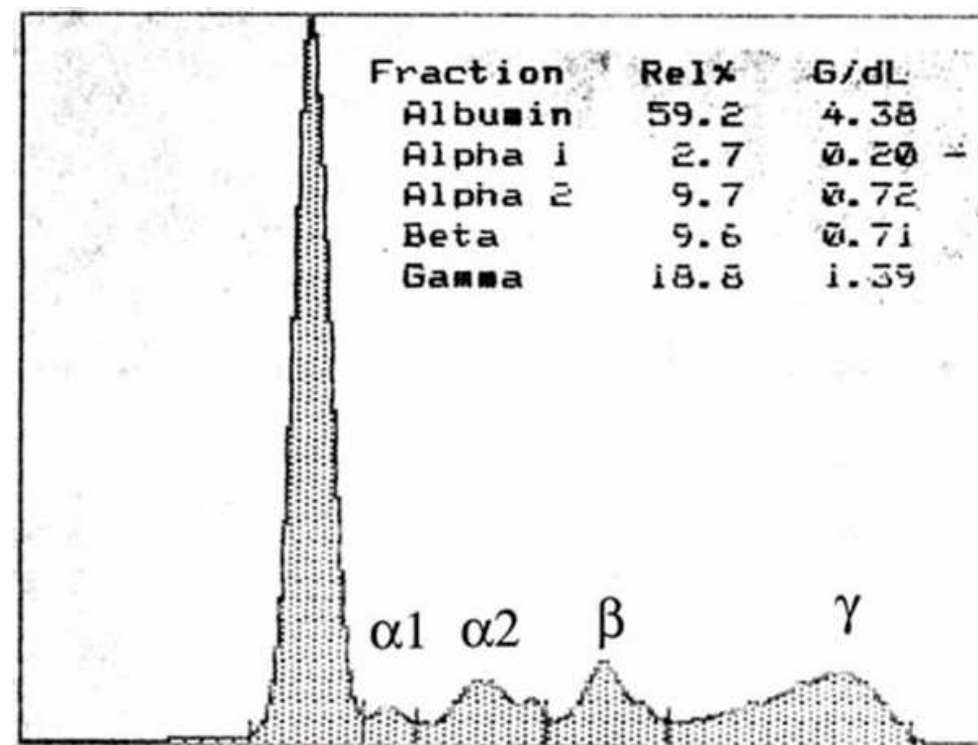
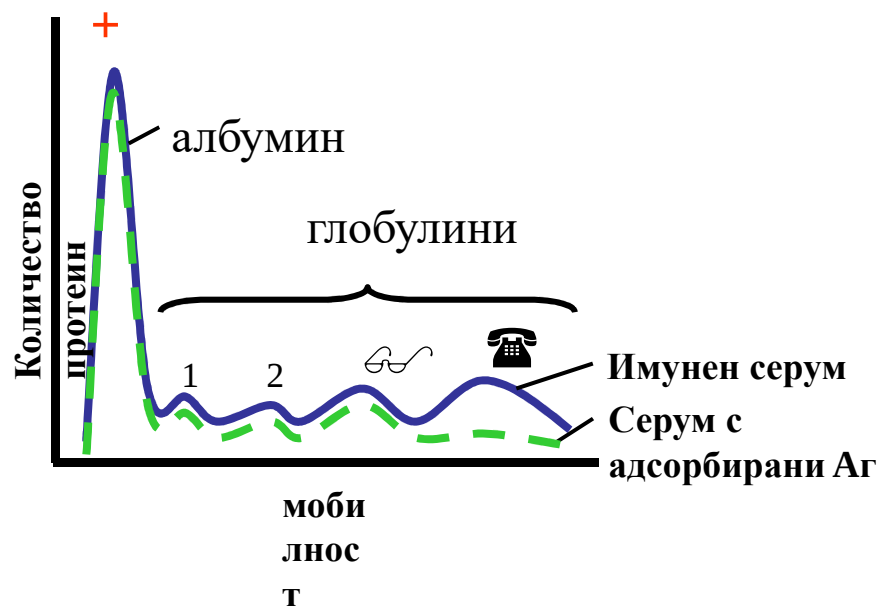


**Генетични основи на синтеза
на антитела.
Онтогенеза на В-лимфоцити.**

Доц. Милена Атанасова, д.б.
Ръководител сектор “Биология”
МУ-Плевен

- Определение за антитела: Гликопротеини, произвеждани и секретирани от плазматичните клетки в отговор на имуногенна/антигенна стимулация



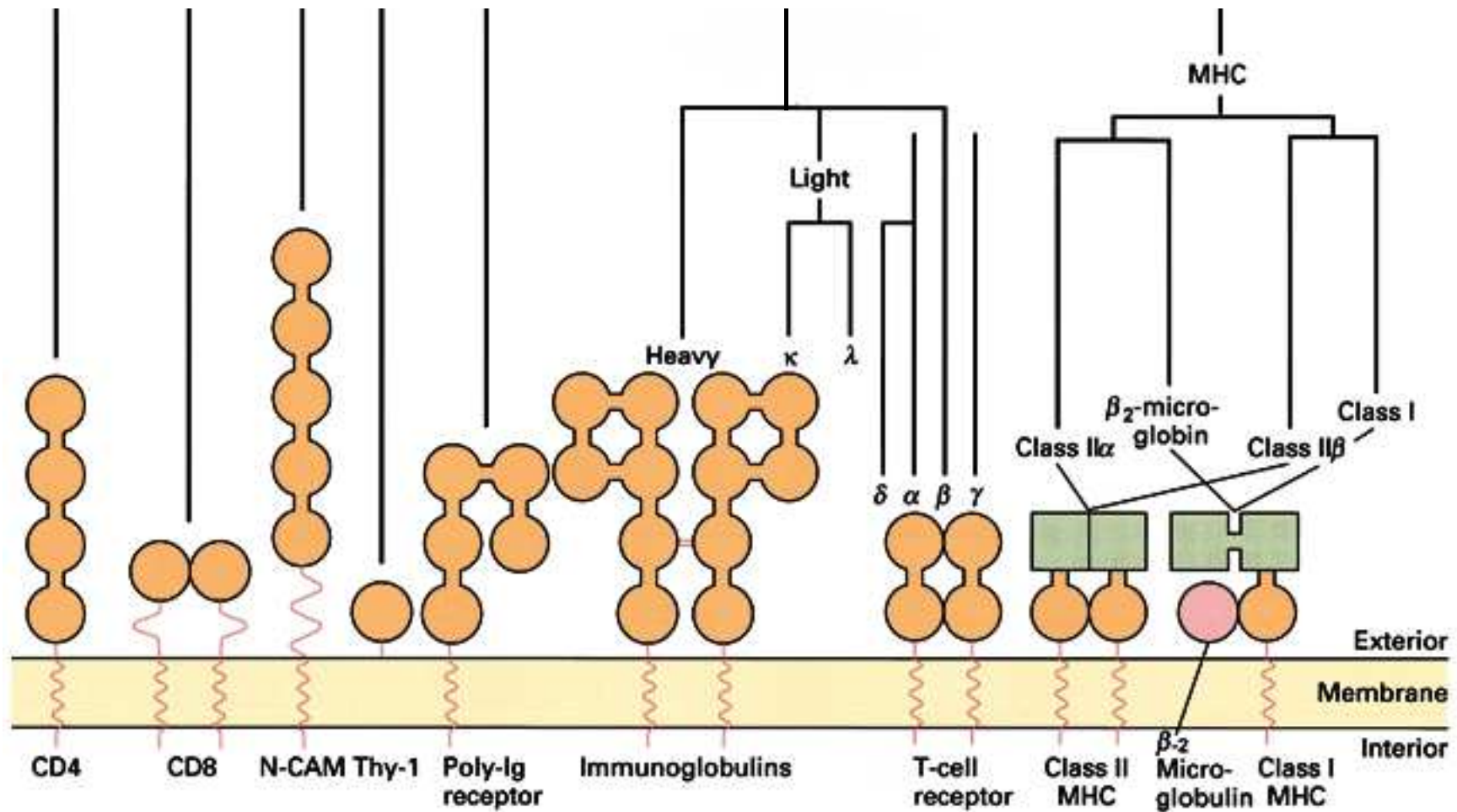
+



-

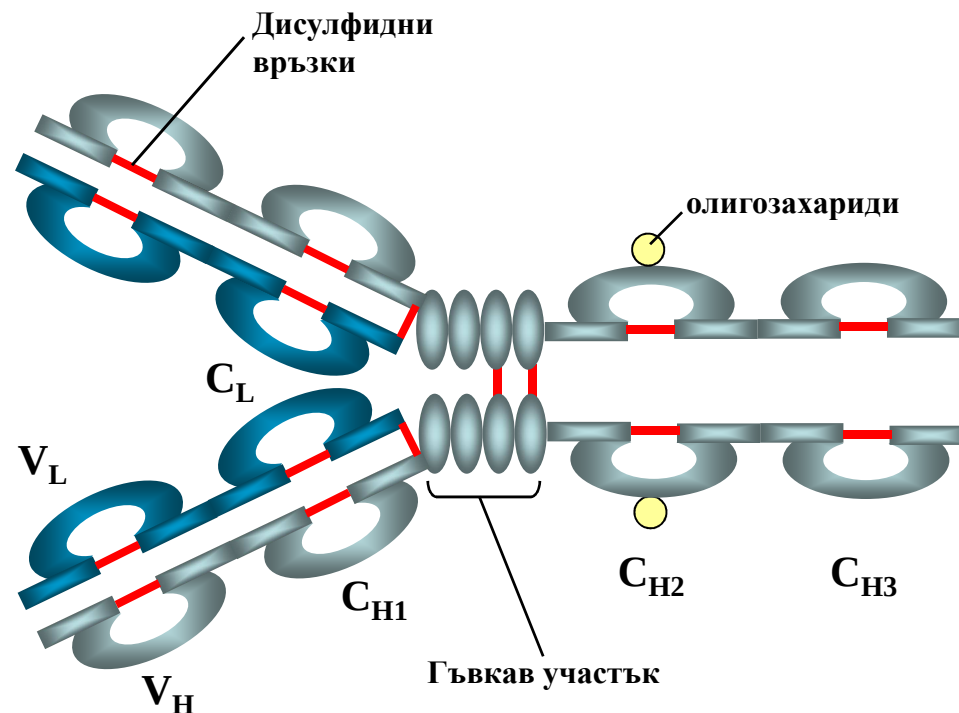
Ig суперсемејство

Ig принадлежат на консервативно генно суперсемејство. Членовите на това семејство гени се определат от присъствието на най-малко един хомоложен на основната Ат структура генен сегмент.



