และจะผ่านขบวนการตัดต่อ RNA (RNA splicing) ให้ได้ mRNA ที่มีหนึ่งชนิดของยีน V, D, J และ C จากนั้นจะถูกแปลรหัส (translation) ได้เป็นโพลีเปปไทด์ส่วน heavy chain (รูปที่ 4A) สำหรับยีนที่กำหนดการสร้าง light chain นั้นมีลักษณะคล้ายกันกับยีนที่กำหนดการสร้าง heavy chain เช่นกัน แต่ไม่มียีน D โดยการจัดเรียงตำแหน่งยีนของ light chain ก็จะเหมือนกับยีนของ heavy chain เช่นกัน เพียงแต่ไม่มีขั้นตอน D-J joining (รูปที่ 4B) หลังจากได้โพลีเปปไทด์ส่วน light chain ก็จะมีการรวมตัวกับโพลีเปปไทด์ของ heavy chain ได้เป็นโมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินที่สมบูรณ์ (Tonegawa, 1983)

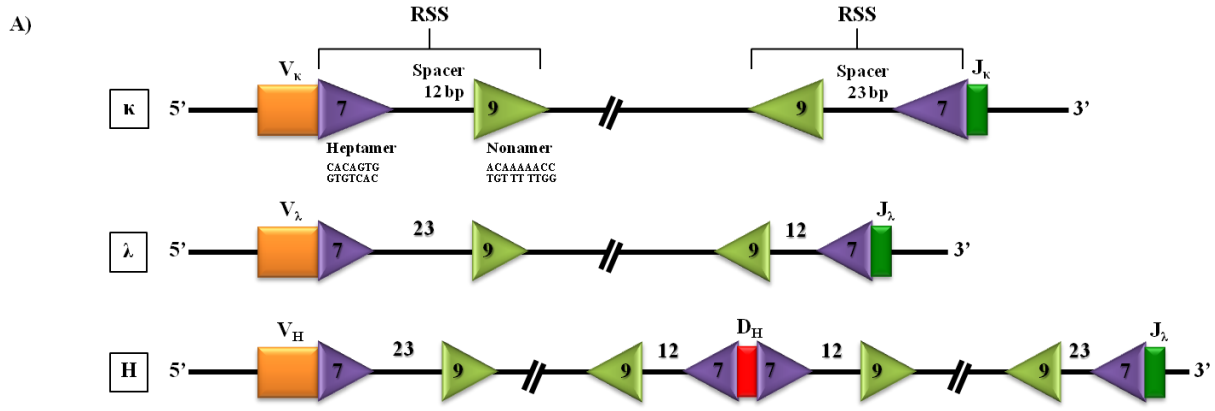


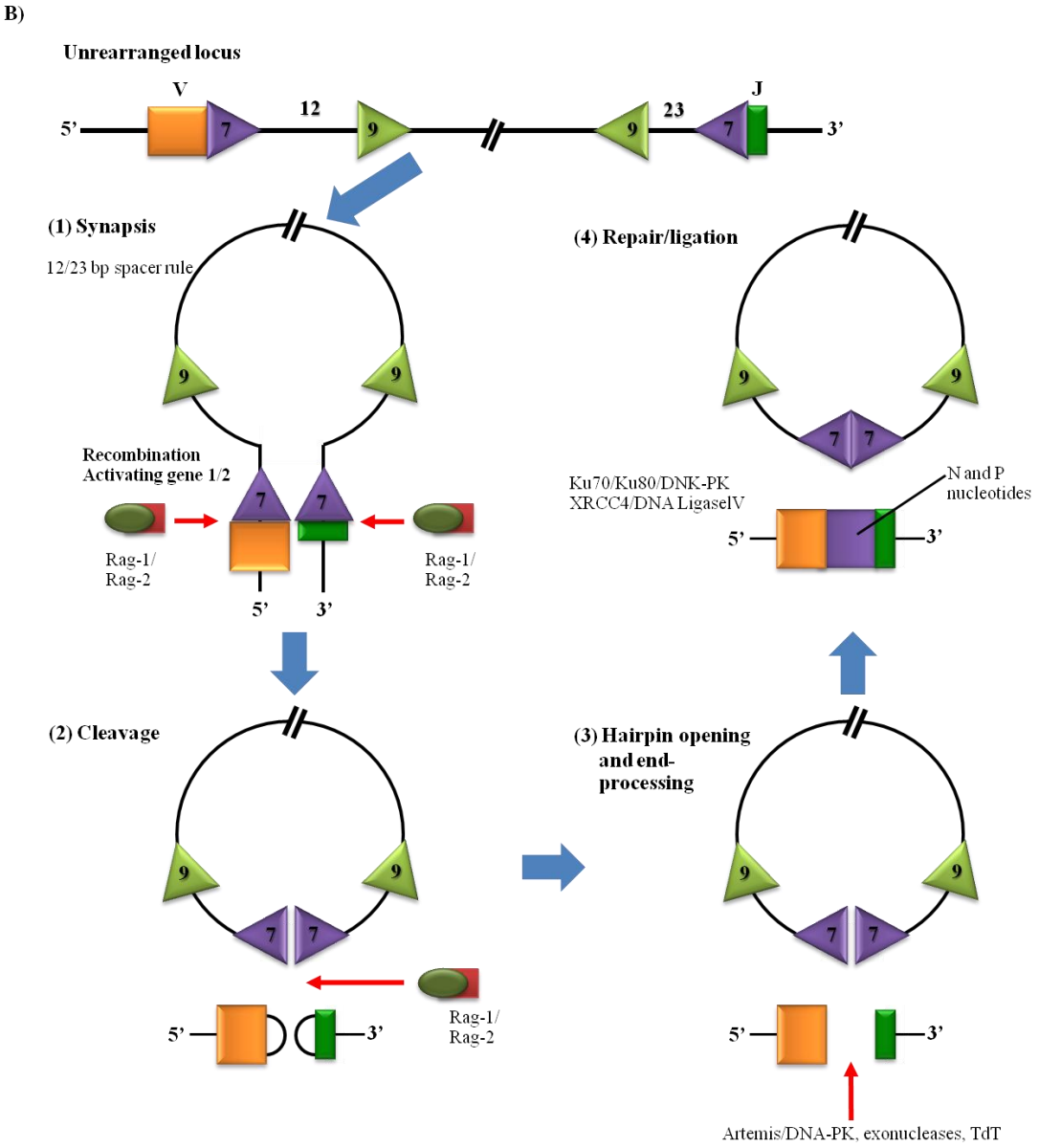
รูปที่ 4 แสดงกลไกการสร้าง Heavy chain (A) และ Light chain (B) (ภาพดัดแปลงจาก Abbas และคณะ, 2007)

กลไกการเชื่อมต่อกันของยีน (gene recombination)

สำหรับกลไกในการเชื่อมต่อยีน VJ หรือ VDJ พบว่าเป็นการเชื่อมต่อแบบ site specific จากรูปที่ 5A จะเห็นว่าด้านปลาย 3' ของยีน V ของ κ light chain มีลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved sequence) 7 ตัว (heptamer : 5'CACAGTG3') ต่อด้วยลำดับเบสคั่น (spacer) 12 คู่ ต่อด้วยลำดับเบสอนุรักษ์อีก 9 ตัว (nonamer : 5'ACAAAAACC3') ลำดับเบส heptamer-spacer-nonamer นี้เรียกว่า recombination signal sequence (RSS) ส่วนด้านปลาย 5' ของยีน J จะมี RSS เช่นกันแต่มีเบสคั่น 23 คู่ สำหรับ λ light chain มีลักษณะคล้ายกันกับ κ light chain แต่มีการสลับตำแหน่งของเบสคั่นในส่วนยีนของ heavy chain จะมี RSS บริเวณ 3' ของยีน V และ 5' ของยีน J เช่นกัน แต่ยีน D จะมี RSS ทั้งสองด้าน (Sakano และคณะ, 1979)

