Immunológia alapjai
(Fogász)

9.-10. előadás

Az immunglobulinok genetikája. Az antigén felismerő-receptor gének felépítése és expressziója.

Primer B sejt differenciálódás

Centrális (thymus) T sejt fejlődés

Dr. Boldizsár Ferenc

A lymphoid vonal sejtjei

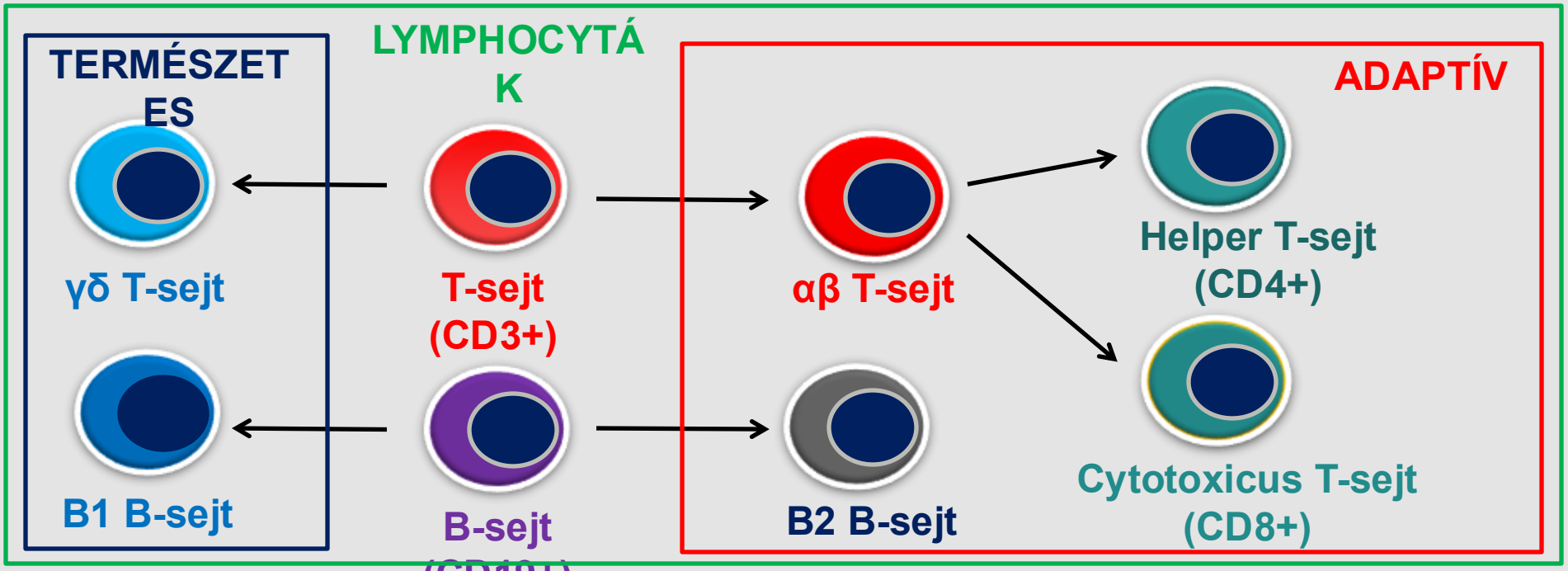
Veleszületett lymphoid sejt (ILC)

NINCS ANTIGÉN-FELISMERŐ RECEPTORA

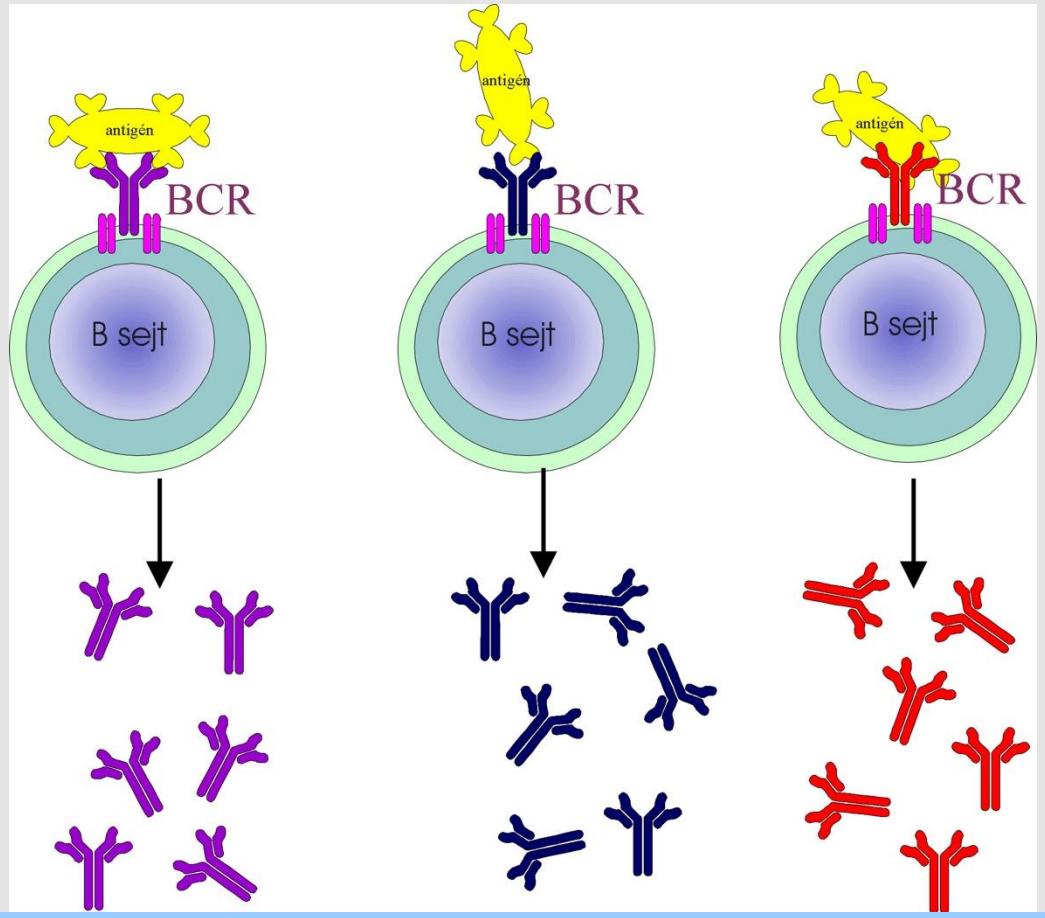
Morfológiailag nincs különbség!

Lymphocyta

ANTIGÉN-FELISMERÉSRE KÉPES RECEPTORRAL RENDELKEZIK



Antitestek – B sejt repertoár: 10^{11}



Tonegawa (Nobel díj:1987)

A B sejtek érésük során az immunglobulin gének átrendeződnek és szomatikus hypermutáción esnek át.

A nagy repertoárhoz képest viszonylag kevés Ig V gén öröklődik.

A lymphocyta differenciáció célja

- Különböző specificitású antigén receptorok expressziója.

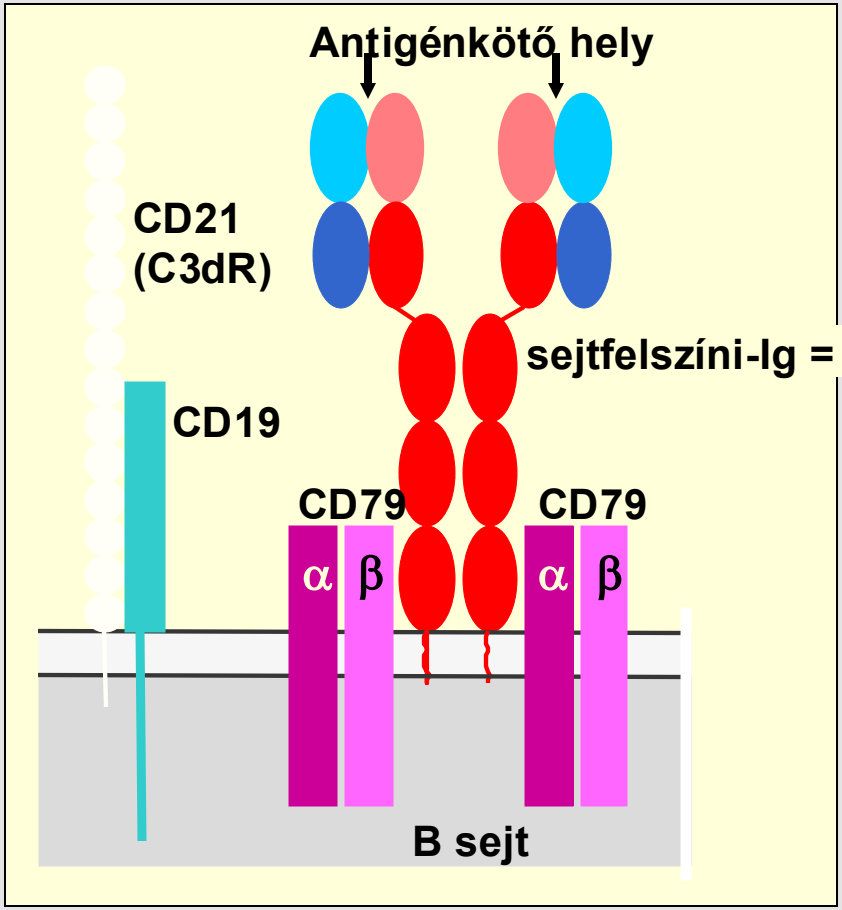
- B- és T sejt repertoár kialakítása = az antigén felismerő receptorok száma: 10^9-10^{11} BcR, 10^{15}-10^{16} TcR;

„Lymphocyta képzés = Kesztyűgyár” – *Jan Klein*.

Az immunrendszer előre megtermeli a különböző antigén receptorokkal rendelkező lymphocytákat, aztán az antigén „választja ki” a megfeleő specificitású molekulákat. Tehát az immunrendszer minden lehetséges antigén molekulára fel van készülve.

A B- és T sejt receptor termelés genetikai háttere az **immunglobulin- és a T sejt receptor gének átrendeződése a lymphocyta előalakokban**.

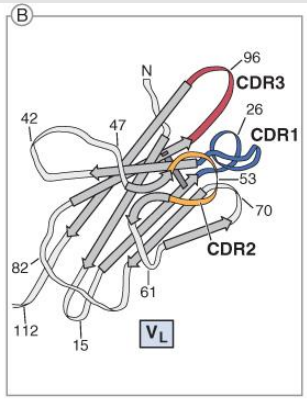
B sejt receptor (BcR) = sejtfelszíni Ig



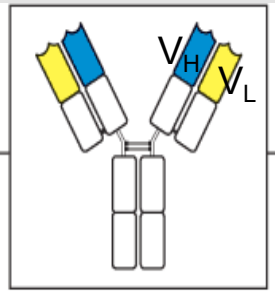
sejtfelszíni-Ig = Membran-IgM und -IgD

Minden egyes B sejt kizárólag egyetlen specificitású antitestet (BcR) tud termelni.