Структура на антителата

- Тежки и леки вериги
- S-S мостове
 - междуверижни
 - вътреверижни



Ig суперсемејство

- Първична структура 70-110 АК
- Вътреверижни S-S мостове - 50-70 АК – формират **домени**
- 2 основни хомоложни структури (установени с кристалографски анализ) - V и C участъци
- Третичната структура на V участъка има 9 антипаралелни β структури; стабилизират се с S-S мостове
- S-S стабилизира структурите, като образуваните домени са относително устойчиви на протеолитично разграждане

Класове и субкласове на човешките Ig

Ig class or subtype

property	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1,2	IgE	IgD
form	pentamer	mono	mono	mono	mono	dimer	mono	mono
serum level (mg/ml)	1.5	9	3	1	0.5	3.5	[#] 0.00005	0.03
Complement activation	+++	+++	+	+++	-	-	-	-
Placental transfer	-	+	+	+	+	-	-	-
macrophage (Fc receptor) binding	-	+	-	+	-	-	-	-
present in external secretions	mucus* etc	milk *	milk *	milk *	milk *	mucus* etc	-	-
mast cell/ basophil degranulation	-	++	-	-	-	-	+++ [*]	-

*(ВИДОВО-ЗАВИСЕЩИ)

стойност при неалергични
индивиди

СТРУКТУРНО РАЗНООБРАЗИЕ НА Ат

- 1965 – Хипотеза на Dreyer & Bennett – поне два гена за всяка полипептидна верига на Ат
- 1976 - Tonegawa & Hozumi – доказват хипотезата на Dreyer & Bennett при миша миеломна ДНК
- Ig гени претърпяват пренареждане по време на индивидуалното развитие (онтогенезата) на В-кл – основен механизъм за разнообразието на Ат.
- V-C пренареждането – единствено позната форма на сайт-специфично ДНК пренареждане при гръбначни.

СТРУКТУРНО РАЗНООБРАЗИЕ НА Ат

- В-клетките са способни да синтезират огромно разнообразие от Ат $\sim 10^{11}$ различни вида.
- **Как е възможно???**
- Огромното разнообразие се генерира от сравнително малък брой кодиращи ДНК, които се комбинират по няколко основни механизма:
 - 1) Соматична рекомбинация (комбинаторно съединяване на генни сегменти)
- 300 V_k генни сегменти 4 J генни сегменти
- 30 V_λ генни сегменти 15 D генни сегменти
- 1000 V_H генни сегменти

СТРУКТУРНО РАЗНООБРАЗИЕ НА АТ

2) Соматични мутации V генни сегменти

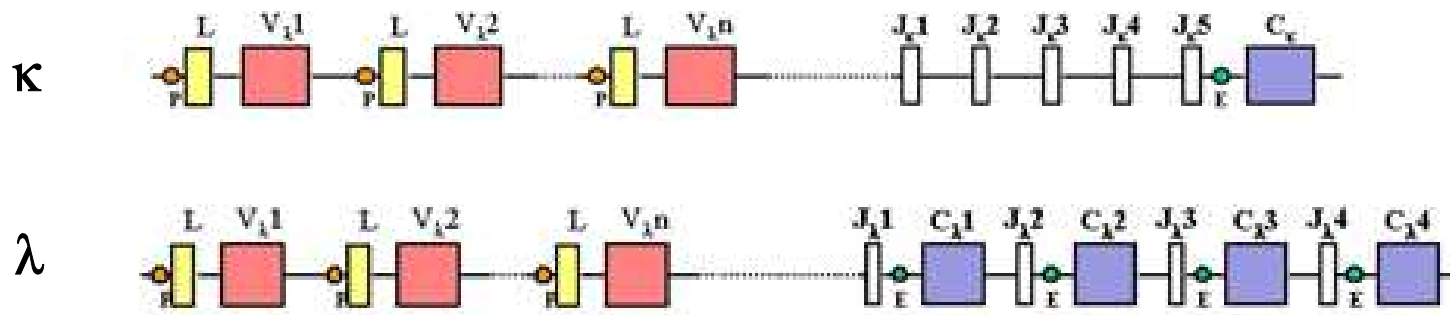
3) неточно свързване между V-J и V-D и D-J. Това увеличава разнообразието трикратно.

4) инсерция в N край. Вмъкване на 15 нуклеотида на случаен принцип. Процесът се катализира от дезоксинуклетидтрансфераза – ензим, който катализира полимеризация без необходимостта от матрица.

СТРУКТУРНО РАЗНООБРАЗИЕ НА АТ-КОЛКО НА БРОЙ?

- Комбинаторно разнообразие – **случайно групиране** на VJL и VDJH комбинации.
- Комбинаторното разнообразие се увеличава от възможността **всеки VH** сегмент да се комбинира с **който и да е VL** сегмент.
- **Случайното сдвояване** на 270 VL ($30 \times 5 = 150$ възможни V_{κ} + $30 \times 4 = 120$ възможни V_{λ}) с $\sim 11,000$ VH ($65 \text{ VH} \times 27 \text{ DH} \times 5 \text{ JH}$) = $\sim 3.5 \times 10^6$ възможни Ат специфичности.
- **Соматичните мутации**, неточното свързване, & N разнообразие увеличава разнообразието многократно.

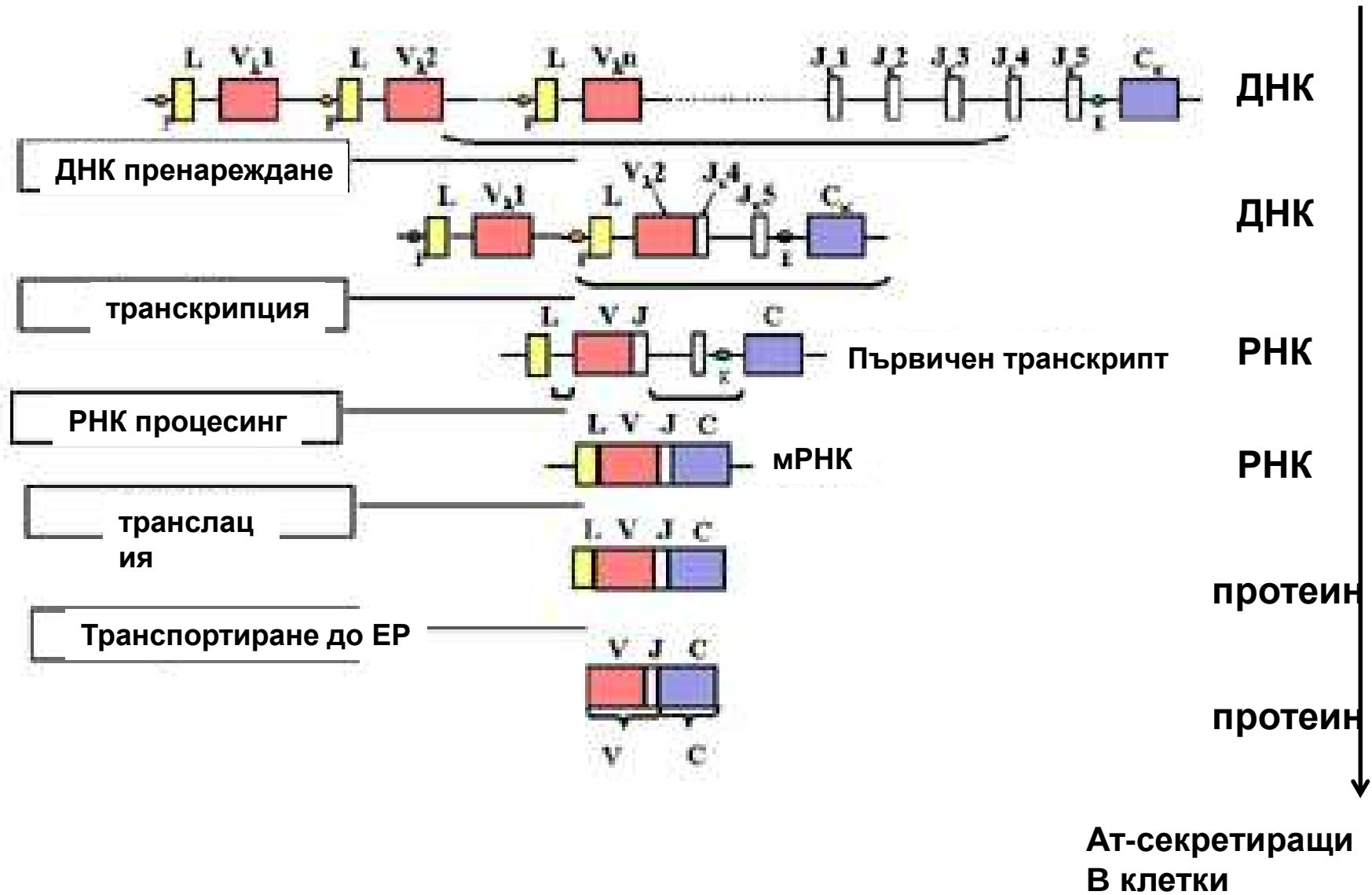
Соматична рекомбинация – пренареждане на L веригата



Зрелите L вериги, кодирани от 3 генни сегмента всяка: V, J, и C (вариабилен, свързващ и константен участък).