กลไกการเชื่อมต่อกันของยีน V(D)J แบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน (รูปที่ 5B) เริ่มจากกระบวนการ synapsis RSS ที่อยู่ทางด้าน ปลาย 3' ของยีน V จับคู่กับ RSS ที่อยู่ทางด้าน ปลาย 5' ของยีน J โดยมีส่วนที่ไม่ได้จับคู่ซึ่งอยู่ระหว่าง heptamer และ nonamer เป็นเบสคั่น 23 และ 12 คู่เบส ซึ่งการจับคู่นี้ต้องเกิดในลักษณะ 12/23 เสมอ (12/23 rule) และเกิดเป็นห่วง (loop) ขึ้นมา จากนั้นเอนไซม์ Recombination activating gene 1/2 (Rag1/Rag2) จะตัดบริเวณรอยต่อระหว่าง heptamer กับส่วนปลายของยีน จากนั้นบริเวณ 3' OH ของปลายยีนจะต่อกับอีกสายเกิดลักษณะเป็น hairpin เรียกกระบวนการนี้ว่า cleavage ขั้นตอนต่อมาคือ hairpin opening และ end processing โดย hairpin ถูกตัดโดยเอนไซม์ Artemis/DNA-PK (protein kinase) และมีการเติม nucleotide เข้าไปโดยเอนไซม์ TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) ในขั้นตอนสุดท้ายจะทำการซ่อมแซมโดยเอนไซม์ DNA-PK และเชื่อมต่อโดยเอนไซม์ DNA ligase IV เรียกขั้นตอนนี้ว่า repair/ligation (Gellert, 2002; Lieber, 2003)





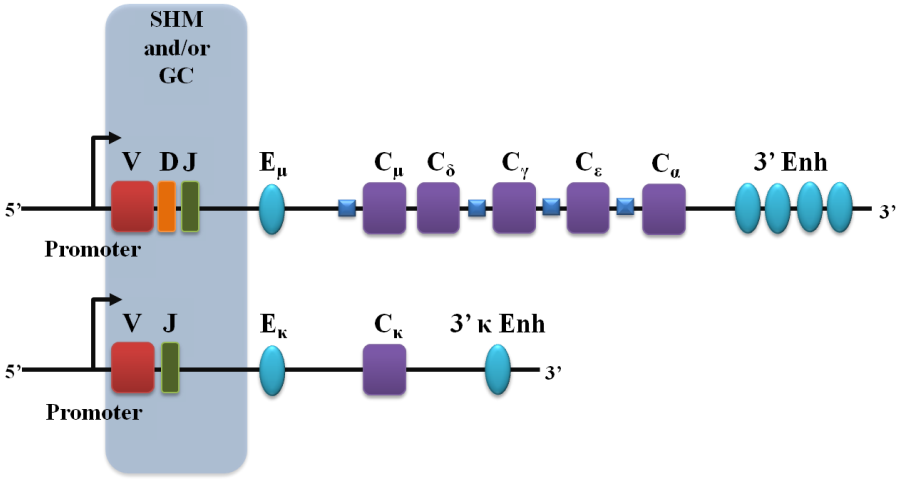
รูปที่ 5 แสดง (A) orientation ของ V(D)J gene segments และ recombination signal sequences (RSS); (B) กลไกการเชื่อมต่อกันของยีน (gene recombination)
(ภาพดัดแปลงจาก Abbas และคณะ, 2007)

Somatic hypermutation (SHM)