Az immunglobulinok antigén kötő helye hipervariábilis (CDR) régiókat tartalmaz

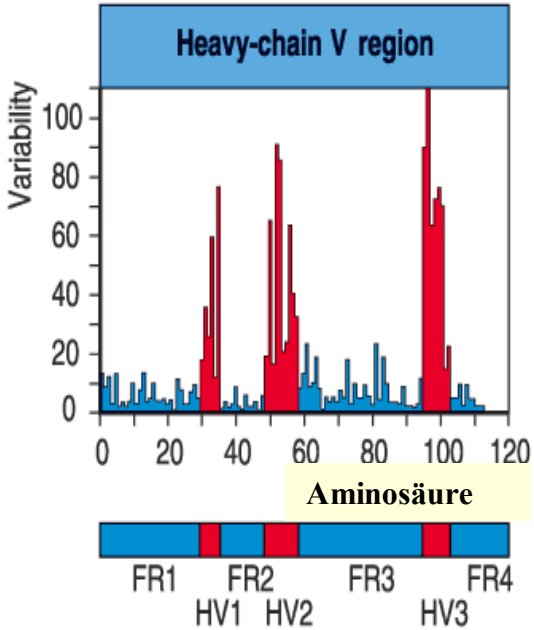


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



V = Fab

C= Fc



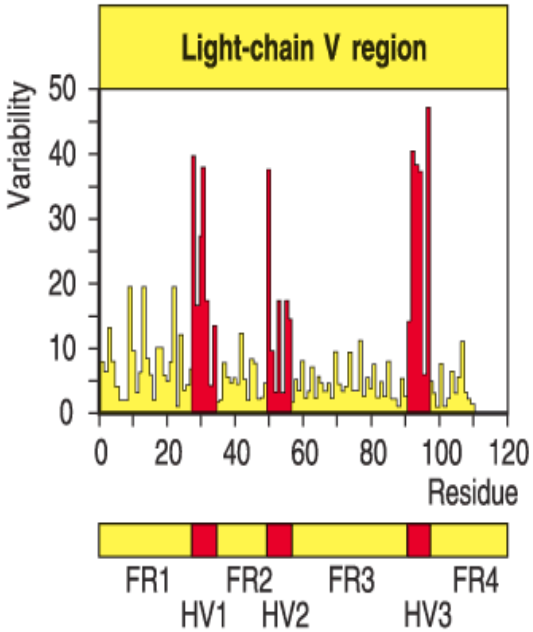
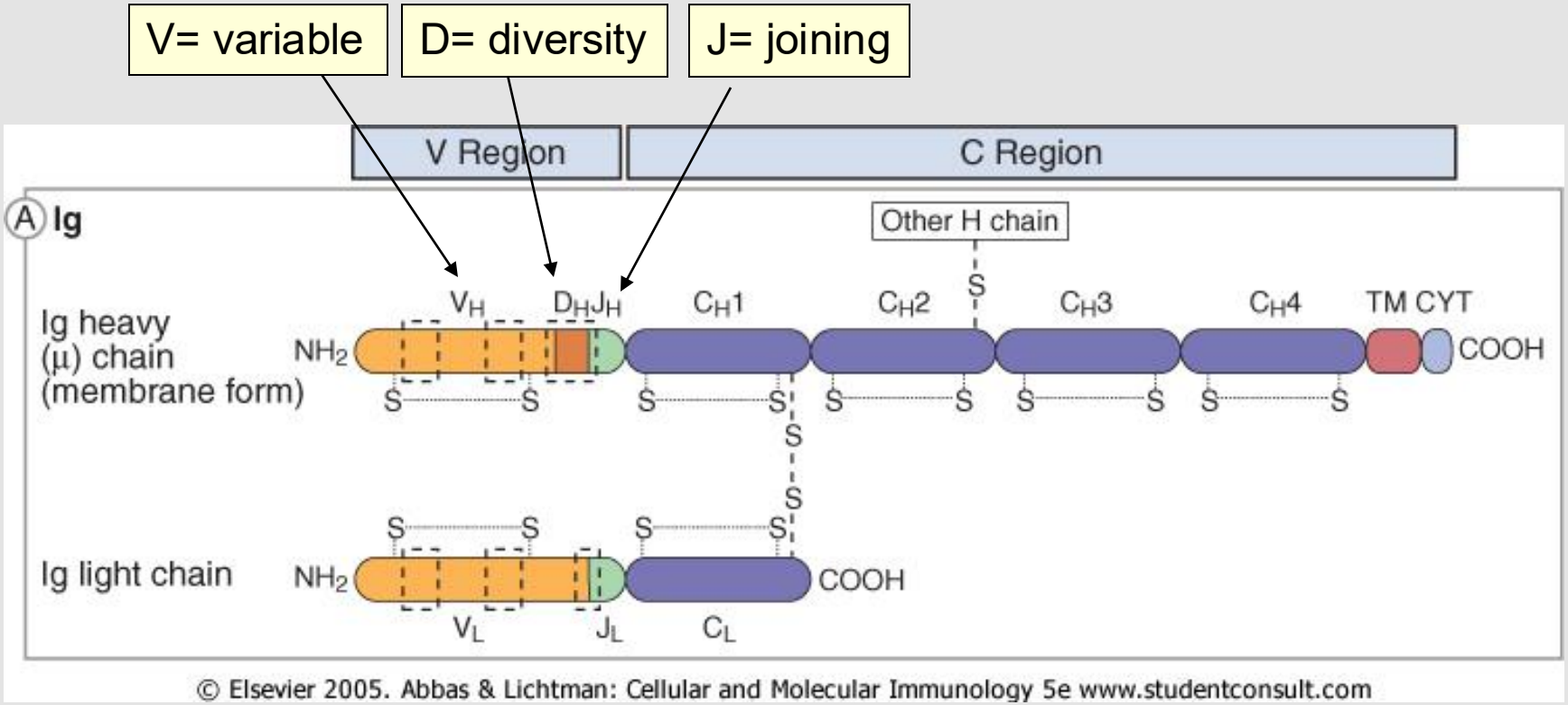


Fig 3.6 © 2001 Garland Science

Az Ig nehéz- és könnyű láncok doménjei

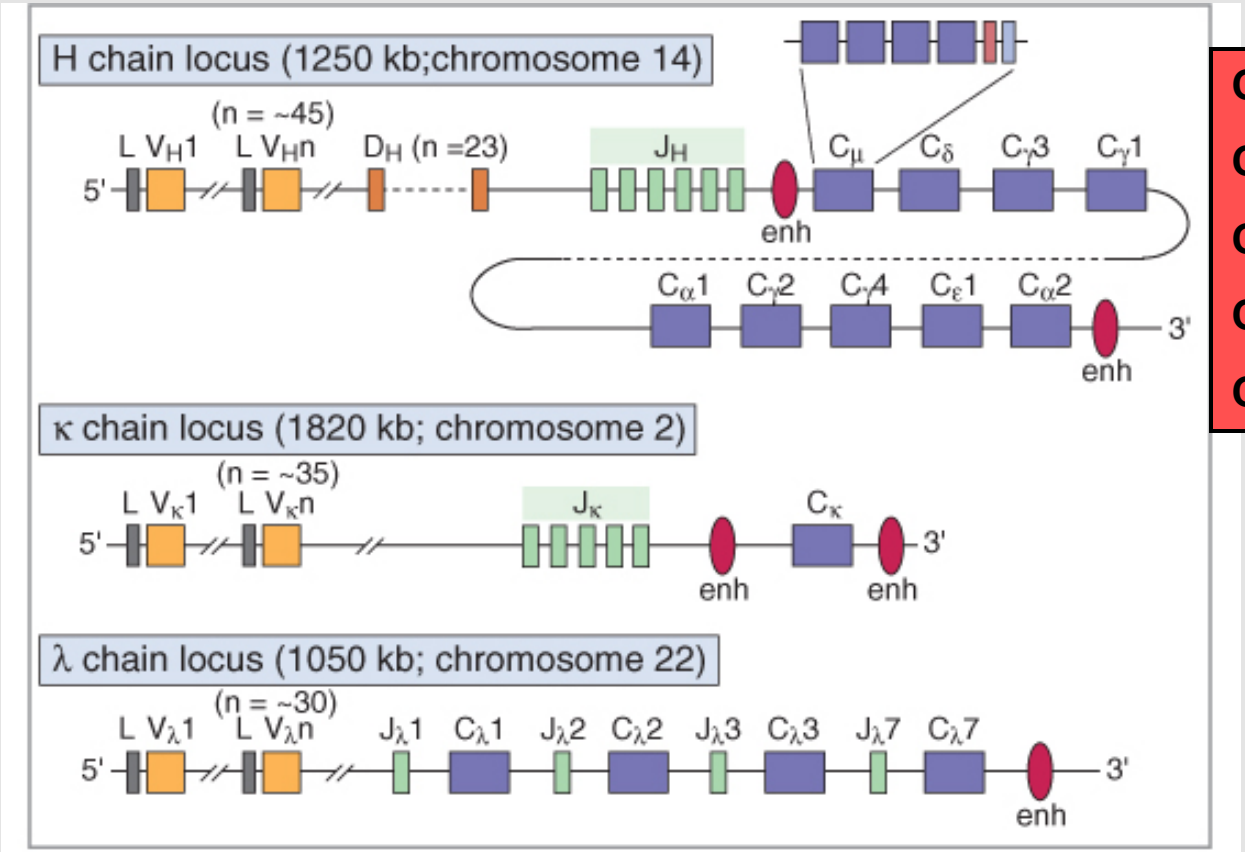


- Ahogy a **variábilis (V)** úgy a **konstans (C)** **Doméneket** a nehéz és a könnyű láncban különböző **Génszegmentumok** kódolják.
- A könnyű és nehéz láncok polipeptid láncai különböző kromoszómákon kódolódnak.

Az immunglobulin könnyű és nehéz lánc gének felépítése

V-Régió:
V = Variable
D = Diversity
J = Joining
Génszegmensek

C-Régió:
C = Konstans
Génszegmensek

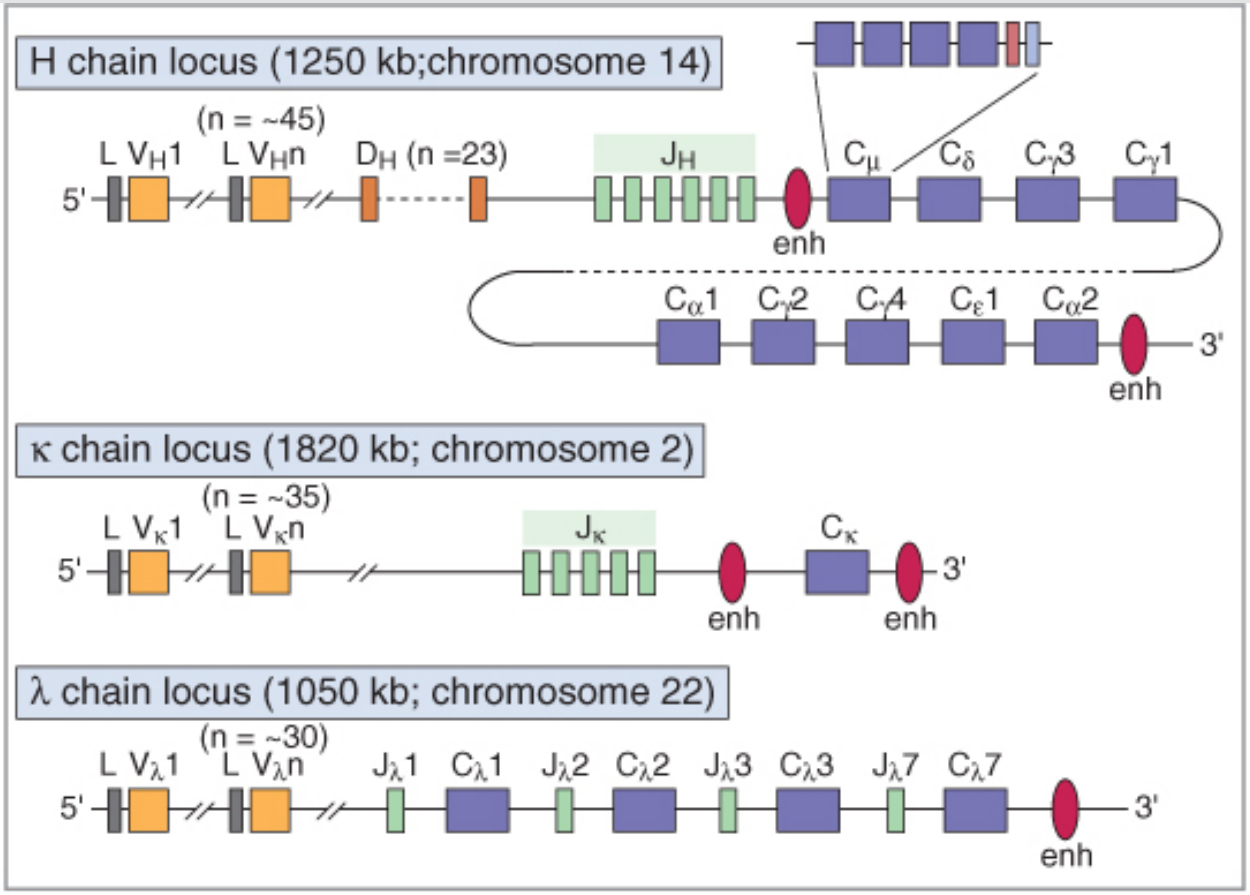


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Cμ - IgM
Cδ – IgD
Cγ – IgG
Cα – IgA
Cε - IgE

Csíravonal-DNS → az immunglobulin gének nem átrendeződött állapota.

Csíravonal DNS: A V-D-J-Génszegmentumok száma



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

V- : 45
D- : 23
J - : 6
C - (8):
Cμ, Cδ, Cγ1-4,
Cα, Cε

V- : 35
J - : 5
C - : 1

V-: 30
J -: 4
C -: 4

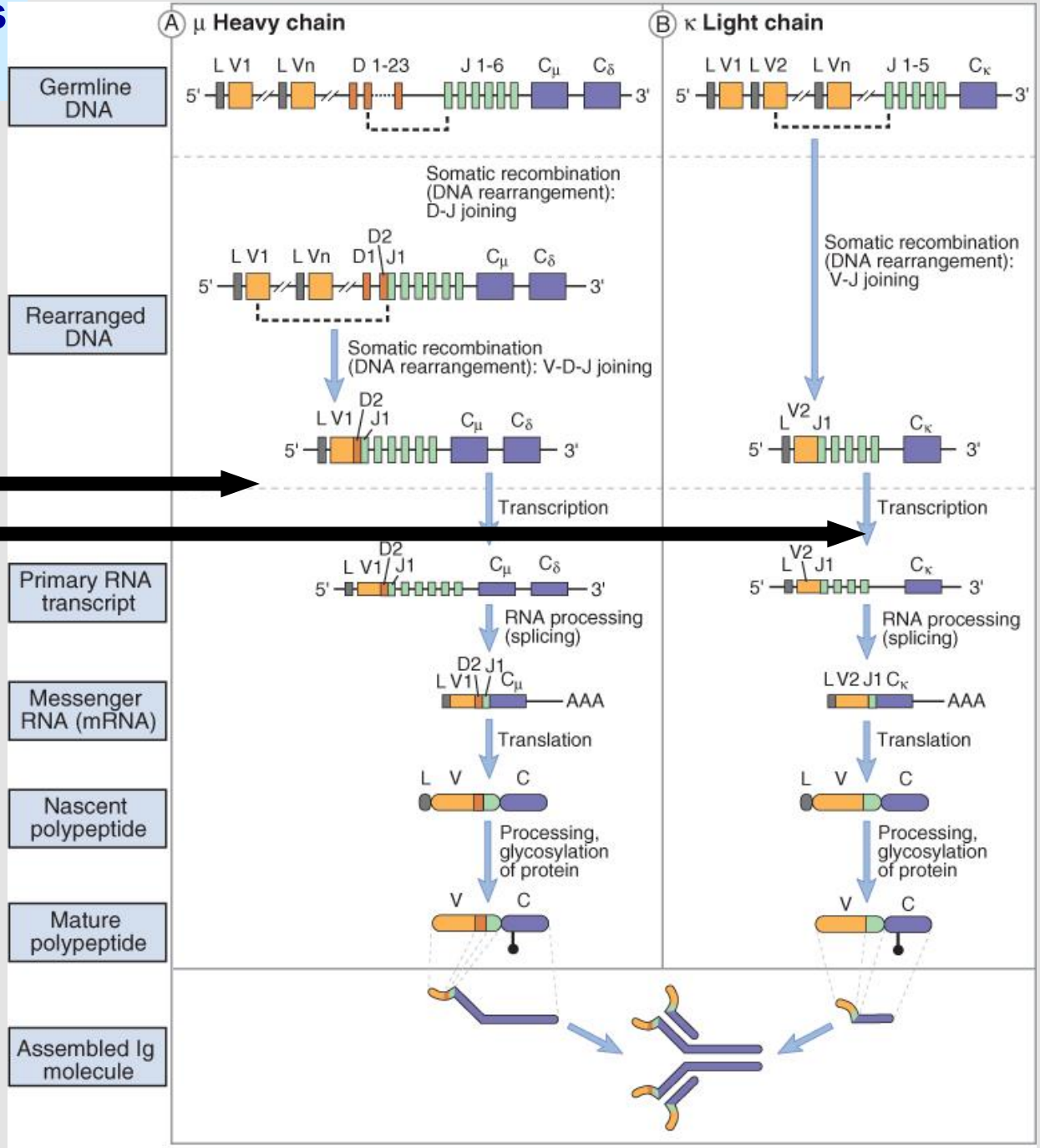
A csíravonal DNS **szomatikus rekombináció során átrendeződik**
= **Génátrendeződés**

Az Ig génátrendeződés folyamata

Allél kizárás:
az egyik **nehéz lánc** allél sikeres (produktív) átrendeződése gátolja a másik kromoszómán található H lánc lókusz rekombinációját

Izotípus kizárás:
α κ **könnyű lánc** allél produktív átrendeződése gátolja a λ gén rekombinációját

Minden egyes B sejt kizárólag egyetlen specificitású antitestet (BcR) tud termelni.