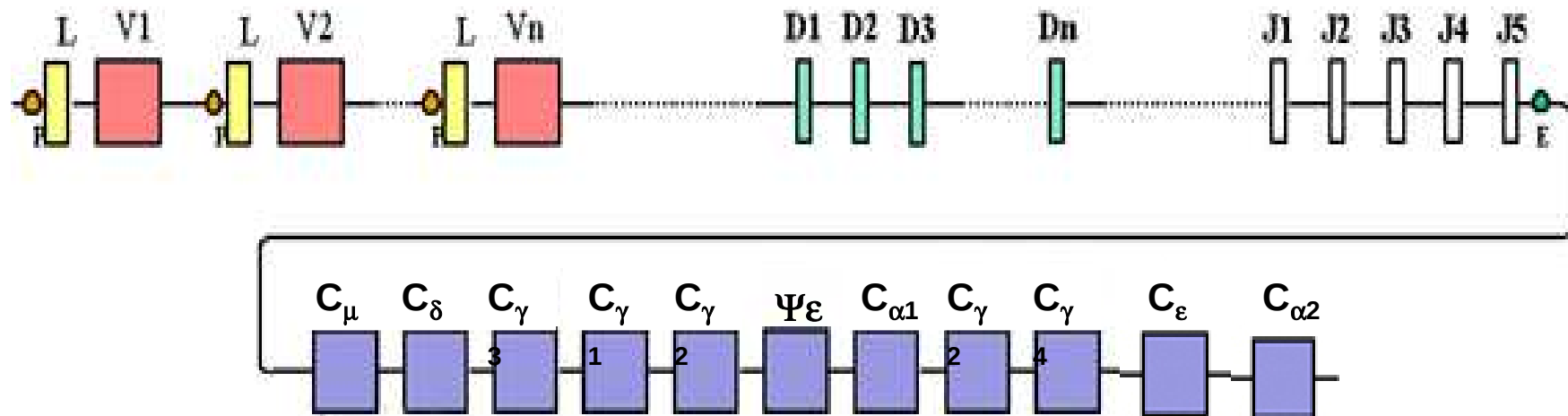
Мишият геном съдържа ~ 300 V, 5 J, и 1 C за κ веригата; 30 V за λ веригата.

L верига за Ig от герминативна ДНК на В клетки



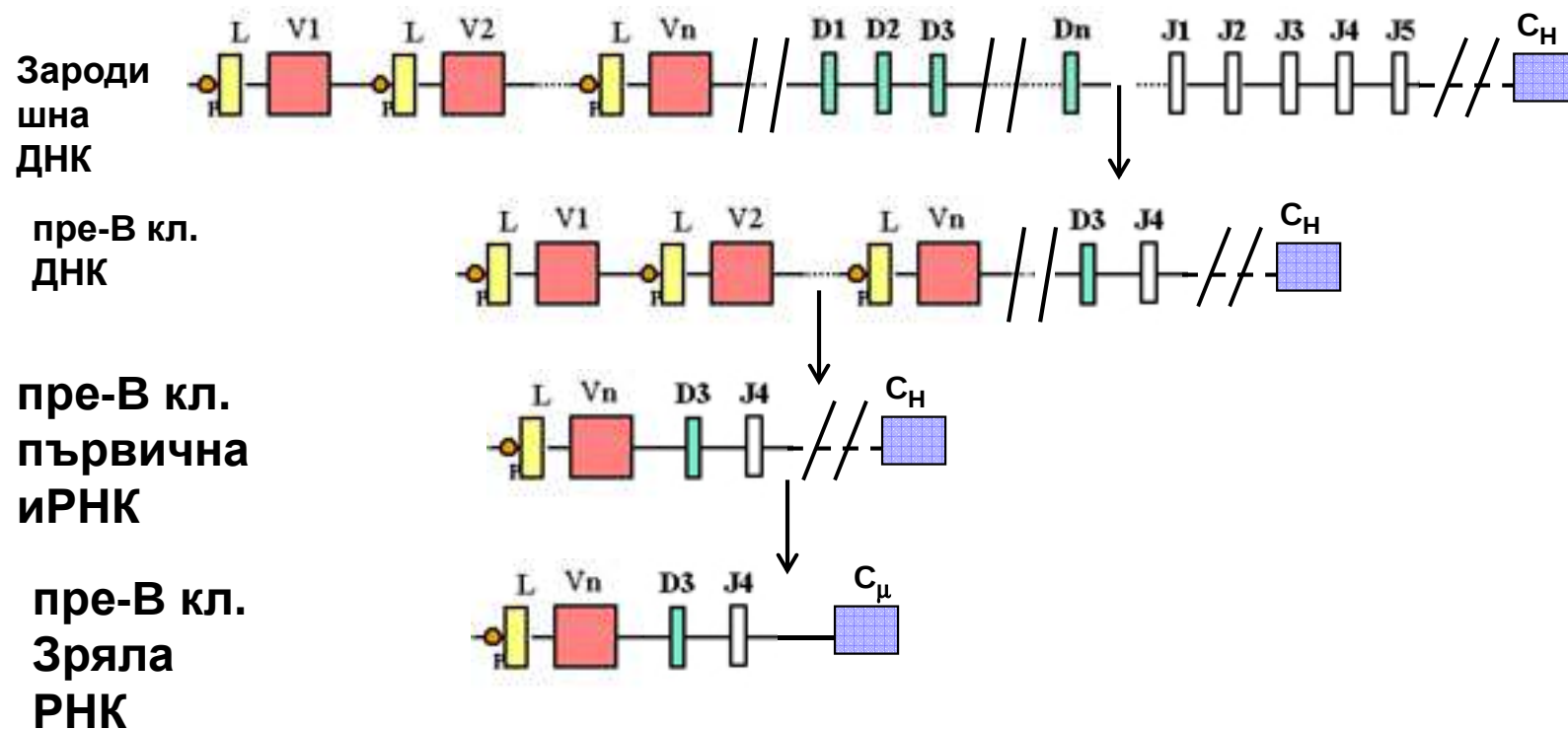
СОМАТИЧНО ПРЕНАРЕЖДАНЕ НА Н ВЕРИГА

$$V_n = 1000; D_n = 15$$



човешка Н верига

Соматична рекомбинация на H веригите



Пренареждане на H се осъществява в костния мозък и е част от развитието на В-кл. 1 D_H и 1 J_H се съединяват, като участъкът между тях се изрязва.

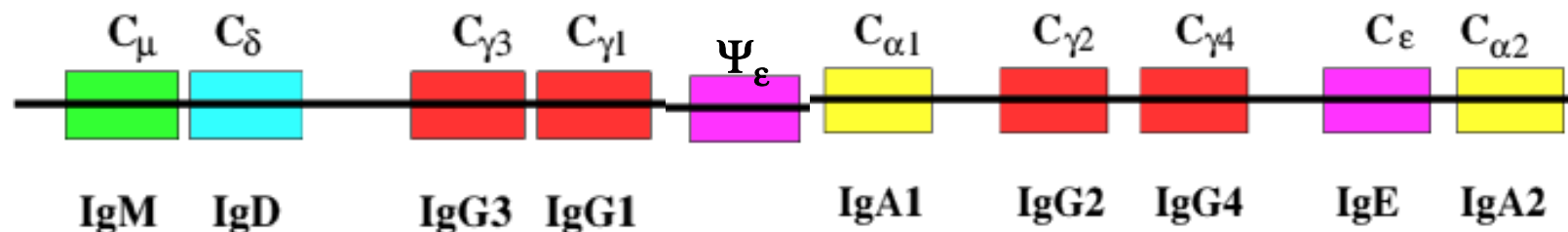
V_H се присъединява към DJ_H сегмента.

VDJ_H **не** се присъединява към C_H ; интроните се транскрибират в първична иРНК.

След изрязване на интроните на ниво РНК се получава зряла иРНК, която се транспортира до цитоплазмата и се транслира.

Лидерен участък (L) предхожда всеки V_H – сигнален участък, който транспортира H до ER;

Превключване на класа Ат по време на развитието на В кл.



Превключването на класа увеличава **функционалното** разнообразие на Ат.

Осъществява се след **Аг стимулация** и изисква продукция и секреция на Th2 цитокини.