Mature B cell ที่ผ่านกระบวนการ V(D)J rearrangement เมื่อออกมาจากไขกระดูกแล้ว ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน โคลนที่จำเพาะต่อแอนติเจนจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในระหว่างการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนนี้จะมีการกลายพันธุ์แบบ point mutation เกิดขึ้นที่ V region เริ่มต้นจากประมาณ 150 ถึง 200 คู่เบสของ promoter และขยายต่อไปประมาณ 1.5 กิโลเบสก่อนถึงบริเวณ

intronic enhancer (Eμ) (รูปที่ 6) โดยอัตราการเกิดอยู่ที่ 1 ใน 1,000-100,000 คู่เบสต่อการแบ่งเซลล์ 1 ครั้ง (Rajewsky และคณะ, 1987) SHM เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเฉพาะในคนและหนู ในสปีชีส์อื่นๆ จะอาศัยกลไก gene conversion (GC) ในการเพิ่มความหลากหลายของแอนติบอดี (Weill a และ Reynaud, 1996) แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งสองกลไกนี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ activation-induced cytidine deaminase (AID) เพื่อเริ่มต้นกระบวนการเช่นเดียวกัน AID เป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะใน B cells ทำหน้าที่ในการดึงหมู่อะมิโนเพื่อเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) ของ ssDNA ในระหว่างการ transcription

AID ใน SHM จะทำการเปลี่ยนเบส C ไปเป็น U บนสาย DNA ในขั้นตอนของกระบวนการ transcription โดยมีปัจจัยร่วม (cofactor) ในปฏิกิริยานี้ด้วย ผลที่ได้คือ G-U mismatch ซึ่งจะถูกแก้ไขได้สองแบบ ในแบบแรกนั้น G-U mismatch จะถูกแก้ไขโดยกระบวนการ DNA replication ทำให้เกิดการกลายพันธุ์เปลี่ยนเบส C ไปเป็น T หรือ กระบวนการกำจัดเบส U โดยเอนไซม์ uracil N glycosylase (UNG) ซึ่งจะทำให้เกิดเบสว่าง (abasic site)โดยเบสว่างนี่จะถูกซ่อมแซมผ่านกระบวนการ base excision repair หรืออาจจะผ่านกระบวนการ replication ซึ่งจะมีการเติมเบสใดลงไปก็ได้ ในแบบที่สอง MSH2 และ MSH6 ซึ่งเป็น Mismatch repair (MMR) proteins จะจับกับ G-U mismatches หรือ G-abasic mismatches และดึงโปรตีน MMR อื่นๆ เข้ามาเพื่อทำงานร่วมกับ error-prone polymerases ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์บนคู่เบส A/T (Li และคณะ, 2004; Frieder และคณะ, 2006; Teng G และ Papavasiliou FN, 2007)



รูปที่ 6 แสดงบริเวณการเกิด SHM และ GC ในยีนของ Ig heavy-chain (ภาพบน) และ light-chain (ภาพล่าง) (ภาพดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2004)

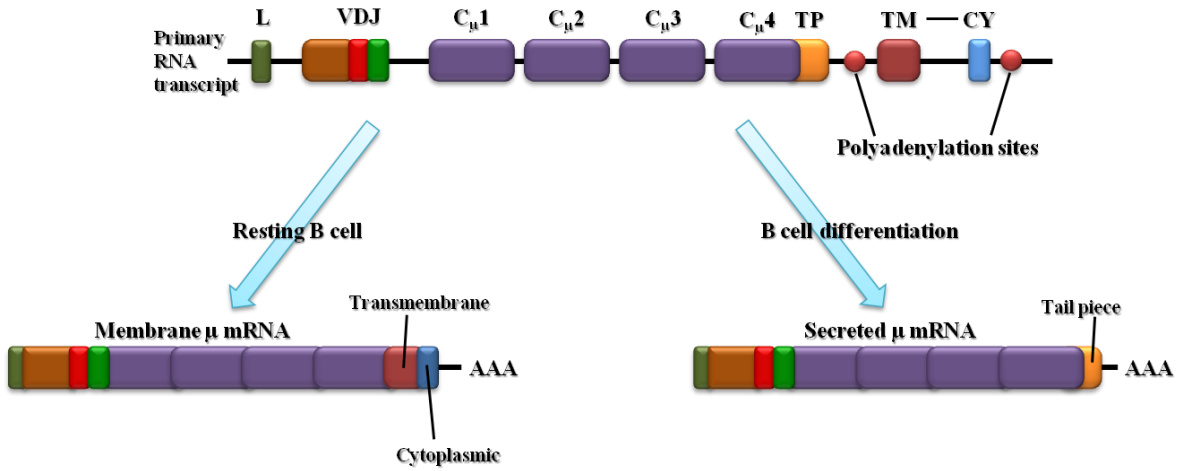
Class switch recombination (CSR)