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

A génátrendeződés molekuláris mechanizmusa

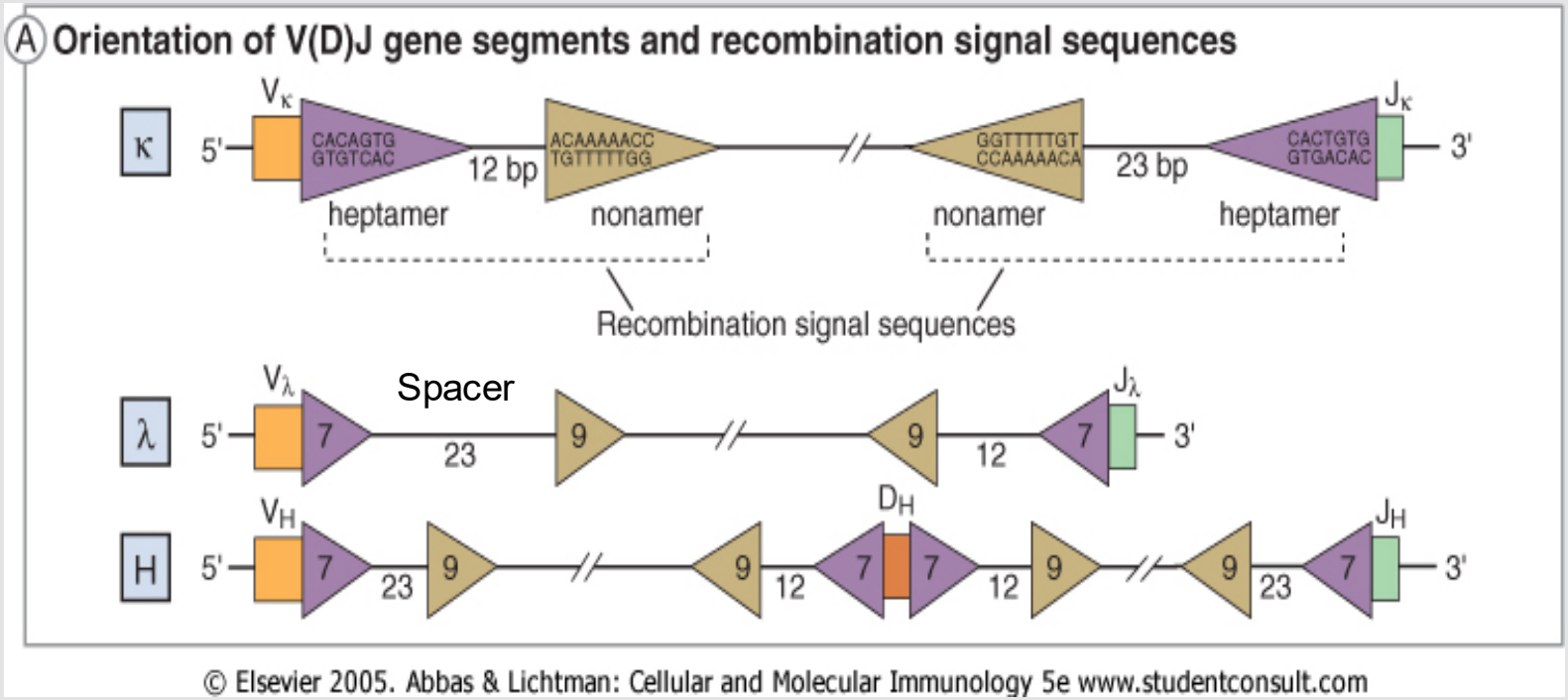
1. hurok képződés
2. DNS vágás - Deléció
3. a szabad DNS végek ligációja

Résztvevő enzimek:

- VDJ-Rekombináz: **RAG1 és -2**
- Heteromér proteinkomplex: **DNS-Ligáz, DNA-PK, Artemis-Protein**
- Terminális Deoxynukleotidyl-Transzferáz (**TdT**): →

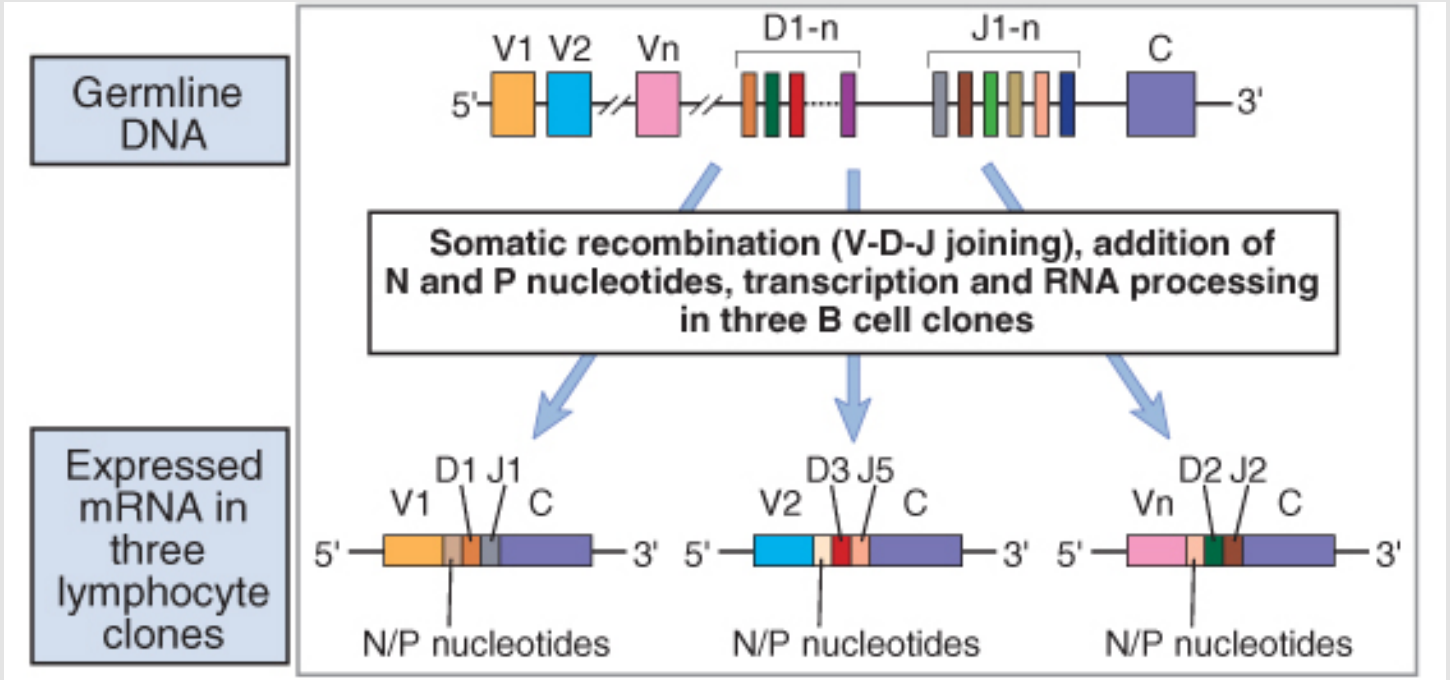
N-Nukleotid-beépítés – véletlenszerű Nukleotid beépítés

A génszegmentumok átrendeződésének 12/23-bázispár szabálya:



<u>Rekombinációs-Szignál-Szekvenciák (RSS):</u>
egy konzervált heptamer és nonamer szekvenciákból állnak, amiket nem konzervált 12 vagy 23 bp hosszú spacer szekvenciák választanak el.

Nehéz lánc génátrendeződés 3 Pro-B-sejtben



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

véletlenszerű átrendeződés → Diverzitás

T sejt receptor

T sejt típusok:

1. αβ TcR+

2. γδ TcR+

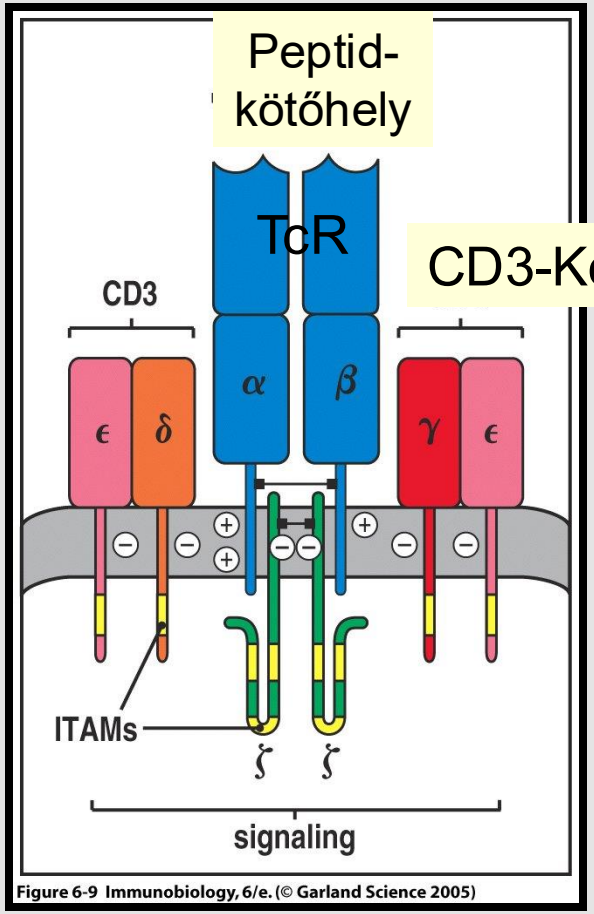
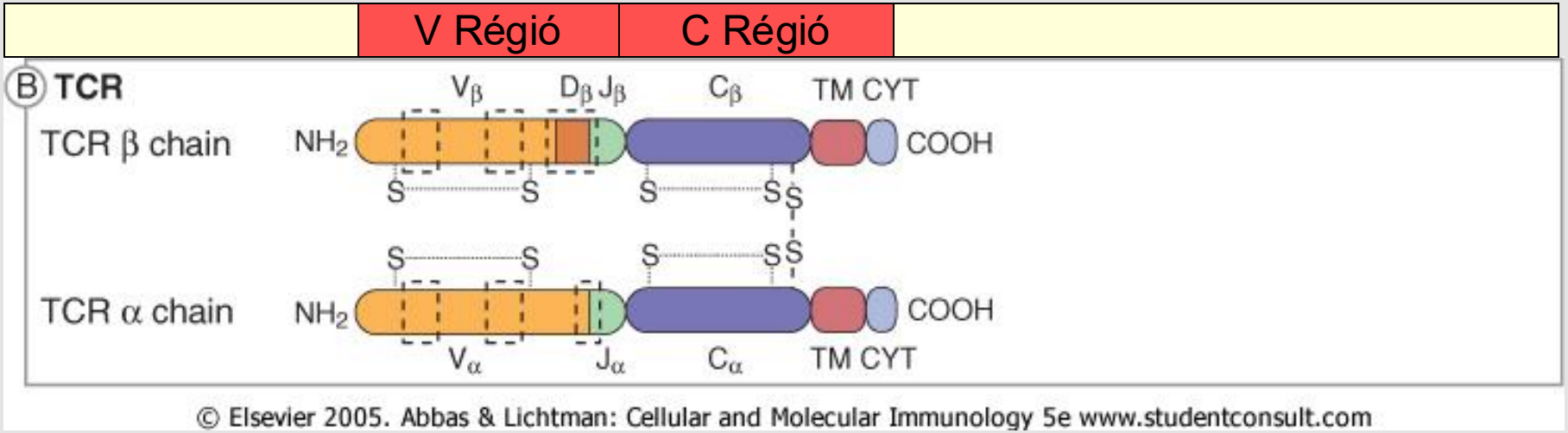