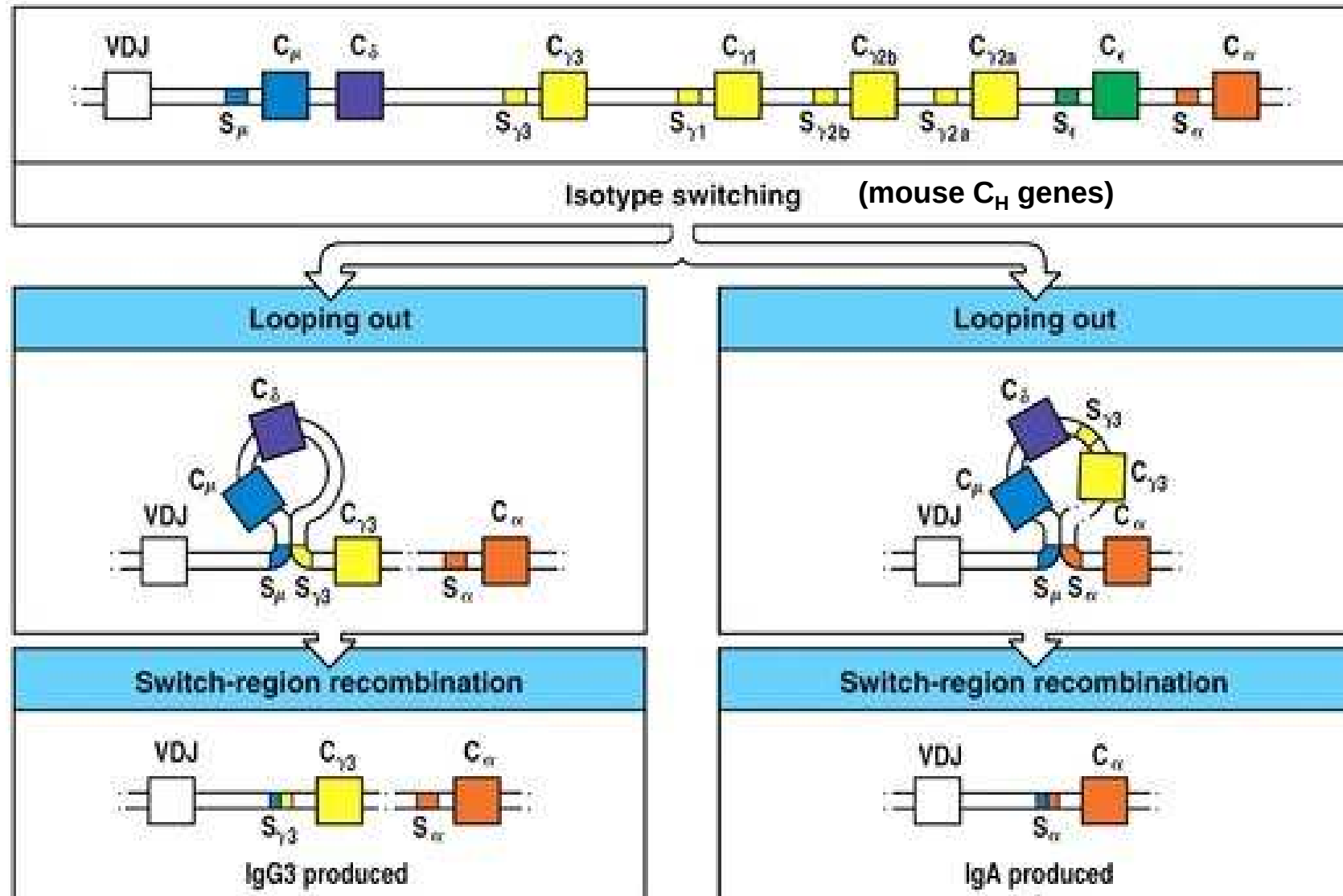
Човешките гени за C_H са подредени: C_μ, C_δ, C_{γ3}, C_{γ1}, псевдоген C_ε, C_{α1}, C_{γ2}, C_{γ4}, C_ε, C_{α2}.

Всеки C сегмент (освен C_δ) се предшества от превключвателен (**switch – S**) участък. S-участъците се различават от рекомбинационните сигнални последователности след всеки V сегмент.

Нб се произвежда от голям първичен транскрипт РНК, съдържащ C_μ и C_δ и в последствие, при узряване, може да се изреже един от тях и да се синтезира ИгД или ИгМ

В резултат на превключването на класа се появяват множество плазмоцити, продуциращи Ат от **различни класове**, но с една и **съща специфичност** (свързват една и съща Аг детерминанта)

Превключване на класа At по време на развитието на B кл.



Превключване на класа Ат по време на развитието на В кл.

Пренаредените VDJ_H първоначално се експресират на клетъчната мембрана с S_μ в развиващата се В кл, с S_μ и S_δ в зрели В кл, & и секретират S_μ при В кл. След Аг стимулация.

След сигнали от Аг и цитокини В кл превключват към синтез на IgG3, т.е. рекомбинират се S_μ и $S_{\gamma 3}$.

Сегментът ДНК между 2 S сегмента (включително μ и δ) се изрязват.

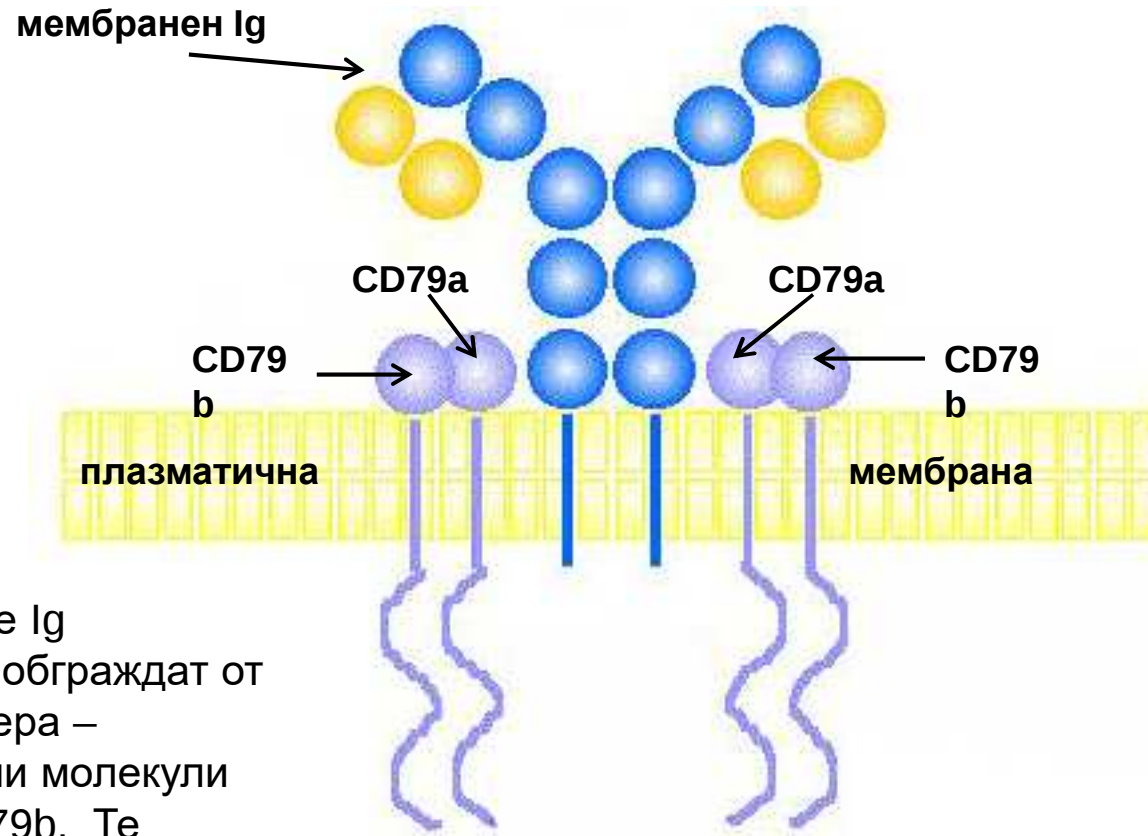
Превключване на клетката към синтез на други изотипове, сегментите на които са разположени по-надясно от $\gamma 3$ (IgA и IgE), се осъществява в резултат на стимулация с подходящи цитокини.

Резюме на пренареждането на гените за Ig по време на В клетъчното развитие

Стадии в развитието на В кл.

	стволови	ранни про-В	късни про-В	големи пре-В	малки пре-В	незрели В	зрели В
Гени за H	герминативни	D-J св.	V-DJ св.	VDJ пренар.	VDJ пренар.	VDJ пренар.	VDJ пренар.
Гени за L	герминативни	герм.	Герм.	Герм.	V-J св.	VJ пренар.	VJ пренар.
Повърхн Ig	-	-	-	μ в цитопл.	μ в цито. и на пов.	Мембр. IgM	IgM и IgD

В клетъчен рецептор (BcR)



Мембранните Ig молекули се обграждат от 2 хетеродимера – допълнителни молекули CD79a и CD79b. Те принадлежат на суперсемејството на Ig (CD79a (Ig α) и CD79b (Ig β)) и предават сигнали към цитоплазмата когато Аг се свърже към мембрания BcR.

Коекспресия на IgD и IgM

- Зрелите В-кл експресиращи едновременно IgM и IgD на повърхността си не претърпяват превключване на класа. Вместо това:
- При зрелите В-кл, транскрипцията се инициира в промотора за V_H и продължава до C_{μ} и C_{δ} екзоните.
- След това първичният транскрипт се процесира чрез изрязване, полиаденилиране (AAA), и сплайсинг.
- При този процес няма промени на ниво ДНК.
- В резултат на алтернативен сплайсинг един и същ първичен транскрипт може да се процесира в зависимост от етапа на развитие на клетките. Незрелите В-кл експресират само IgM; зрелите В-кл - IgM и IgD; активираните В-кл загубват IgD и експресират единствен изотип Ig в резултат от превключване на класа.
- Точната функция на IgD на повърхността на зрялата В-кл не е ясна. Генно нокаутирани мишки без делта екзон имат нормален имунен отговор.

ХЕМОПОЕЗА



• **Лимфопоезата** се осъществява предимно в централните лимфоидни тъкани

Figure 1-3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Основни етапи в развитието на лимфоцитите



В-клетки...