B cell ที่มีการพัฒนาจนเป็นเซลล์ที่เติบโตเต็มที่จะมี IgM และ IgD บนผิวเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวจับจำเพาะแอนติเจน เมื่อมีแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายก็จะกระตุ้น B cell ให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell เพื่อสร้างแอนติบอดี โดย IgM และ IgD ที่อยู่บนผิวเซลล์จะหายไป และมีการสร้างแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ขึ้นมาแทน เช่น IgG, IgA และ IgE กระบวนการนี้เรียกว่า class switching ซึ่งเกิดจากการการสับเปลี่ยน class ของ heavy chain กลไกนี้เกิดขึ้นได้ทั้งในระดับ DNA และ RNA เริ่มจากเมื่อ naïve B cell ถูกแอนติเจนกระตุ้น ถ้าไม่มีสัญญาณจาก T cell ปกติ B cell ก็จะมีการสร้างออกมาเป็น IgM ซึ่งจะมีการนำยีน C_μ มาเชื่อมต่อกับยีน VDJ แต่ถ้ามีสัญญาณจาก T cell เช่น CD40L และ cytokine ต่างๆ B cell จะเปลี่ยนไปสร้างเป็น isotype อื่นๆ เช่น IgG หรือ IgE โดย VDJ จะถูกเชื่อมต่อกับ C_γ ส่วนที่คั่นระหว่างยีนจะโค้งขึ้นและถูกตัดออกไปได้เป็น primary RNA transcript จากนั้นก็จะถูกตัดออกไปพร้อม intron โดยกระบวนการ RNA splicing เหลือเฉพาะ $VDJC_\gamma$ และถูกแปลรหัสได้เป็นโปรตีน IgG สำหรับการสร้าง IgE จะมีกลไกที่คล้ายกันแต่จะมีการเชื่อมต่อ C_ε เข้ากับส่วนยีนของ V region (Li และคณะ, 2004; Mix และคณะ, 2006)

AID เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ CSR เช่นเดียวกันกับ SHM และ GC (Teng และ Papavasiliou, 2007) โดย AID สามารถเปลี่ยนเบส cytosine ไปเป็น uracil บริเวณ R-loop ในระหว่างกระบวนการ transcription โดย switch transcripts จะเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ R-loop มีความเสถียรมากยิ่งขึ้น หลังจากที่เบส cytosine จำนวนมากในบริเวณ R-loop ถูกเปลี่ยนเป็นเบส uracil โดย AID แล้ว เอนไซม์ uracil N glycosylase (UNG) จะกำจัดเบส uracil ออกไปทำให้เกิดเบสว่าง จากนั้นเอนไซม์ Apel endonuclease จะทำการตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งเบสว่างนั้น ทำให้เกิดบริเวณที่เรียกว่า nick บนทั้งสองสายของ DNA ซึ่งเป็น switch region ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ class switching (Li และคณะ, 2004; Frieder และคณะ, 2006)