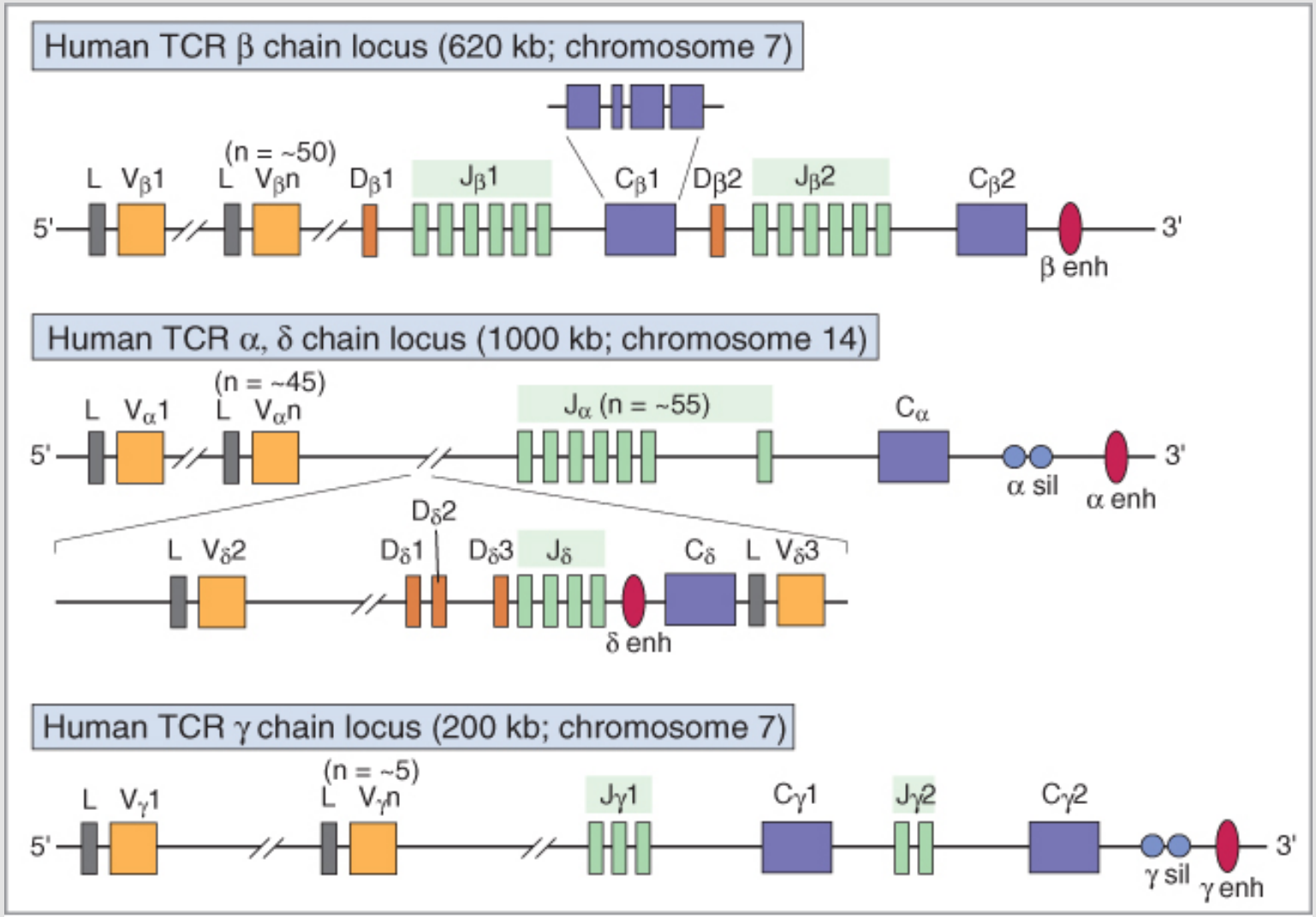
Figure 6-9 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

A TcR αβ-láncok doménjei



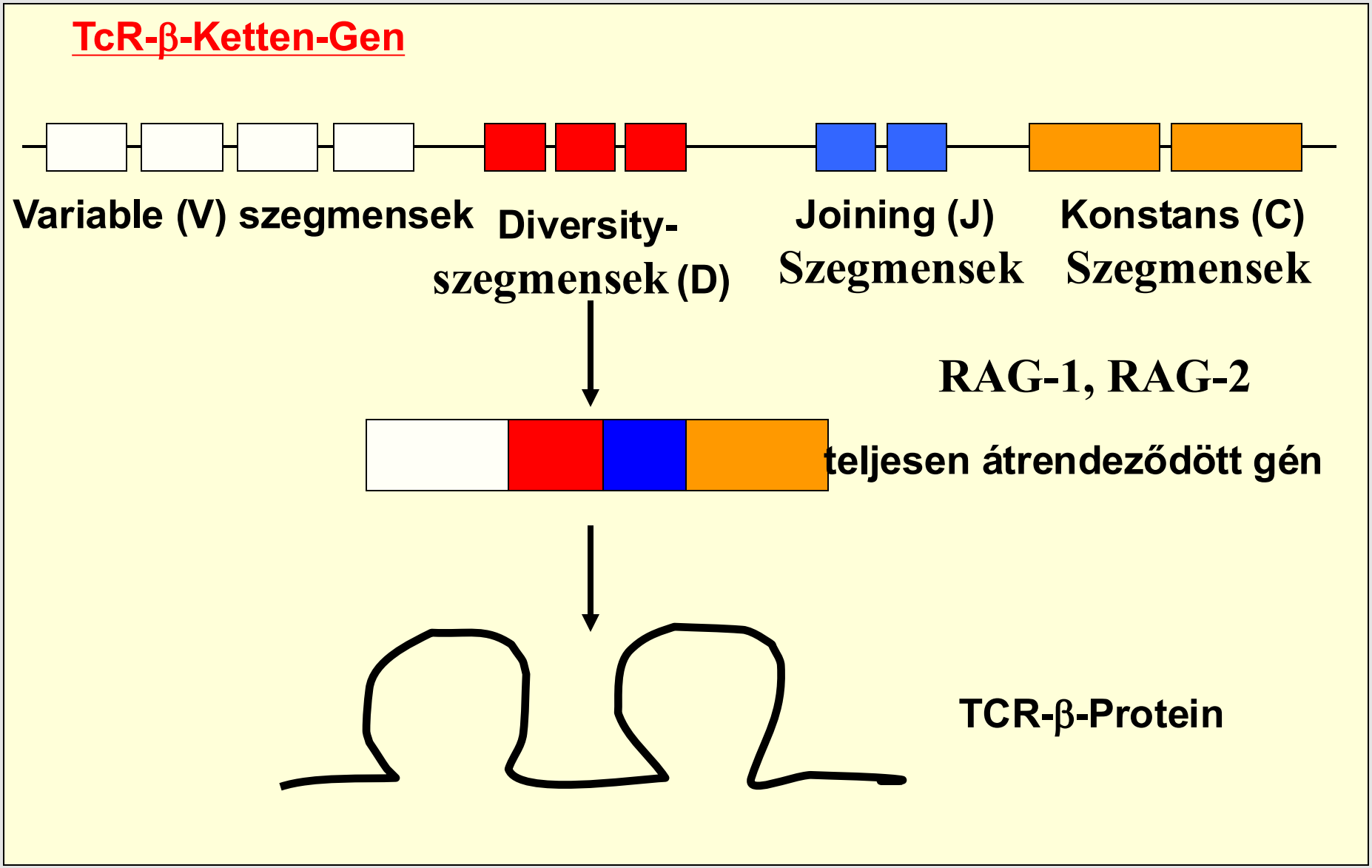
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

TcR-Gének – Csíravonal-DNS



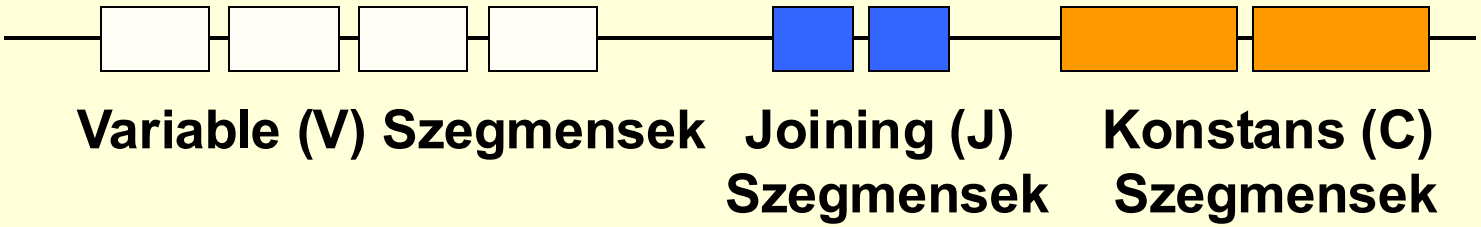
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

TcR génátrendeződés I



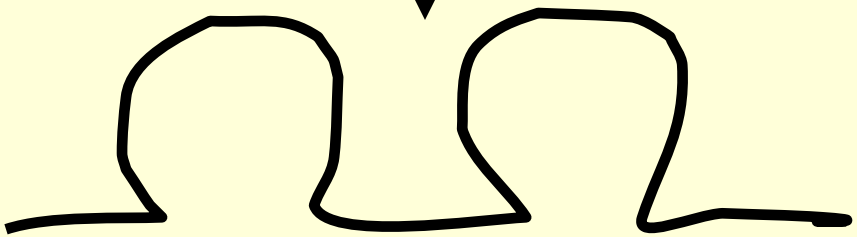
TcR génátrendeződés II

TcR-α-lánc



1. β / γ átrendeződés
2. α / δ átrendeződés

teljesen átrendeződött gén



TCR-α-Protein

TcR-Diverzitás

Tabelle 23. **Faktoren, die an der Entstehung der TCR-Diversität beteiligt sind**

	TCRαβ		*TCRγδ*	
	α	β	γ	δ
V-Gensegmente	100	25	7	10
D-Gensegmente	0	2	0	2
Offene Leseraster *N-Region-Diversität*	0 V-J	viele V-D D-J	0 V-J	viele V-D1 D1-D2 D1-J
J-Gensegmente	50	12	2	2
Kombinatorische Diversität der V-Region	2500		70	
Vollständiges Repertoire	10^{15}		10^{16}	

In: Gergely-Erdei: Immunbiologie in Bildern

A diverzitás kialakulása

- **A V- D- és J-szegmensek nagy száma és szabad rekombinációja**
- **TdT**
- **Az alegységek szabad kapcsolódása**

(IgH / IgL, TcR α / β vagy γ / δ).

A lymphocita differenciáció általános jellemzői

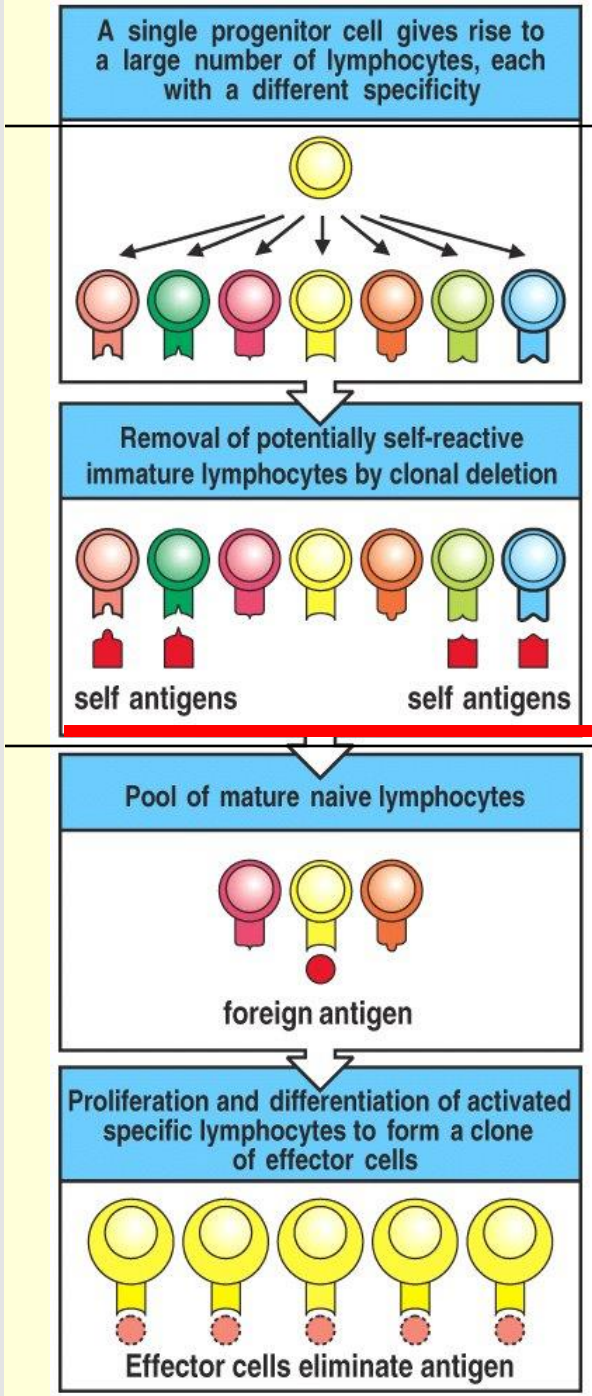


Figure 1-14 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Proliferáció

Ig- vagy TcR-génátrendeződés
→ Antigénreceptor-expresszió

Primer nyirokszervek

Szelekció

Antigénfelismerés

Perifériás nyirokszervek

Proliferáció

Minden vérsejt a csontvelői multipotens haemopoetikus őssejtből fejlődik ki.