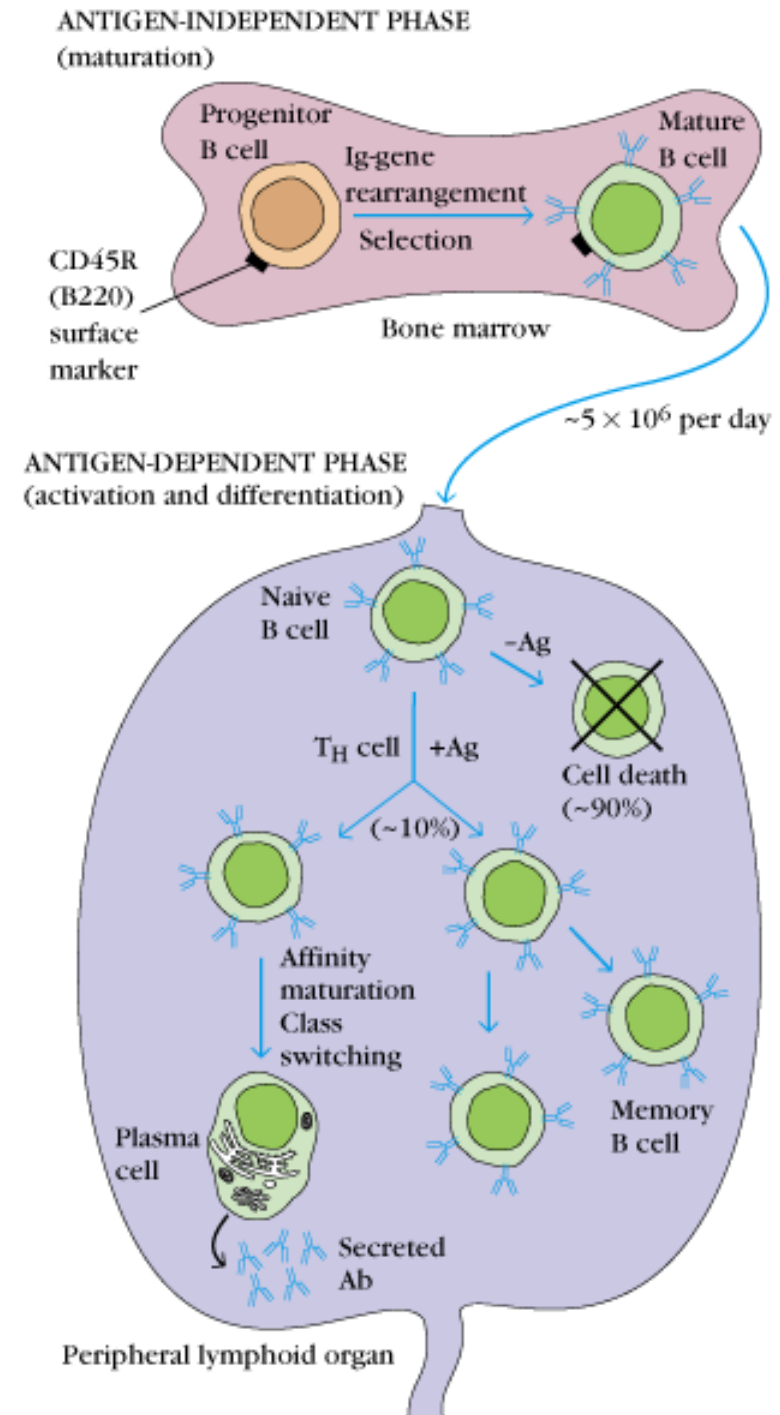
- Произход...
- Развитие...
- Селекция
- Активация

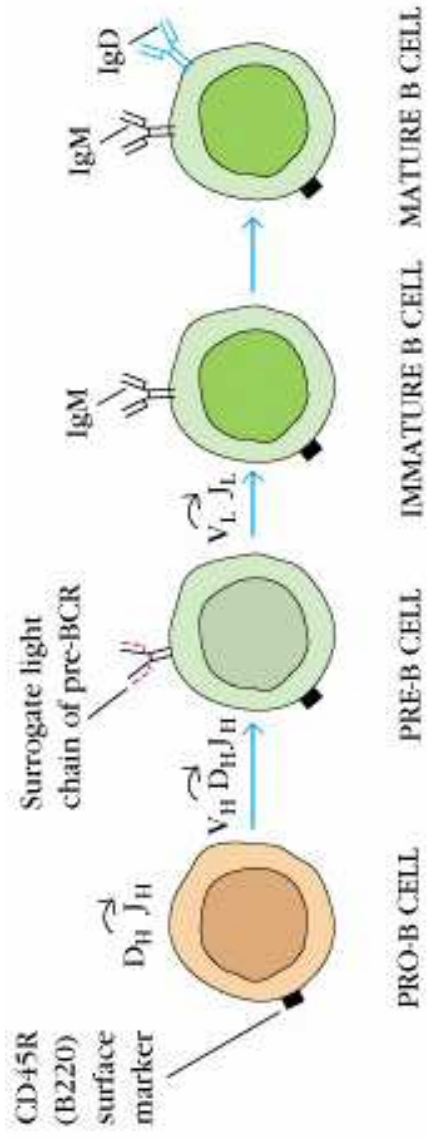
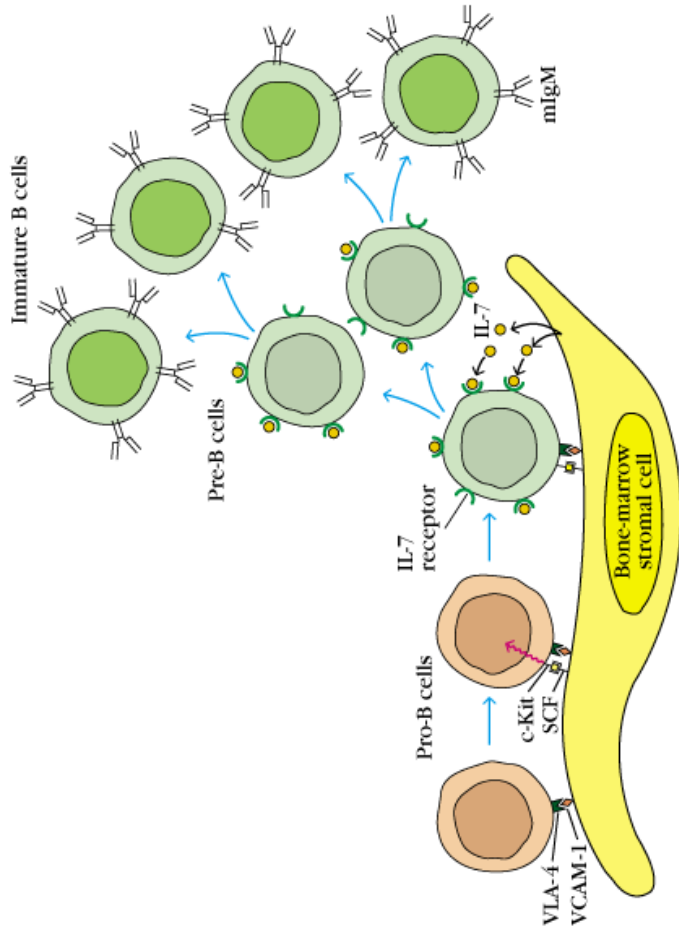
Аг – независима фаза

• Предшествениците на В-клетките (про-В) имат на повърхността си CD45R маркер – в костния мозък се развиват – от незрели до зрели В-клетки.

• След това мигрират към периферните лимфни възли.

Аг – зависима фаза

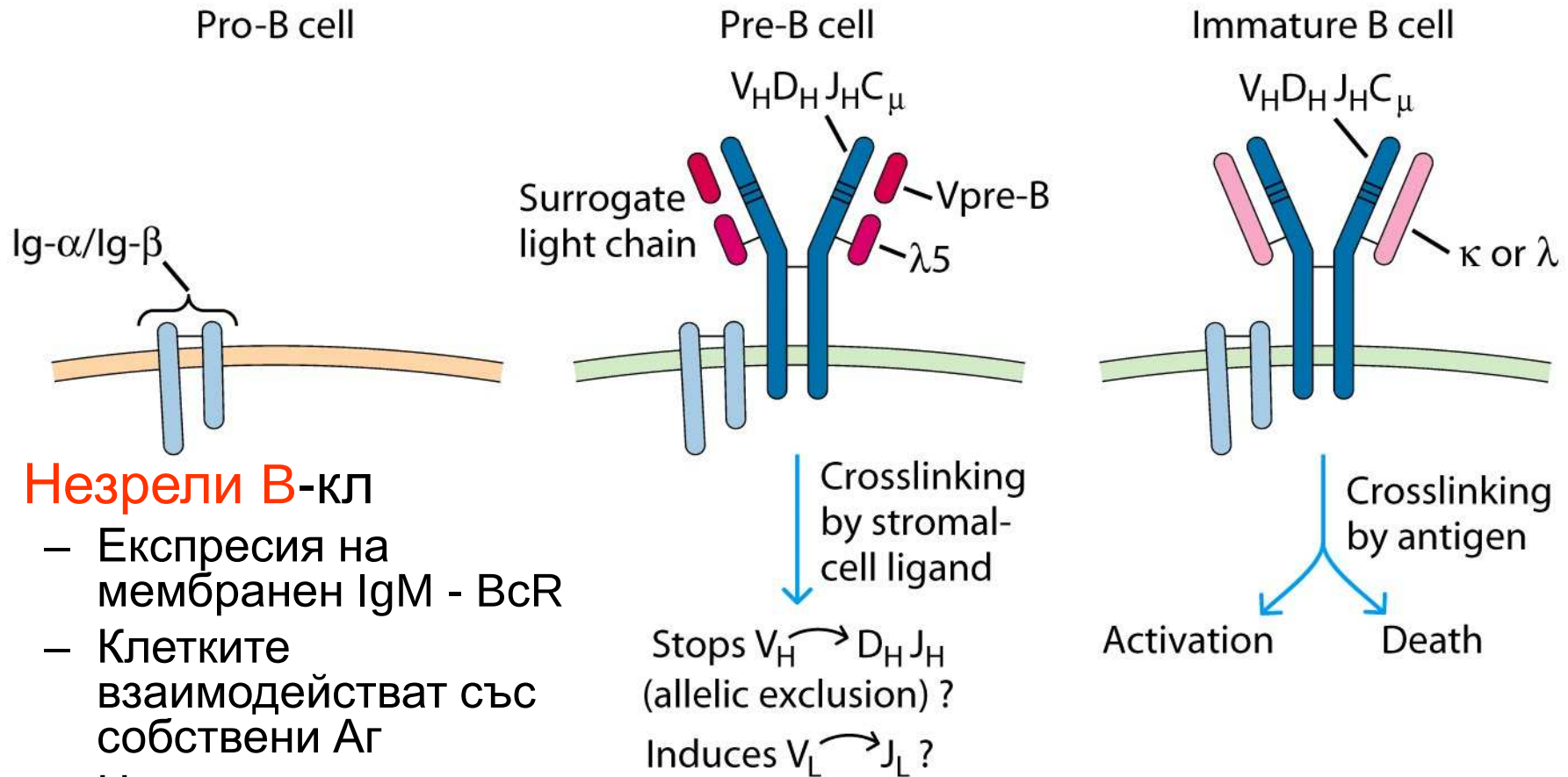




Развитие на В-кл

- Пре В-клетки
 - Делят се
 - Пренареждат се гените за леката верига на Ig (изрязване и свързване на V и J сегменти)
 - Експресия на IL7 рецептор
 - Експресия на H μ заедно с Ig α -Ig β (CD79a и b) хетеродимер
 - Пре В-кл рецептор има в състава си сурогатни леки вериги
 - Изключва се по-нататъшното пренареждане на Ig гени