การสร้าง membrane-bound Ig และ secreted Ig

จากที่กล่าวไว้ข้างต้น อิมมูโนโกลบูลิน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ membrane-bound Ig (mIg) และ secreted Ig เมื่อศึกษาอิมมูโนโกลบูลินทั้งสองชนิดนี้พบว่ามีความแตกต่างกันตรงส่วน constant **μ** chain (C_μ) โดยพบว่า mIg จะมีเปปไทด์ยาวเพิ่มขึ้นทางด้าน C-terminal โดยที่ทั้งสองชนิดมาจากยีนที่เป็นแม่พิมพ์เดียวกัน คือจะมี $VDJC_\mu$ แต่ mIg จะลอก (copy) เอาส่วน TM-CY (Transmembrane-Cytoplasmic) เพิ่มเข้ามาด้วยดังที่แสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงกลไกการสร้าง membrane-bound Ig และ secreted Ig (ภาพดัดแปลงจาก Abbas และคณะ, 2007)

สรุปปัจจัยที่ทำให้เกิดความหลากหลายของแอนติบอดี

นักวิทยาศาสตร์ได้ประมาณว่าคนเราสามารถสร้างแอนติบอดีได้มากกว่า 10^{19} การที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมากนี้มาจาก 6 ปัจจัยดังต่อไปนี้

1. Multiple germ-line segments

เนื่องจากว่ายีนที่ควบคุมการสร้างทั้ง H chain และ L chain มีจำนวนยีนมากมายหลายชุด โดย H chain มียีน V ประมาณ 100 แบบ ยีน D 23 และ J 6 แบบ สำหรับ κ light chain พบว่ามียีน V ประมาณ 35 แบบ และยีน J ประมาณ 5 แบบ ส่วน λ light chain มียีน V ประมาณ 30 แบบ และ ยีน J ประมาณ 4 แบบ

2. Combinational V(D)J joining

ในช่วงการพัฒนาของ B cell จะมีการเลือกยีน VDJ มาตัดต่อเพียงอย่างละ 1 แบบต่อ 1 เซลล์ ดังนั้นจึงทำให้ได้ V region มากมาย จากการคำนวณพบว่า heavy chain มีประมาณ (100 x 23 x 6) = 13,800 แบบ สำหรับ κ light chain มีประมาณ (35 x 5) = 175 แบบ ส่วน λ light chain มีประมาณ (30 x 4) = 120 แบบ รวมแล้วยีน V ของ L chain มีประมาณ 295 แบบ

3. Combinational association of heavy chain and light chain

การรวมตัวของ H และ L chain ในการสร้างอิมมูโนโกลบูลินที่สมบูรณ์นั้นจะเกิดการรวมตัวของ H และ L chain อย่างสุ่ม ดังนั้นจึงมีโอกาสสร้างแอนติบอดีที่มี V region ต่างๆ ได้มากถึง 13,800 x 295 = 4.07 x 10^6 แบบ

4. Junctional diversity

ความหลากหลายของแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นได้อีกมากจากการตัดต่อ DNA ในกลไกการรวมกันของยีนที่ควบคุมการสร้าง V region ในขั้นตอนที่มีการตัดบริเวณรอยต่อของยีนกับ heptamer ทำให้เกิดเป็น hairpin loop ซึ่งต่อมา loop จะถูกตัด ตรงบริเวณสาย DNA ที่สั้นกว่าจะมีการเติม complementary nucleotide เข้าไปโดยเอนไซม์ DNA polymerase เรียก nucleotide ชนิดนี้ว่า P nucleotide นอกจากนี้ nucleotide ยังสามารถถูกเติมเข้าไปได้อีกโดยเอนไซม์ TdT ซึ่งไม่ต้องอาศัย DNA ต้นแบบ (template) เรียก nucleotide ชนิดนี้ว่า N nucleotide การเติม P/N nucleotide เข้าไปอาจทำให้เกิดการเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (frameshift mutation) ส่งผลให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนชนิดใหม่ขึ้นมา นักวิทยาศาสตร์ได้ประมาณค่าความหลากหลายของแอนติบอดีจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนว่าจะมีการเพิ่มขึ้นจากเดิมอีกเป็นเท่าตัว (10^6) ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีความหลากหลายโดยรวมประมาณ 10^{12} แบบ