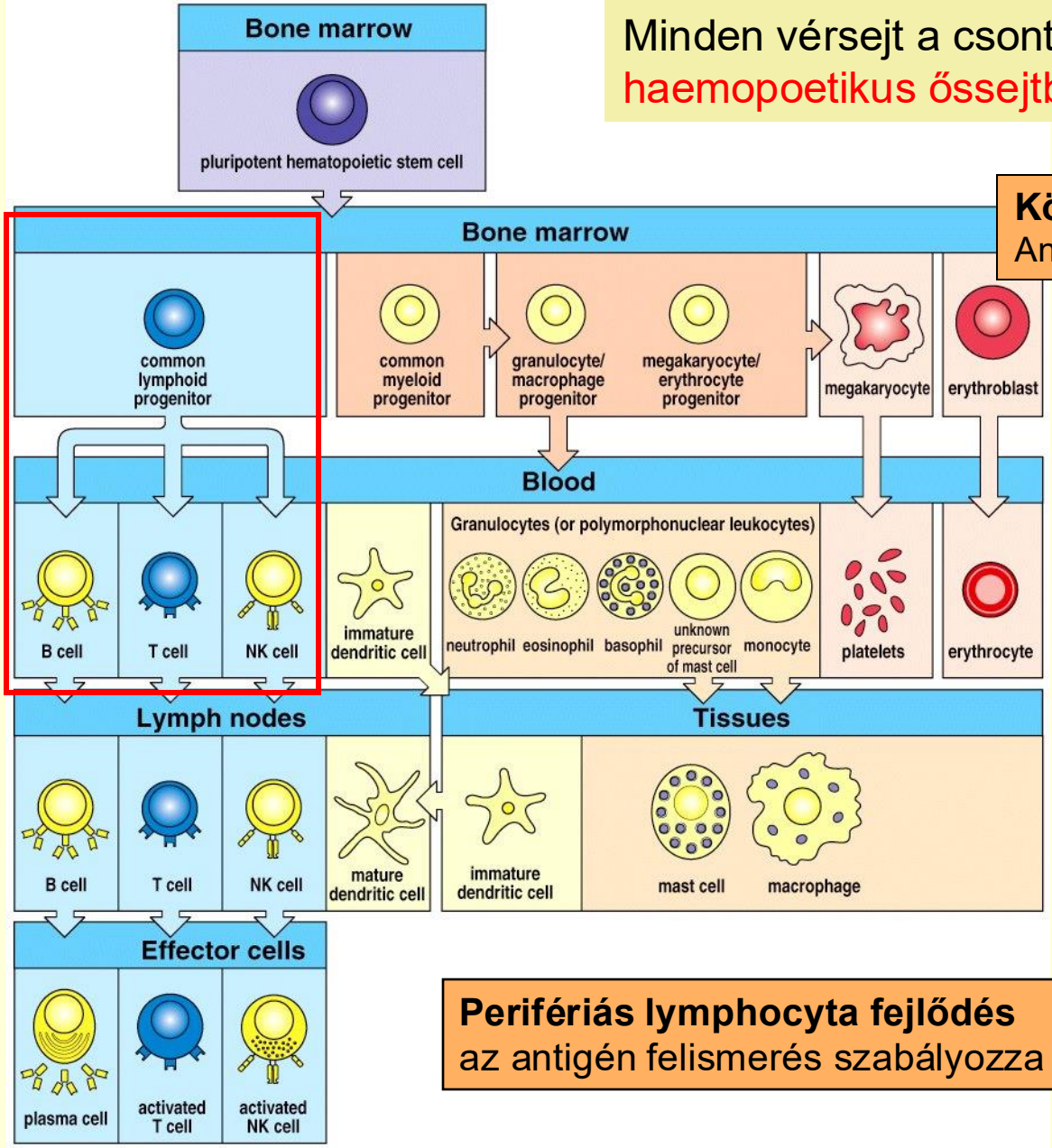


Figure 1-3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Központi lymphocyta fejlődés
Antigén-független

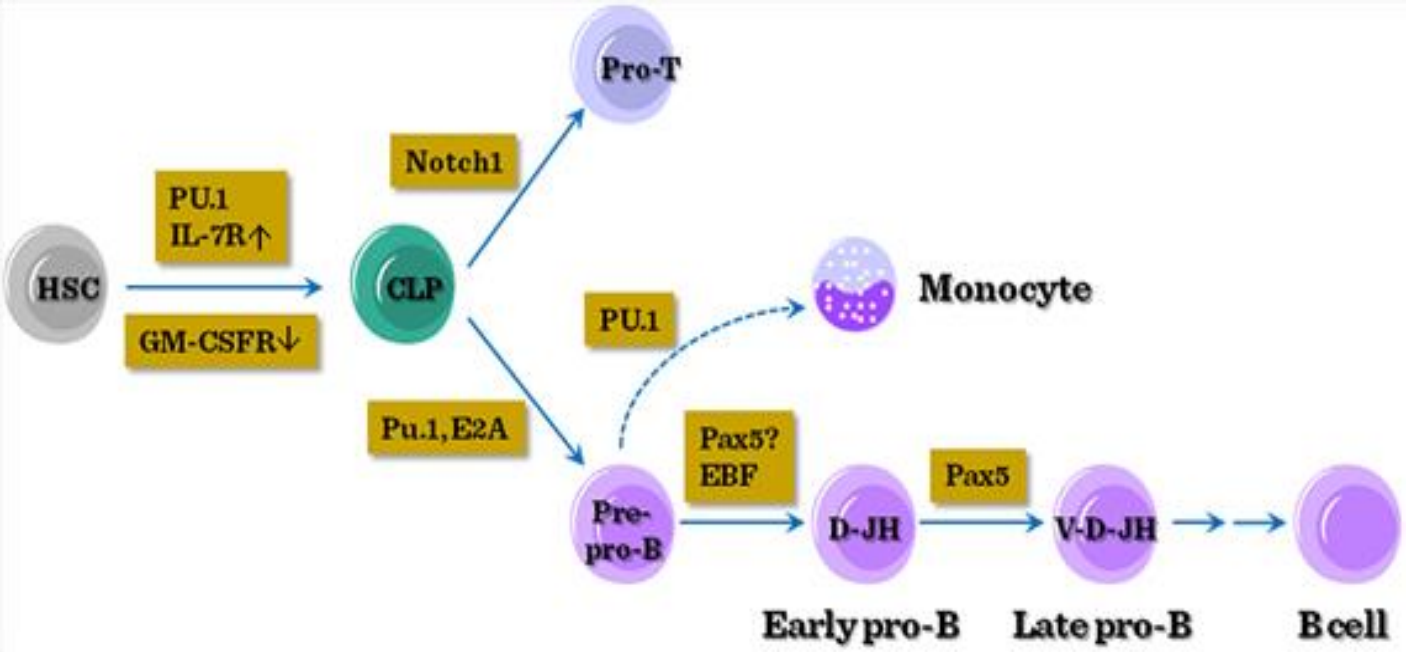
ŐSSEJT
- **„Multipotens”= nem elkötelezett**
- **önmegújuló képesség**
- **CD34+**
- **rendszeres osztódás**

Perifériás lymphocyta fejlődés
az antigén felismerés szabályozza

A lymphocyta differenciáció általános jellemzői

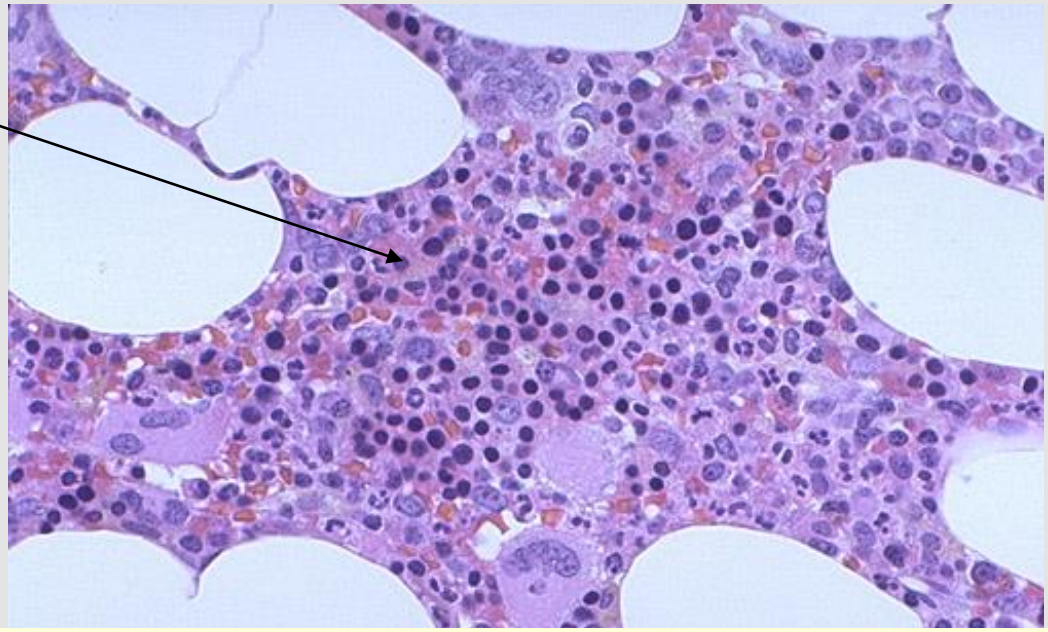
1. **Proliferáció**
2. **Receptor génátrendeződés:** funkcionális antigénreceptorok kifejeződése a sejtek felszínén
3. **Vándorlás (migráció) –** *Strómasejtek* (adhézió, kemokin termelés)
4. **Szelekció -** a lehetséges autoreaktív sejtek elpusztítása
5. **Apoptózis**

Lymphoid elköteleződés – Transzkripciós faktorok



in: Transdifferentiation and regenerative medicine (Prof. Dr. Péter Balogh, Dr. Péter Engelmann (2011); University of Pécs)

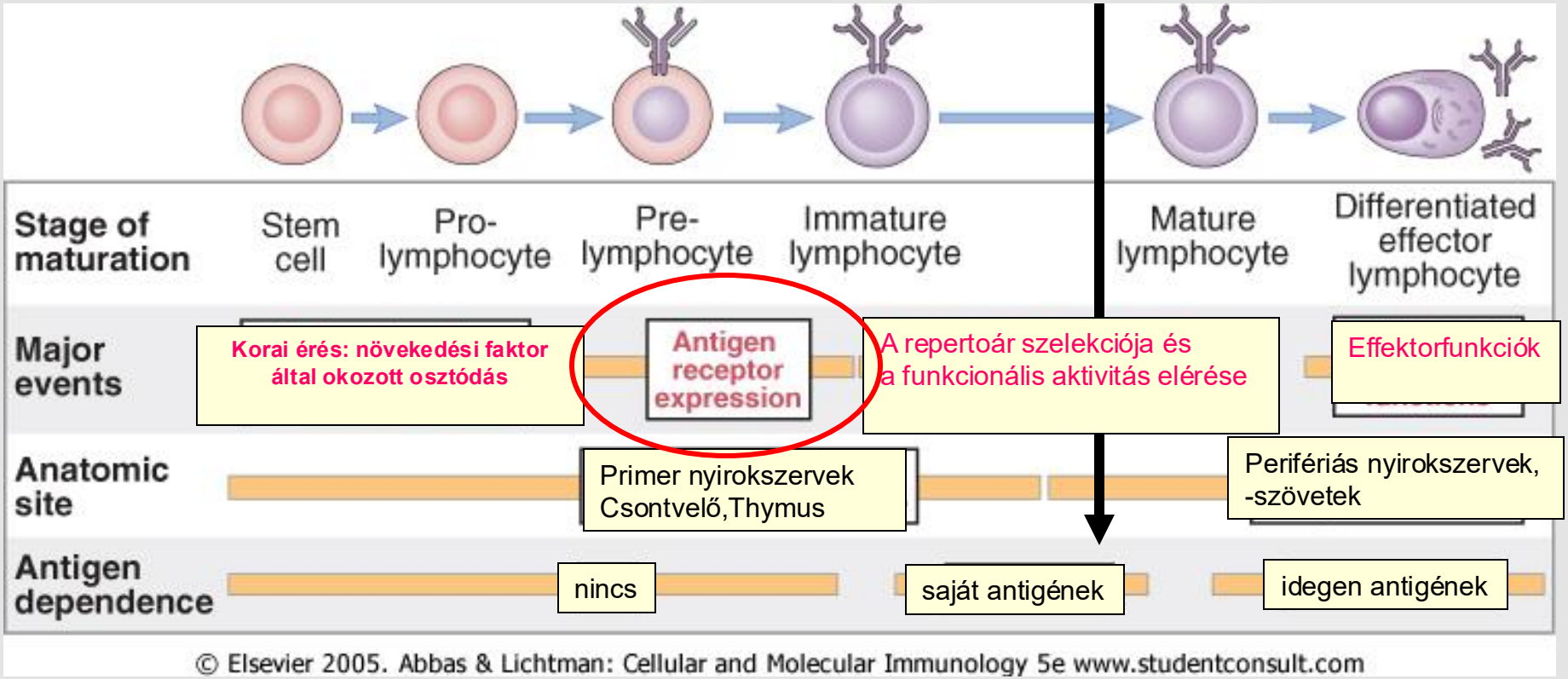
A csontvelői strómasejtek szerepe



<u>Stróma sejtek:</u>
- nem-lymphoid
- nyúlványok
- adhéziós molekulák (pl. CD44, VCAM-1**)**
- citokin termelés (pl. IL-7, IL-3, SCF)
- a sejtek differenciációját módosító anyagok termelése (pl. Wnt-faktorok, IL-4, extracelluláris mátrix komponensek)
- kemokin termelés (pl. SDF-1/CXCR4-Ligand)
- szelekciós folyamatok

A lymphocyta érés stádiumai

vándorlás a perifériás nyirokszervekbe

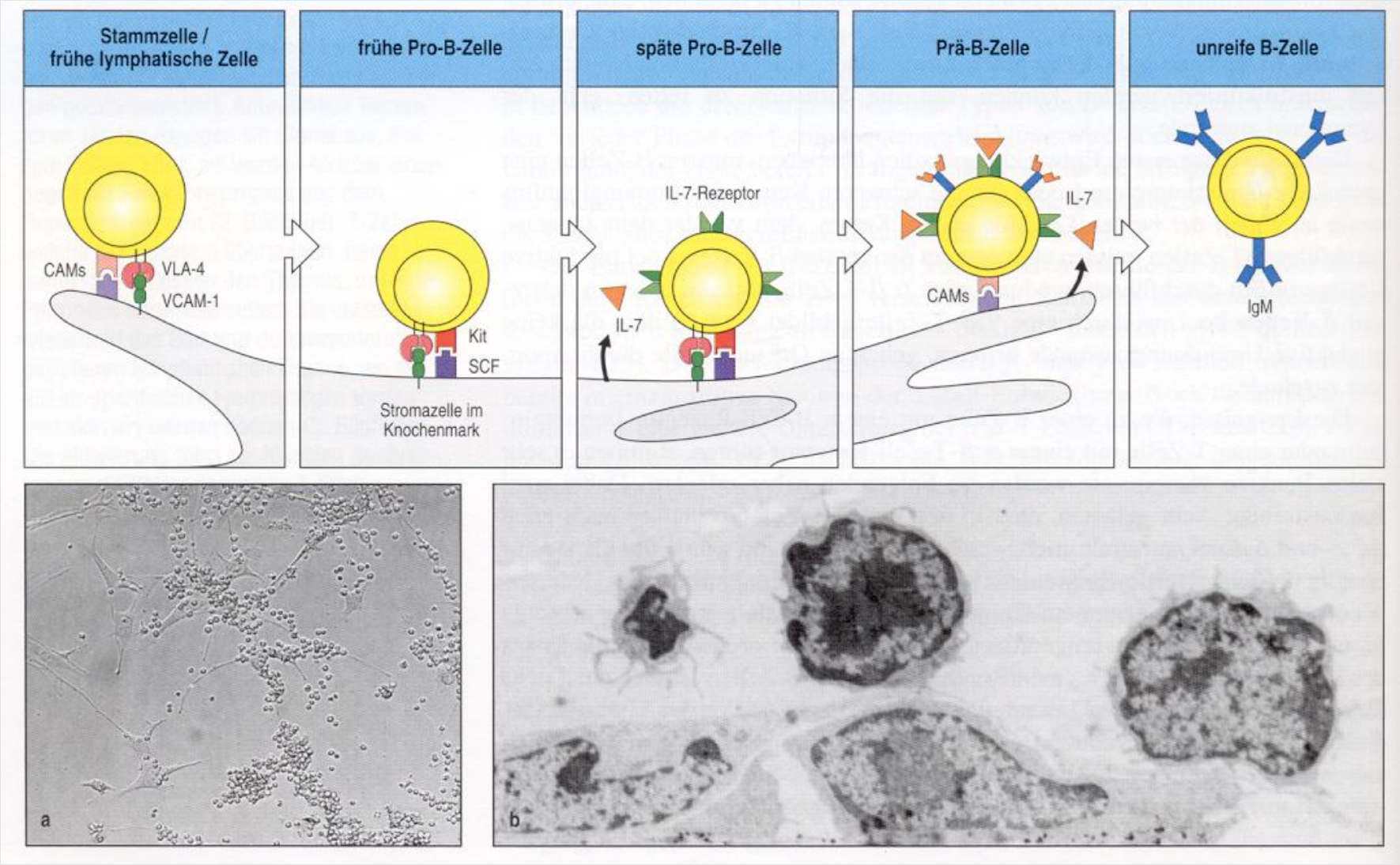


A B sejt fejlődés

1. Centrális: Antigén-független – a csontvelőben

2. Perifériás: az antigén által szabályozott – a másodlagos nyirokszövetekben

Csontvelői strómasejtek



Az össejtekből az érett B sejtekig tartó fejlődési szakaszokat fenotipus- és genotípus markerek segítségével jellemezhetjük.