Развитие на В-кл



- **Незрели В-кл**
 - Експресия на мембранен IgM - BcR
 - Клетките взаимодействат със собствени Аг
 - Настъпва **негативна селекция** (клонална делеция)

НЕГАТИВНА селекция:

- Свързването на мембранныя IgM върху незрялата В-кл може да доведе до апоптоза в костния мозък
- КЛОНАЛНА ДЕЛЕЦИЯ

Развитие на В-кл

- Зрели В-кл
 - Напускат костния мозък
 - Експресират на повърхността си IgM и IgD
 - Делят се чрез митоза
 - Пренареждат се гените за леките вериги (V към J изрязване и свързване)
 - Експресия на рецептор за IL7
 - Експресия на H μ заедно с Ig α -Ig β хетеродимер
 - Пре В-кл рецептор има в състава си сурогатни леки вериги
 - Изключва се по-нататъшното пренареждане на Ig гени

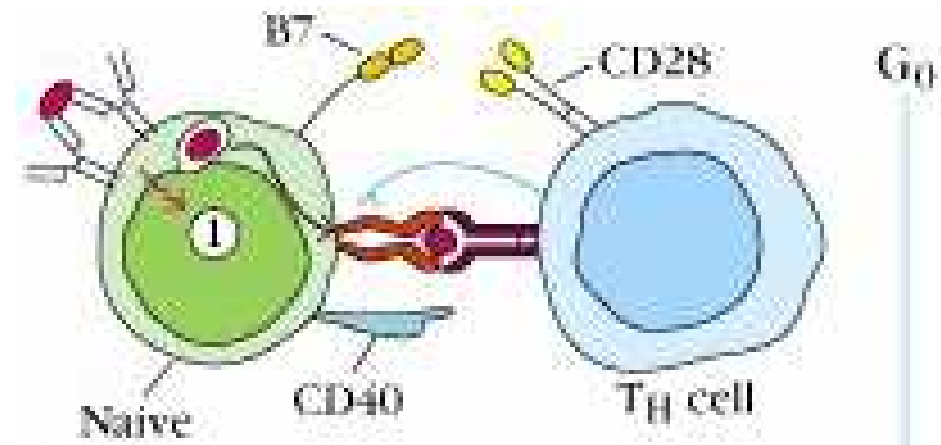
Nota bene:

- До клоналната делеция развитието е Аг-независимо.
- Негативната и позитивната селекция са Аг-зависими.
- Разпознаването/свързването на **Аг** в периферията води до **ПОЗИТИВНА селекция ...**
- КЛОНАЛНА ЕКСПАНЗИЯ

Селекцията не е еквивалентна на АКТИВАЦИЯТА ...

Най-често В-кл се нуждае от сигнал от Th кл

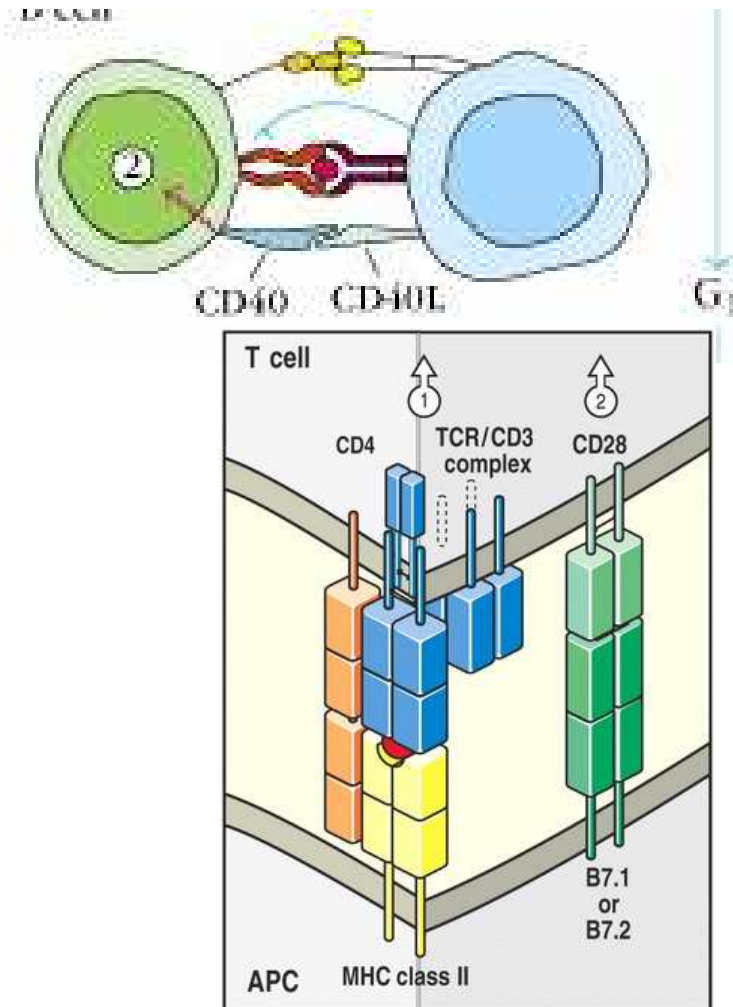
1. Аг свързване на мембранен Ig с рецептор върху Th е **първия** сигнал, който довежда до увеличена експресия на клас II МНС и B7 молекули върху В-кл.
2. Th разпознава комплекса Аг - клас II МНС върху В-клетъчната мембрана и това е **костимулаторен** сигнал, който активира Th



Селекцията не е еквивалентна на АКТИВАЦИЯТА

Най-често В-кл се нуждае от сигнал от Th кл

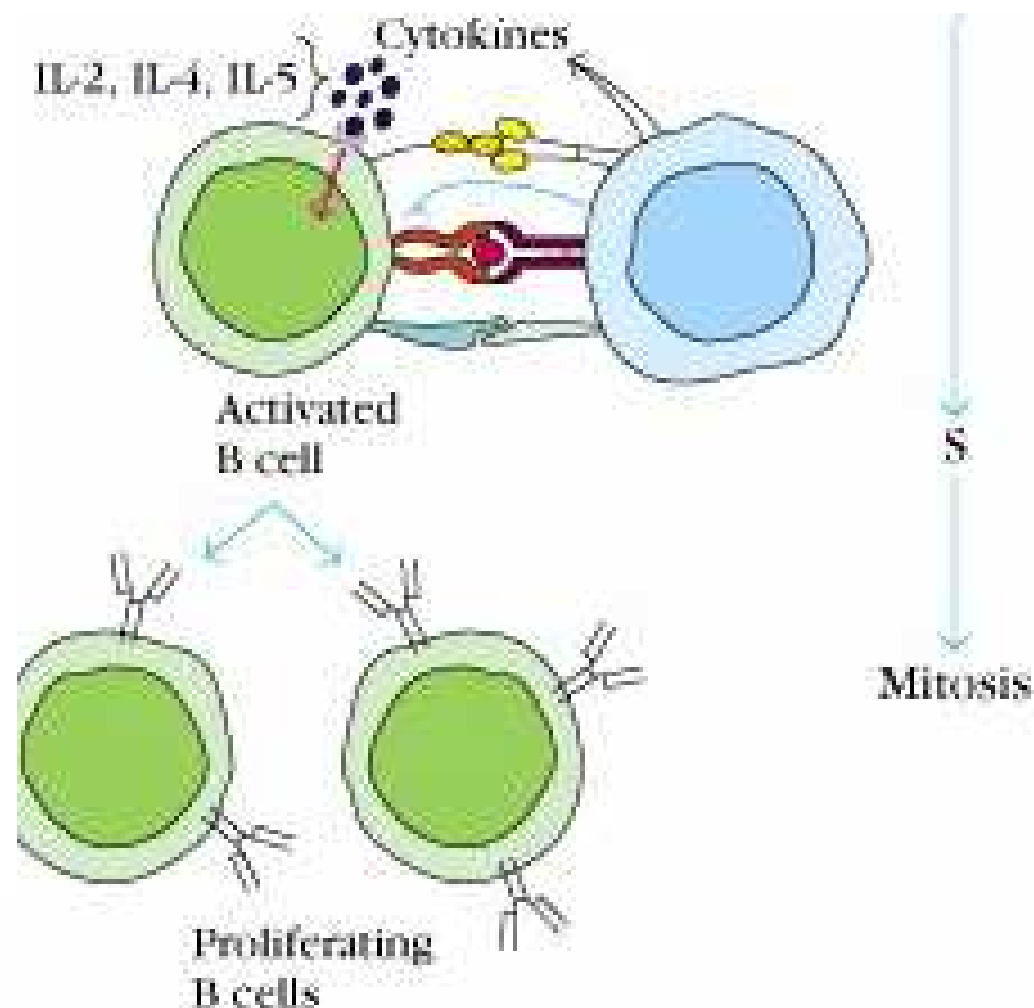
3. След активацията на Th върху повърхността му се експресира CD40L
4. CD40L взаимодейства със CD40 от повърхността на В-кл и това е **втория** сигнал
5. Взаимодействието B7 (В-кл или APC) - CD28 (Т-кл) е **костимулаторен** сигнал за T h