5. Somatic hypermutation (SHM)

SHM เป็นอีกกลไกหนึ่งที่เพิ่มความหลากหลายของแอนติบอดี โดยหลังจากที่กระบวนการจัดเรียงตัวเกิดขึ้นแล้ว mature B cell ที่ออกมาจากไขกระดูกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน โคลนที่จำเพาะต่อแอนติเจนจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในระหว่างนี้จะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นที่ V region โดยการทำงานของเอนไซม์ AID ซึ่งจะทำให้แอนติบอดีเพิ่มความชอบ (affinity) ต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ ได้อย่างจำเพาะทำให้ได้แอนติบอดีที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น

6. Class switch recombination (CSR)

Mature B cell ที่มีการแสดงออกของ IgD และ IgM บนผิวเซลล์ หลังจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน จะเกิดกระบวนการ CSR ขึ้นที่ switch sites ระหว่างยีน V_HDJ_H และ C_H โดยมีสัญญาณมาจาก helper T cell เช่น CD40L และ cytokine เพื่อเปลี่ยนไปสร้างเป็น isotype อื่นๆ เช่น IgG หรือ IgE หรือ IgA โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ AID เช่นเดียวกันกับกระบวนการ SHM ดังนั้นเมื่อรวมกับปัจจัยอื่นๆ น่าจะทำให้แอนติบอดีมีความหลากหลายได้มากกว่า 10^{19} แบบ

เอกสารอ้างอิง

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. 2007. Cellular and Molecular Immunology, 6th ed. W.B. Saunder company, Philadelphia.

Berger, G. 2004. Hypotheses on a germline origin of antibody diversity. Possible applications: Improvement of the efficiency of immune response and autoimmune disease treatment. Med Hypotheses. 63:847-854.

Consortium, I.H.G.S. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 431:931-945.

Davis, R.H. 2007. Beadle's progeny: Innocence rewarded, innocence lost. J Biosci. 32:197-205.

Doan, T., Melvold, R., Viselli, S. and Waltenbaugh, C. 2007. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology, 1st ed. Hearthside Publishing Services, Pennsylvania.

Dreyer, W.J. and Bennett, J.C. 1965. The molecular basis of antibody formation: A paradox. Proc Natl Acad Sci U S A. 54:864-869.

Frieder, D., Larijani, M., Tang, E., Parsa, J.Y., Basit, W. and Martin, A. 2006. Antibody diversification: Mutational mechanisms and oncogenesis. Immunol Res. 35:75-88.

Gellert, M. 2002. V(D)J recombination: Rag proteins, repair factors, and regulation. Annu Rev Biochem. 71:101-132.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J. and Osborne, B.A. 2003. Kuby Immunology, 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

Jerne, N.K. 1971. The somatic generation of immune recognition. Eur J Immunol. 1:1-9.

LeBien, T.W. and Tedder, T.F. 2008. B lymphocytes: How they develop and function. Blood. 112:1570-1580.

Lederberg, J. 1959. Genes and antibodies. Science. 129:1649-1653.

Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D. and Scharff, M.D. 2004. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. Genes Dev. 18:1-11.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. Nat Rev Mol Cell Biol. 4:712-720.

Mix, E., Goertsches, R. and Zett, U.K. 2006. Immunoglobulins--basic considerations. J Neurol. 253 Suppl 5:V9-17.

Papavasiliou, F.N. and Schatz, D.G. 2002. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: Merging mechanisms for genetic diversity. Cell. 109 Suppl:S35-44.

Rajewsky, K., Forster, I. and Cumano, A. 1987. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. Science. 238:1088-1094.

Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G. and Tonegawa, S. 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. Nature. 280:288-294.

Teng, G. and Papavasiliou, F.N. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. Annu Rev Genet. 41:107-120.

Tiselius, A. and Kabat, E.A. 1939. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. J Exp Med. 69:119-131.

Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 302:575-581.

Weill, J.C. and Reynaud, C.A. 1996. Rearrangement/hypermutation/gene conversion: When, where and why? Immunol Today. 17:92-97.