Csontvelő I: Őssejt > “nagy pre-B sejt”

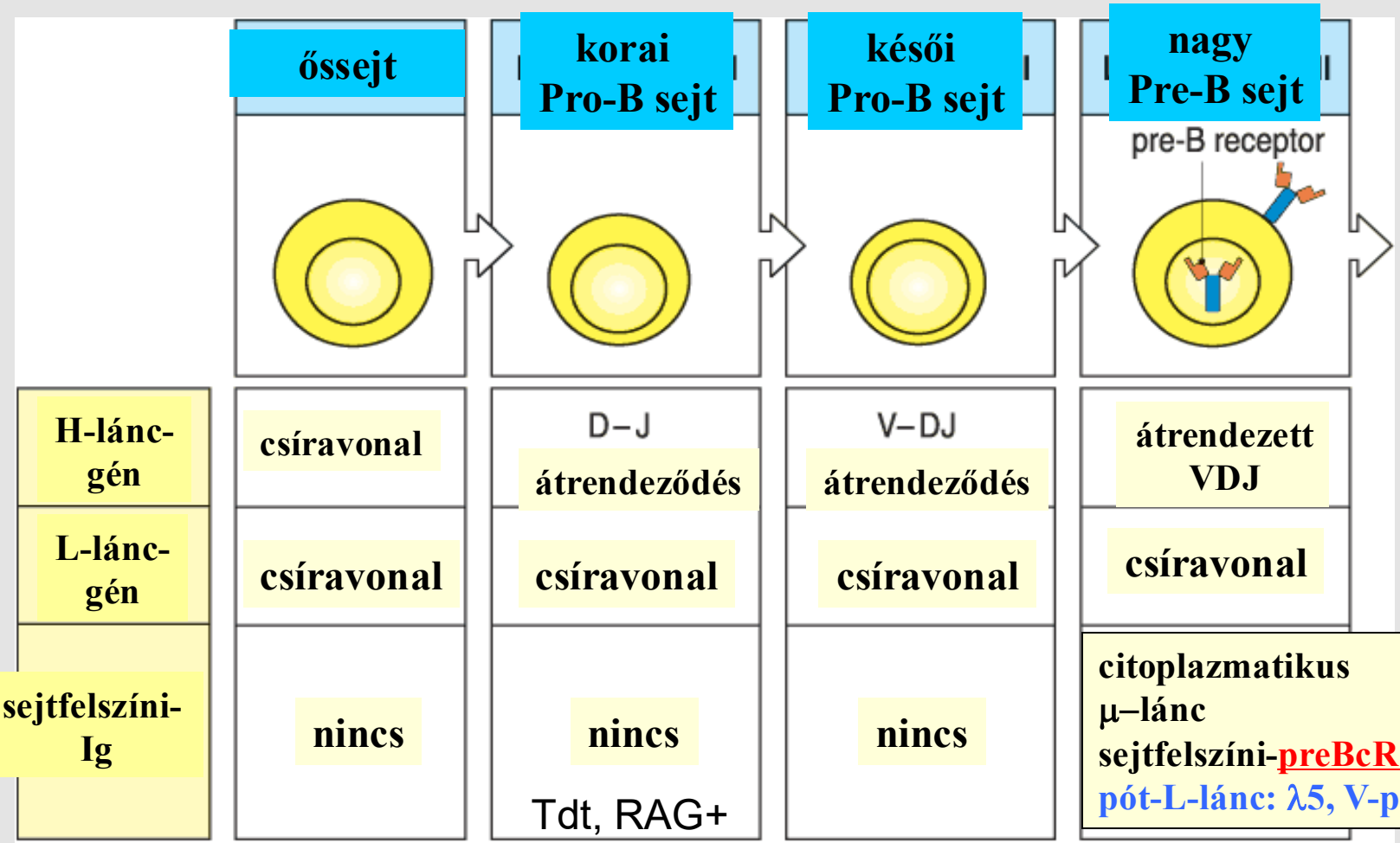


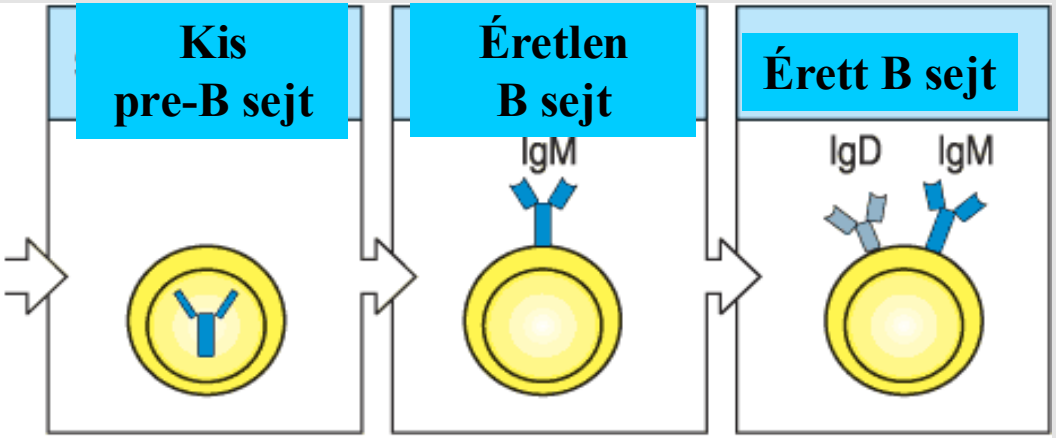
Fig 7.5 part 1 of 2 © 2001 Garland Science

sejtfelszíni molekulák

c-kit, CD43, CD45 CD34, CD19, CD10, CD20

CD22, CD25

Csontvelő II: “kis pre-B sejt” > “érett B sejt”

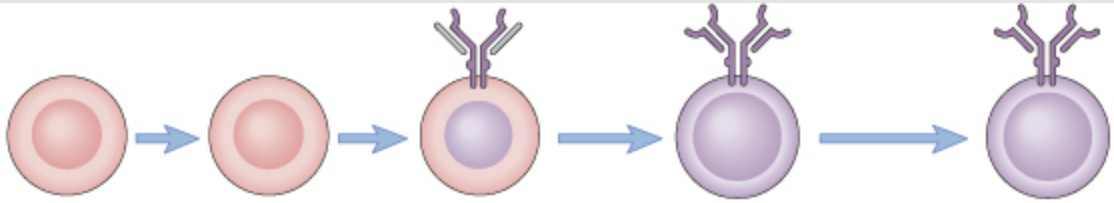


	Kis pre-B sejt	Éretlen B sejt	Érett B sejt
H-lánc-gén	átrendezett VDJ	átrendezett VDJ	átrendezett VDJ
L-lánc-gén	átrendeződés	átrendezett VJ	átrendezett VJ
sejtfelszíni-Ig	Intracelluláris μ lánc	sejtfelszini IgM	sejtfelszini IgM és -IgD (alternatív splicing)

Fig 7.5 part 2 of 2 © 2001 Garland Science

sejtfelszíni molekulák	CD19,CD20	
	CD25	MHC-II, CD21, CD40

Szelekciós folyamatok a csontvelőben



Stage of maturation	Stem cell	Pro-B	Pre-B	Immature B	Mature B
Proliferation					
RAG expression					
TdT expression					
Ig DNA, RNA	Unrecombined (germline) DNA	Unrecombined (germline) DNA	Recombined H chain gene (VDJ); μ mRNA	Recombined H chain gene (VDJ), κ or λ genes (VJ); μ or κ or λ mRNA	Alternative splicing of VDJ-C RNA (primary transcript) to form Cμ and Cδ mRNA
Ig expression	None	None	Cytoplasmic μ and pre-B receptor–associated μ	Membrane IgM (μ + κ or λ light chain)	Membrane IgM and IgD
Surface markers	CD34+	CD43+ CD19+ CD10+	B220lo CD43+	IgMlo CD43-	IgMhi
Anatomic site	Bone marrow			Bone marrow / Periphery	Periphery
Response to antigen	None	None	None	Negative selection (deletion), receptor editing	Activation (proliferation and differentiation)

© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Szelekciós folyamatok a csontvelőben

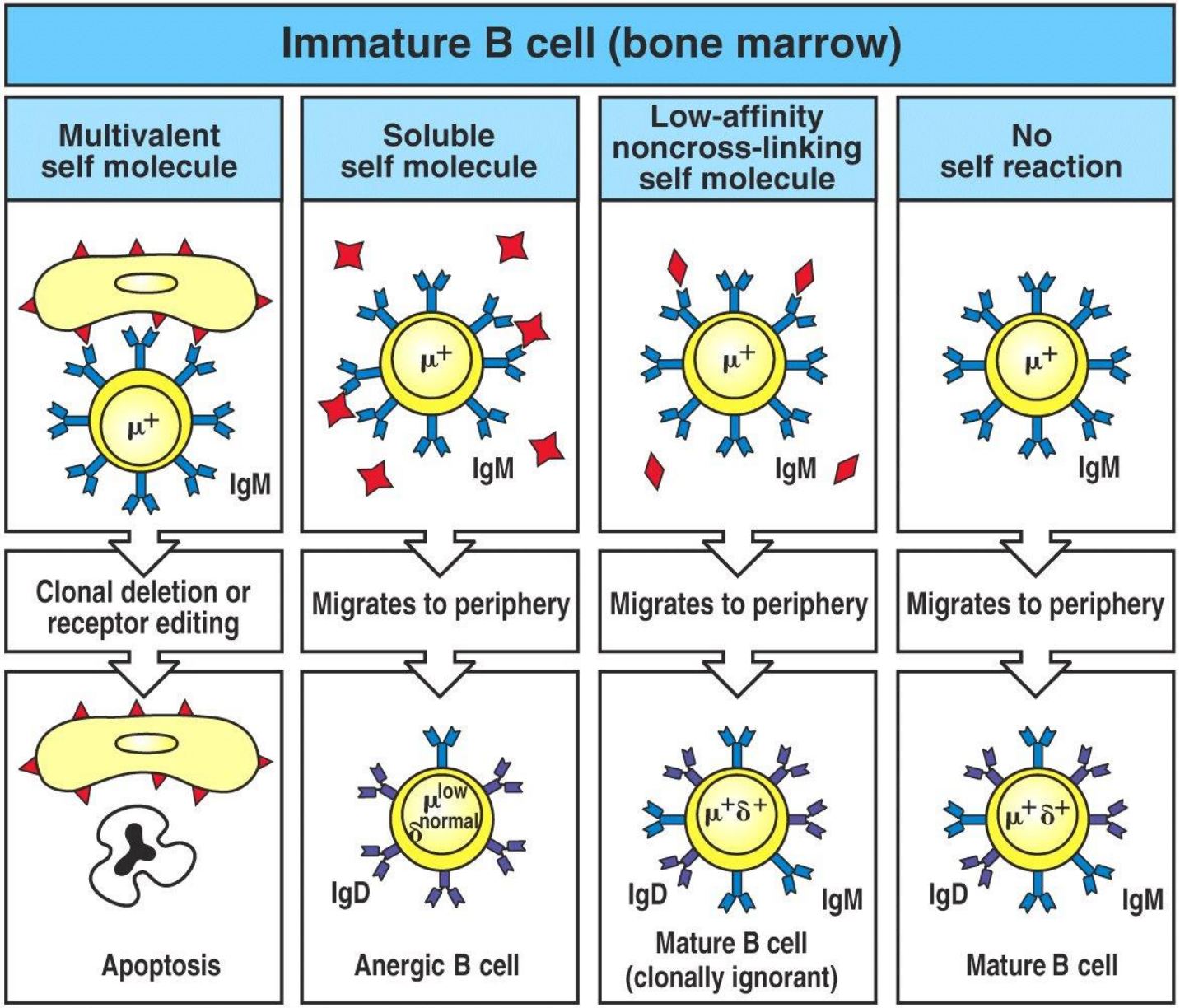
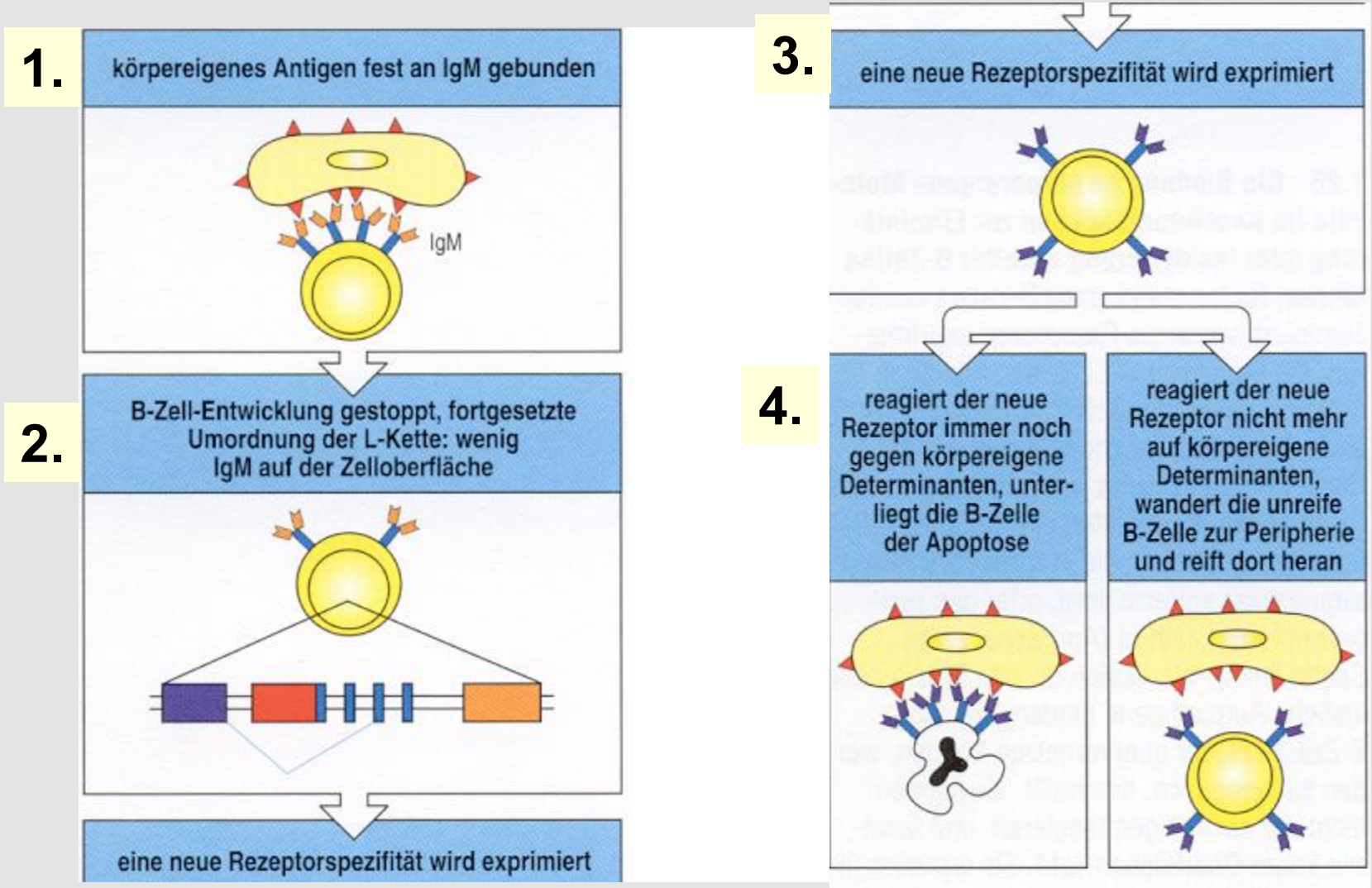