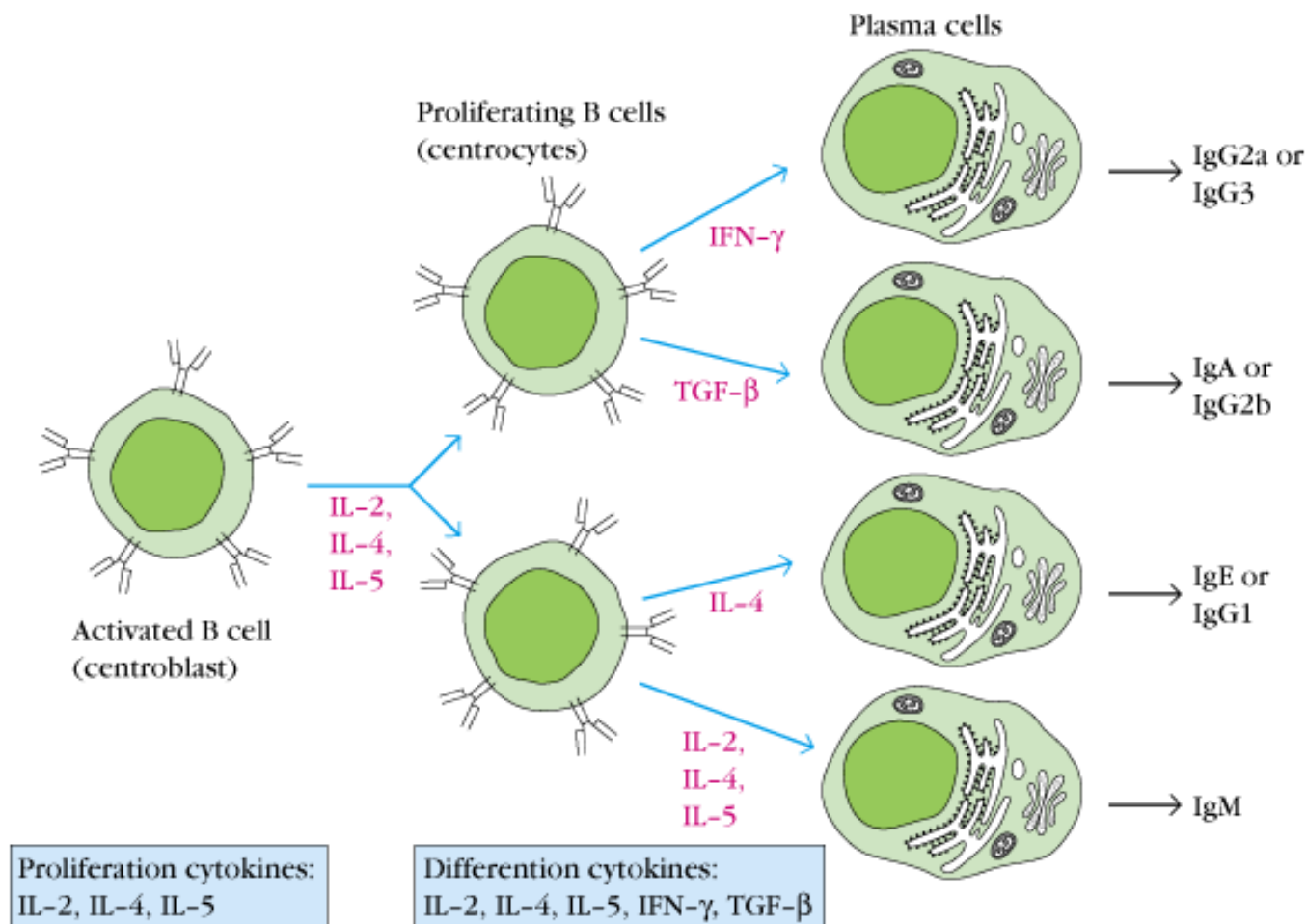
Селекцията не е еквивалентна на АКТИВАЦИЯТА

Най-често В-кл се нуждае от сигнал от Th кл

6. В-кл започва да експресира рецептори за различни цитокини
7. Свързването на цитокините, секретирани от Th към В-кл я насочва към S фаза/синтез на ДНК - подготвя я за митоза.
8. В-кл пролиферира/ дели се



- Th секретират различни цитокини, които въздействат върху диференциращи се В-кл (трябва да притежават рецептори за цитокините на повърхността си).
- Сигналът от цитокините насочва плазматичната клетката към синтез и секреция на един или друг клас Ig.



Цитокини

- ✓ Хуморални реагенти, секретирани от различни клетки, но най-вече имунни. Реагират с рецепторна молекула.
- ✓ Имат **плейотропен** ефект – често могат да взаимодействат с повече от един рецептор
- ✓ Рецепторите за различните цитокини могат да са изградени от различната комбинация на еднакви субединици
- ✓ Цитокините имат специфични функции – те се осъществяват при свързването им чрез свързването им със специфични само за лиганда субединици

Къде се осъществява активацията?

И как?

Първичният отговор се осъществява в **паракортекса на лимфните възли**.

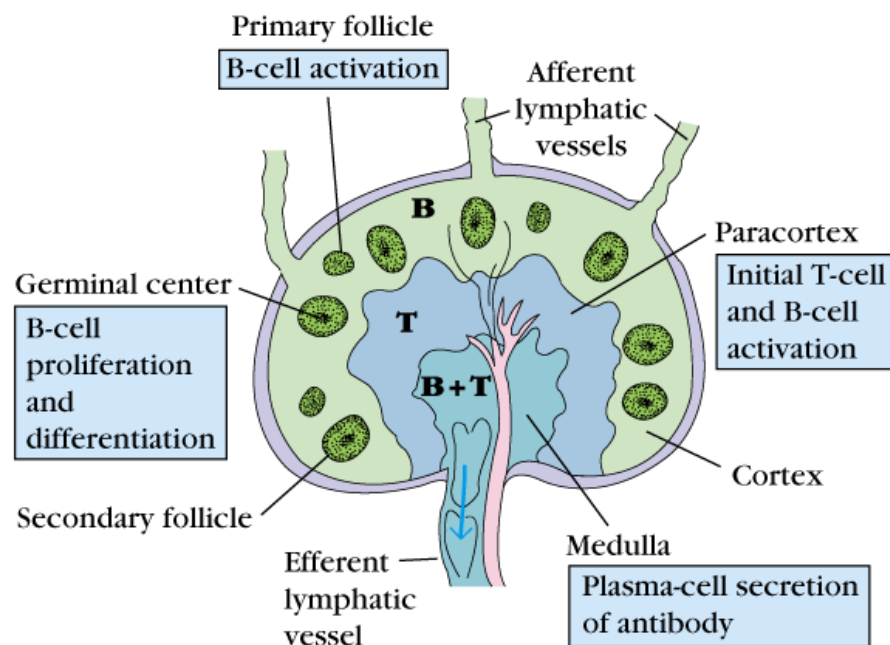
Т-кл са отговарят на преработения и представения от **дендритните** клетки Аг.

В-кл разпознават същия Аг в НЕпреработена форма в лимфата.

Т- и В-кл, (сега вече активирани), се разпознават и асоциират, като това стартира каскада от сигнали.

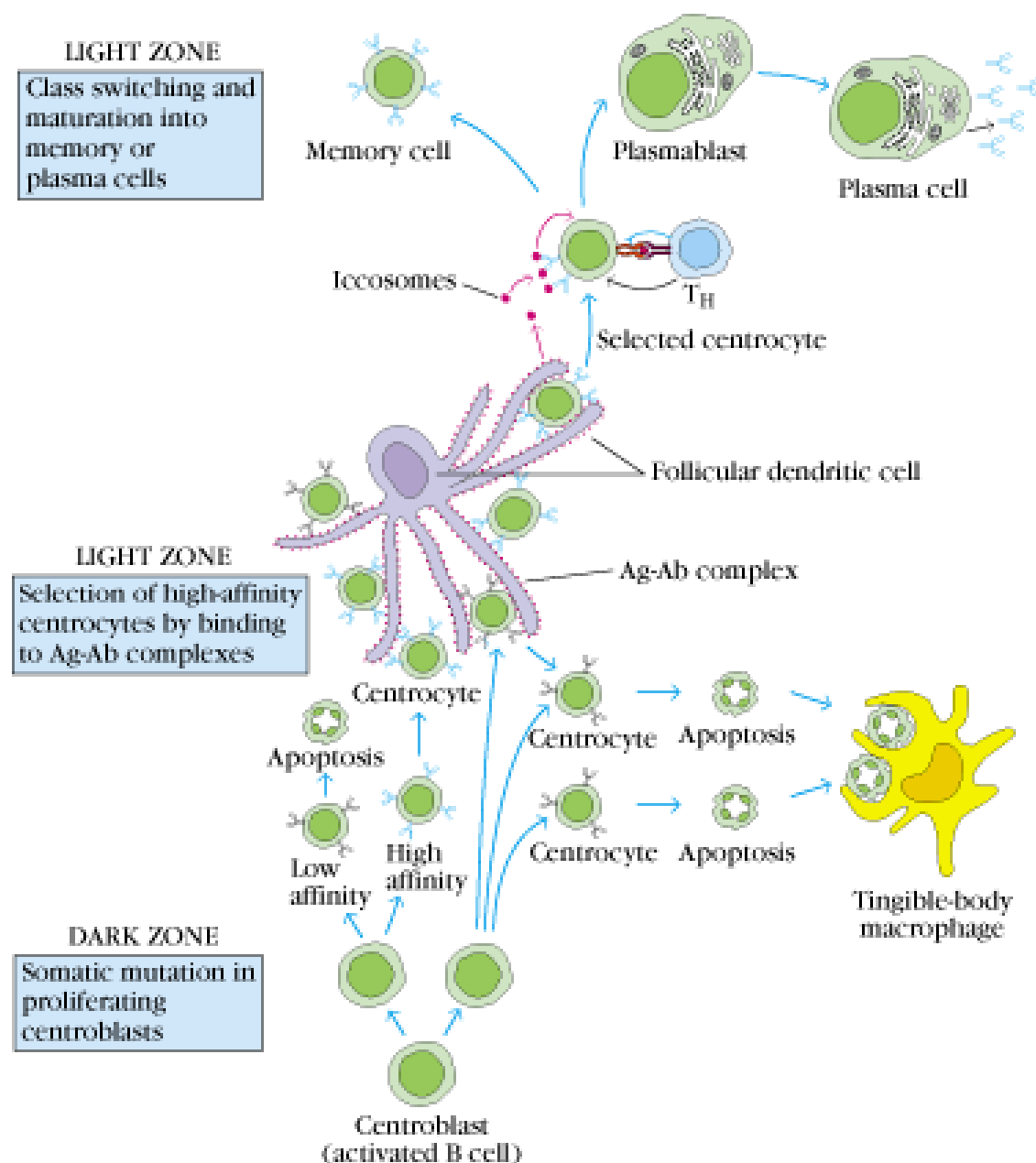
В-кл мигрират към периферията на паракортекса и образуват огнища/области в които узряват до плазматични клетки, които секретират първоначално IgM, а след това IgG.