Figure 7-26 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

„Receptor editing"

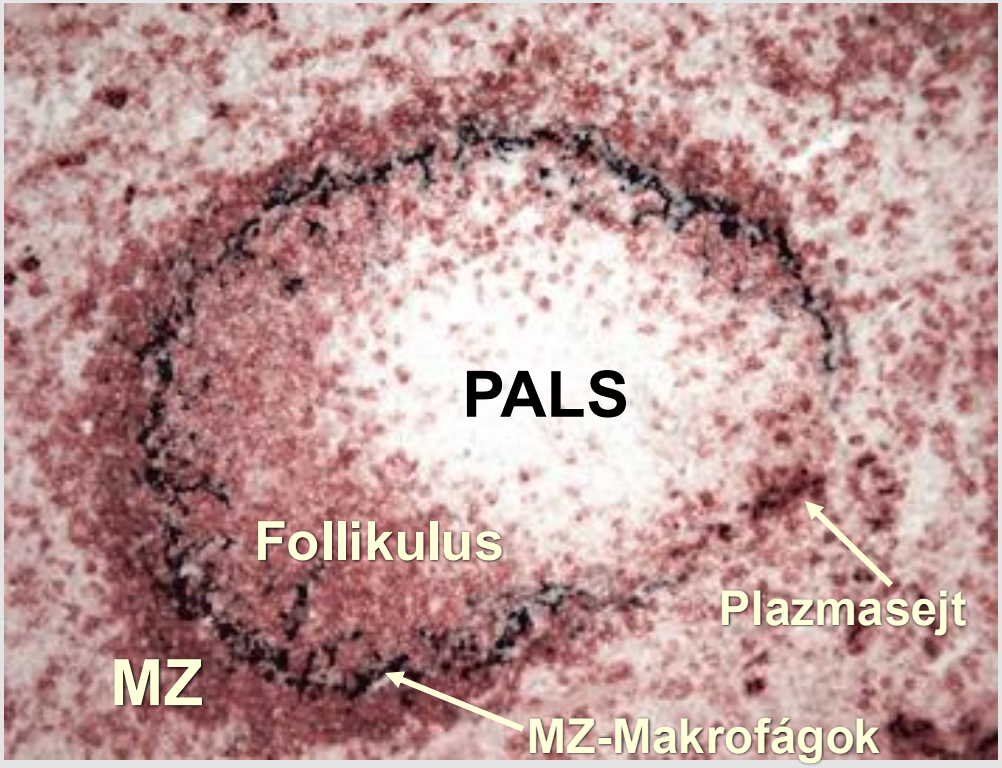


A perifériás B sejt alcsoportok ontogenetikai különbségei

- **Konvencionális follikuláris B sejtek (B2):** (IgM+/IgD++, CD21+, CD23++, recirkuláció)

- **B-1 sejtek:** önmegújító képesség, alacsony affinitású autoantitest termelés, megtelepedés a pleuran ill. peritoneumban, relatív túlsúly újszülöttkorban (és B-CLL); (CD5+, CD43+, IgM++/IgD+)

- **Marginális zóna B sejtek**: a B1 sejtekhez hasonló Ig-fenotípus, differenciálódás a lépben, nincs vándorlás (IgM++/IgD+, CD21++, CD23+/-)



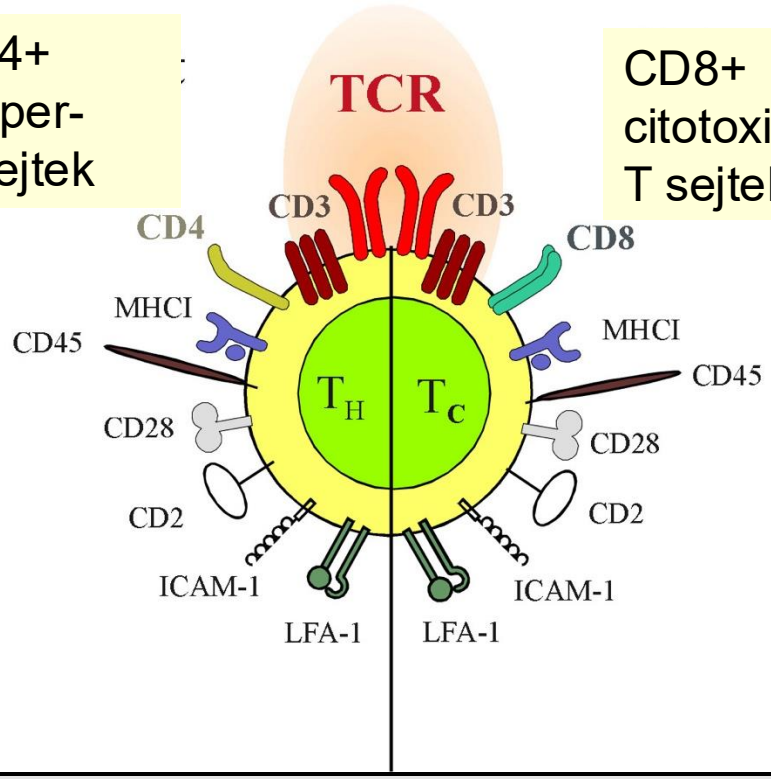
A központi (thymus) T sejt fejlődés

Két különböző T sejt vonal a TcR típus alapján

T lymfociták αβ TcR-al

CD4+
Helper-
T sejtek

CD8+
citotoxikus
T sejtek



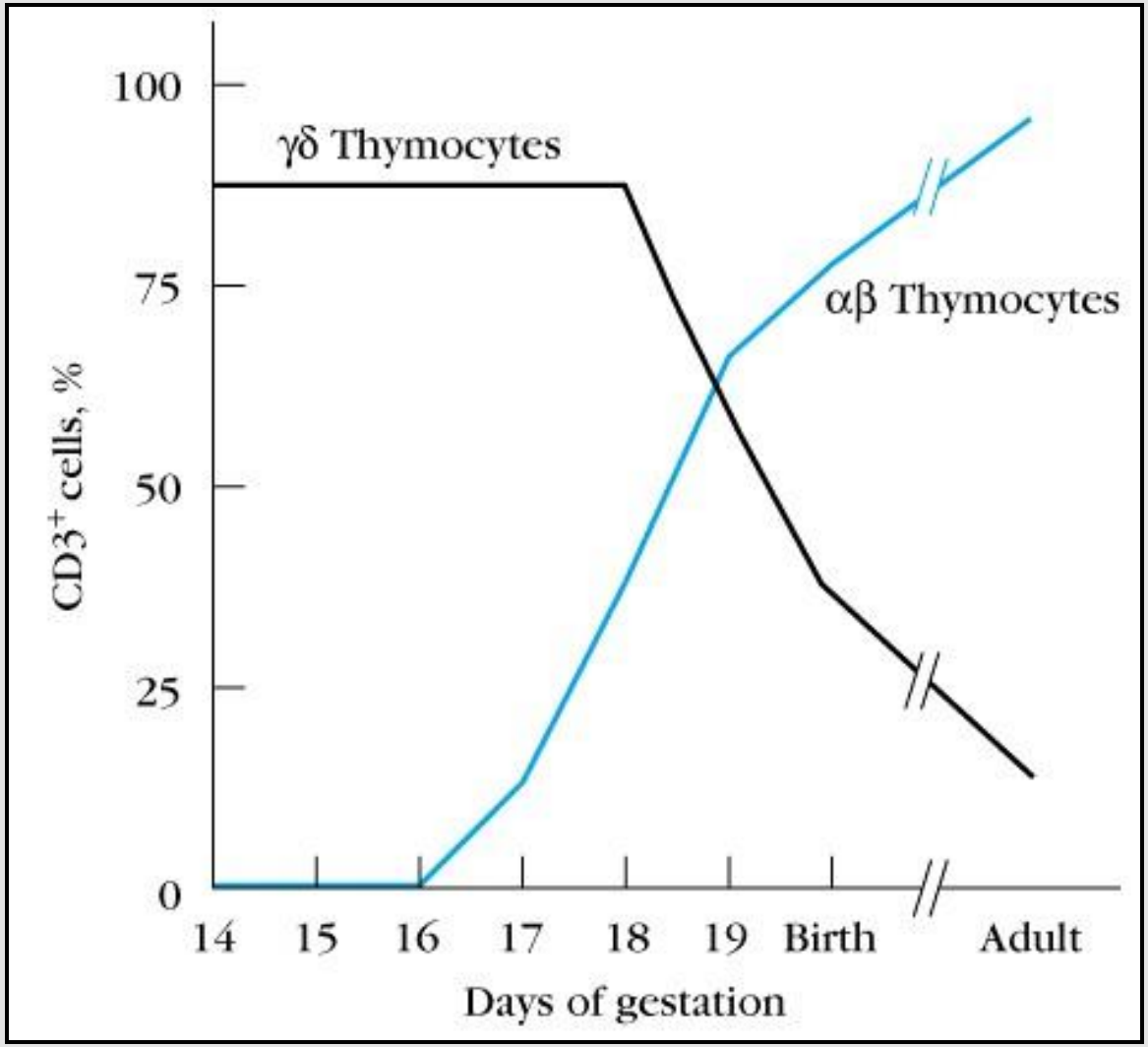
T lymfociták γδ TcR-al

- CD4-CD8- citotoxikus T sejtek

Intraepitheliális – alacsony diverzitású TcR

Limfoid szervek – erősen diverz receptorok regulatórikus citokin termelés

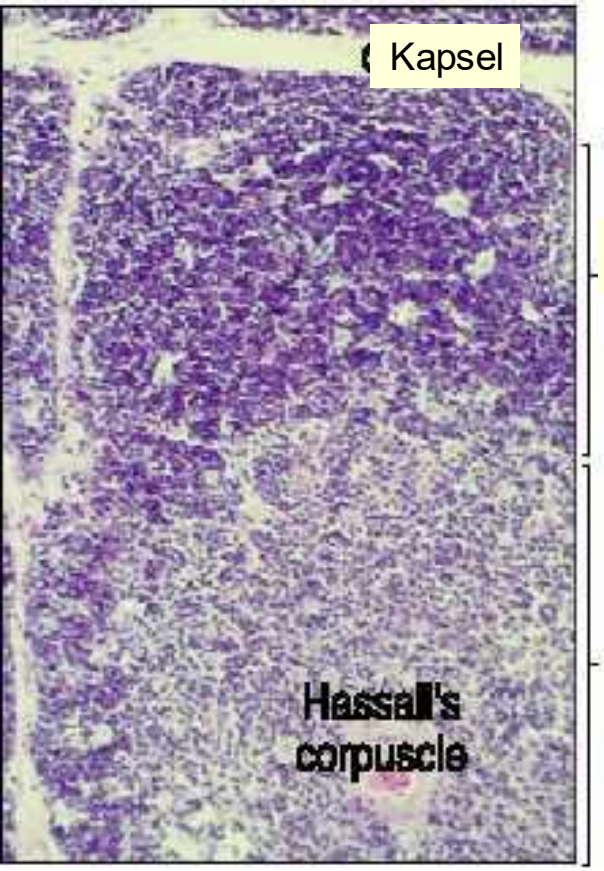
A T sejt csoportok számának alakulása az élet során