Някои В-кл – заедно с някои Th – мигрират до първичните фоликули на кортекса.



Първичните фоликули се развиват до ВТОРИЧНИ...

- Вторичните фоликули имат област на пролиферация (герминативен център), в който В-кл пролиферират и се диференцират.



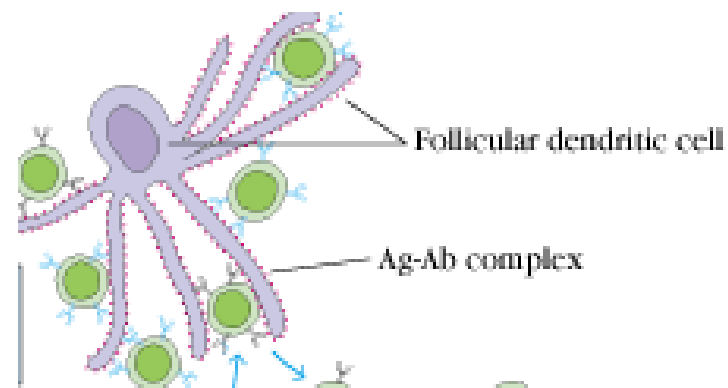
Фоликуларни дендритни клетки...не са APC!

Те НЕ произхождат от костния мозък и не експресират МНС-II.

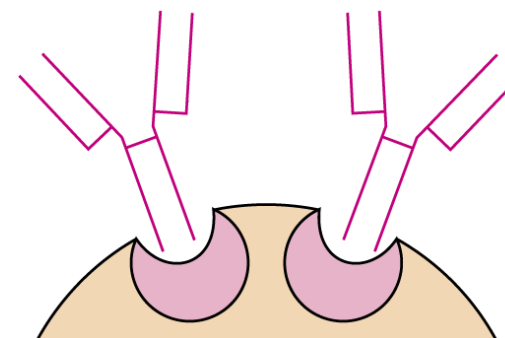
Те притежават рецептори за F_c участъка на Ig.

По този начин фоликуларните дендритни клетки са покрити с комплекси Ab-непреработен Ag. Т.е. тези фоликули филтрират антигените, попаднали в организма

Дендритите на тези клетки са много крехки и могат да се разкъсат на безядрени частици (около 0.3-0.4 μm в диаметър). Тези частици се наричат икозоми от англ. "icosomes" (immune-complex coated bodies); могат да персистират няколко месеца и служат като резервоар за Ag, който поддържа В-кл памет.



(d)



CD (CLUSTER DETERMINANTS)

Класификация

- Базира се на идентификация на единични епитопи от моноклонални Ат
- Участват молекули, които отличават клетките, под формата на клетъчни рецептори, но не само... Могат да са ензими и др.
- Повечето, но не всички CD молекули са на клетъчната повърхност,
- До момента са открити и описани над 320 CD маркера

Примери за CD маркери

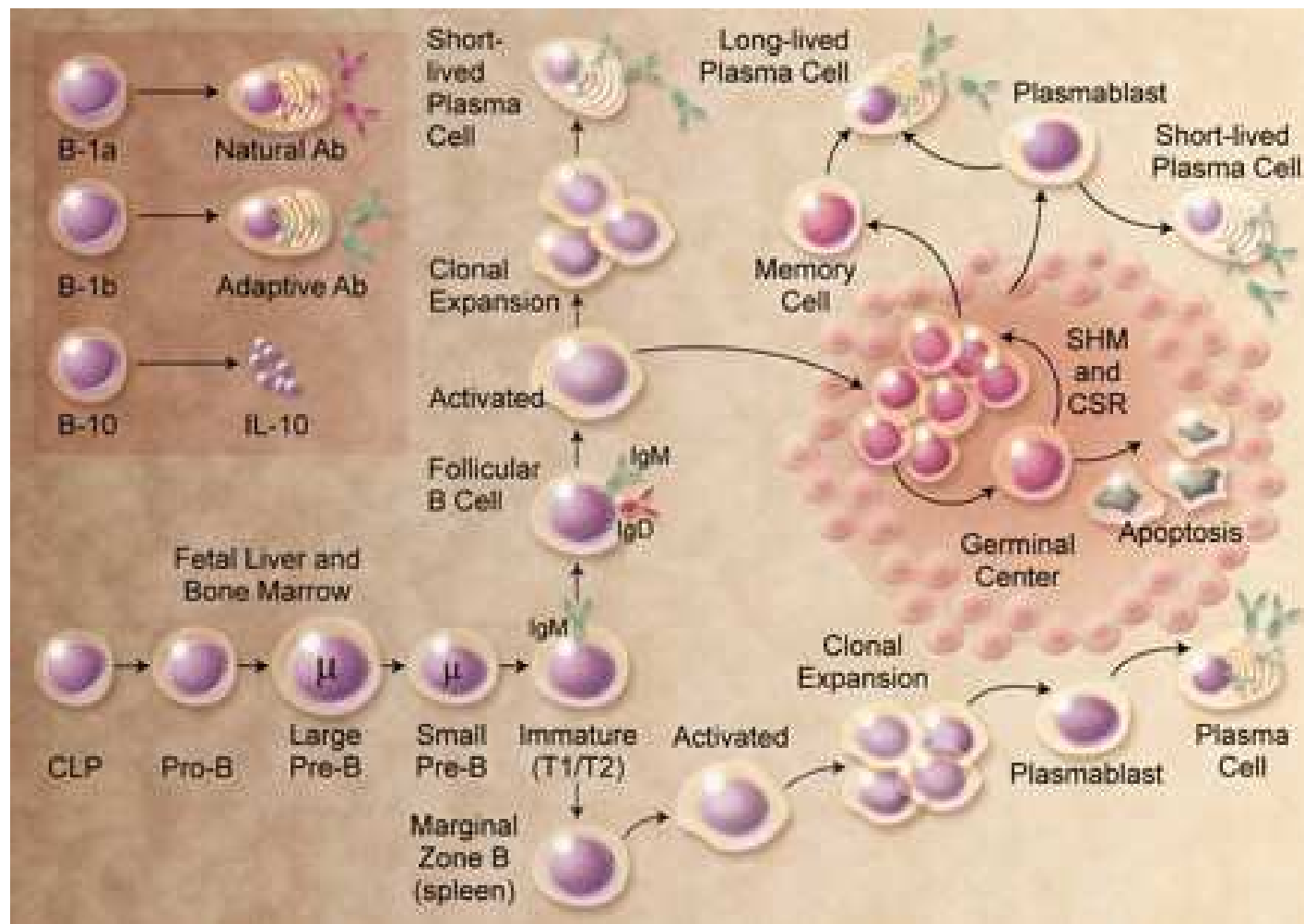
- CD3 ТсR сигнален комплекс: Т-кл
- CD4 МНС клас II рецептор: Т-кл
- CD8 МНС клас I рецептор : Т-кл
- CD10 неутрална ендопептидаза: всички клетки
- CD19 корецепторна субединица: В-кл
- CD45 LCA (тирозинфосфатаза): левкоцити
- CD62L L-селектин: Т-кл, моно-
гранулоцити
- CD247 зета верига върху ТсR : Т-кл, НК-кл

В-клетъчни CD маркери

- CD маркери: CD19, CD20, CD21, CD22, CD35, CD40, CD72, CD80, CD86
- CD19 – експресират го всички В-кл линии – регулира сигналната трансдукция
- CD20 - експресират го зрелите В-кл – мембранно вграден канал за Ca^{+}
- CD40 – експресират го В-кл в герминативните центрове – служи като фактор на оцеляване и се свързва със CD40L (CD154), експресиран от Th

В-клетъчни популации

- **B1**
 - CD5 маркер
 - B1a (CD5⁺) and B1b (CD5⁻)
 - Отговарят на въглехидратни Аг
 - около 20% от В-кл в кръвта, слезката на здрави хора. Откриват се в перитонеума. Секретират само IgM
- **B2**
 - Повечето В-кл (до 95%)
 - Насочват отговора към Аг към вторичните лимфоидни органи – имунокомпетентни В-кл
- **В-паметни клетки**
 - произхождат от герминативните центрове на вторичните фоликули през втората седмица след първичния антиялов отговор
 - В резултат на соматична хипермутация експресират BcR с увеличен афинитет за Аг
 - броят им бързо и многократно се увеличава при вторична среща с Аг, като резултатът е множество Аг-секретиращи плазмоцити от конкретния клон



- B-cell development.** The figure shows the broad outline of B-cell developmental stages in mice and humans. B-1a, B-1b, and B10 populations are less well characterized in humans. CLP indicates common lymphoid progenitor; SHM, somatic hypermutation; and CSR, class switch recombination. Illustration by A. Y. Chen.