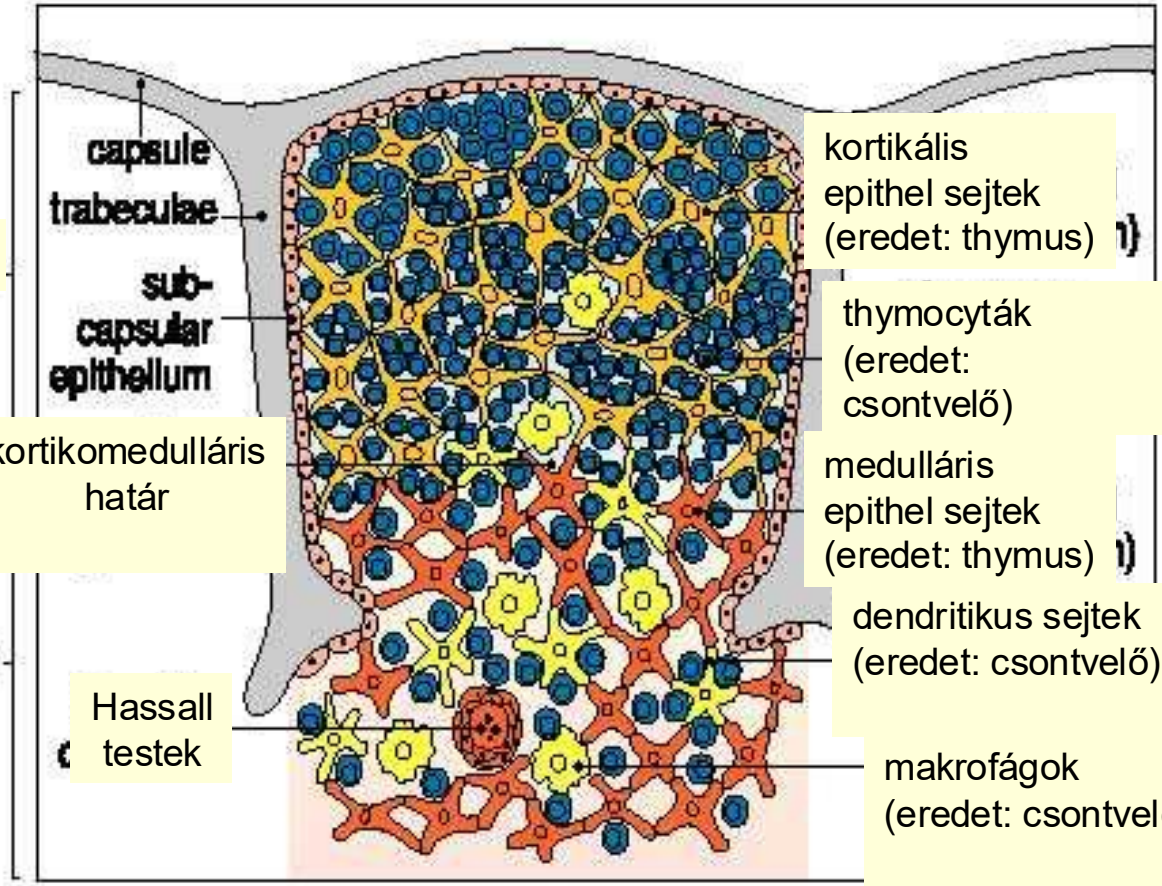


az egész repertoár:
TCR α, β: 10^{15}
TCR γ, δ: 10^{16}

A thymus szerkezete

Figure 5.3





© 2000 Garland Publishing/Elsevier Science

A thymus strómasejtek funkciója

Kortikális epithelsejtek:

- kemotaktikus jeleket termelnek a hemopoetikus előalakok számára
- túlélési és differenciációs jelek termelése
- saját antigének prezentálása a pozitív szelekcióhoz

Medulláris epithelsejtek, dendritikus sejtek és makrofágok:

- saját antigének prezentációja a negatív szelekcióhoz
- az apoptotikus sejtmaradványok eltakarítása

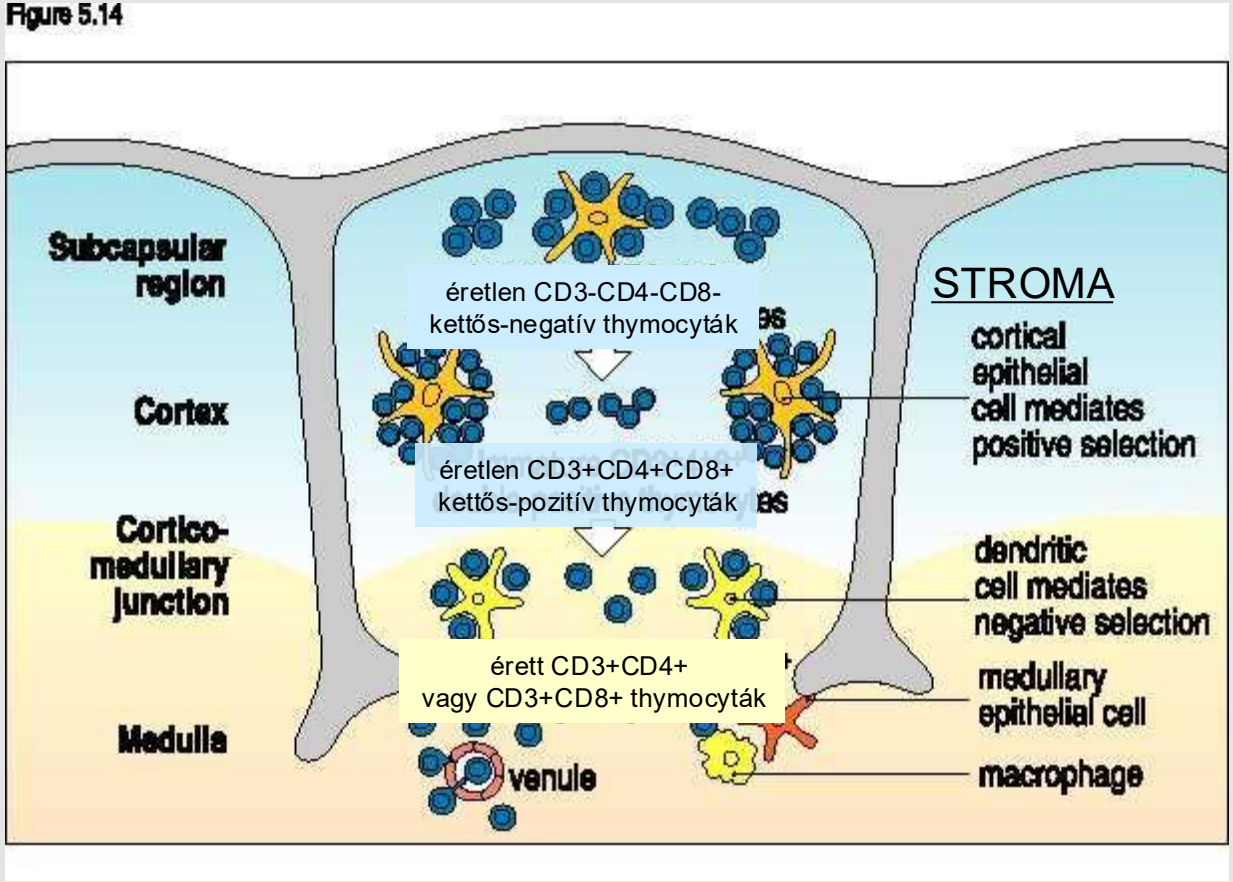
Thymocyta alcsoportok

Thymocyták:

kettős negatív
DN: 2-5 %

kettős pozitív
DP: 75-80%

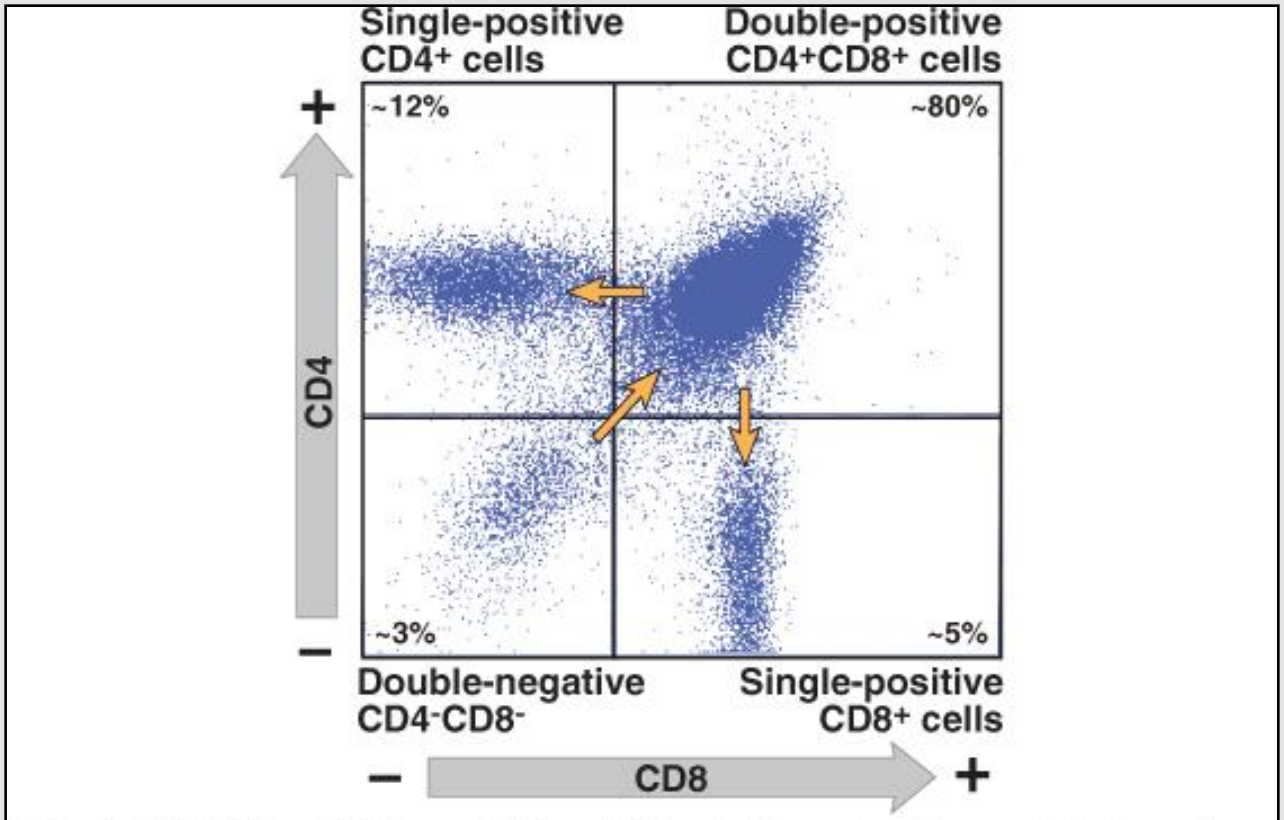
egyszeresen pozitív
CD4 SP: 10-15%
CD8 SP: 5-8%



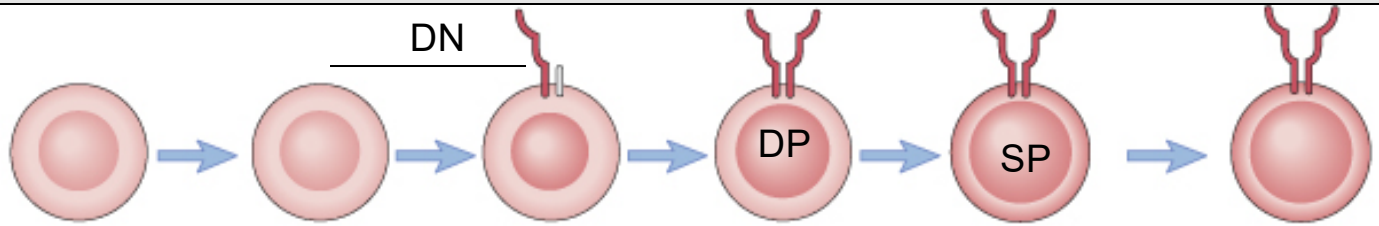
Fiatal egerekben naponta $5x10^7$ T sejt képződik (~25% az összes thymocytának).
A szelekciós folyamatok során a tnymocyták ~98 % apoptózissal elpusztul.

1-2 x 10^6 érett T sejt jut ki naponta a perifériára.

Thymocyta alcsoportok



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



Stage of maturation	Stem cell	Pro-T	Pre-T	Double positive	Single positive (immature T cell)	Naive mature T cell
Proliferation						
RAG expression						
TdT expression						
TCR DNA, RNA	Unrecombined (germline) DNA	Unrecombined (germline) DNA	Recombined β chain gene [V(D)J-C]; β chain mRNA	Recombined β, α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA	Recombined β, α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA	Recombined β, α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA
TCR expression	None	None	Pre-T receptor (β chain/pre-T α)	Membrane αβ TCR	Membrane αβ TCR	Membrane αβ TCR
Surface markers	CD34+ c-*kit*+ CD44+ CD25-	c-*kit*+ CD44+ CD25+ CD5, CD7	c-*kit*+ CD44+ CD25+	CD4+CD8+ TCR/CD3lo	CD4+CD8- or CD4-CD8+ TCR/CD3hi	CD4+CD8- or CD4-CD8+ TCR/CD3hi
Anatomic site	Bone marrow	Thymus				Periphery
Response to antigen	None	None	None	Positive and negative selection	Negative selection	Activation (proliferation and differentiation)

© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

A thymocyta érés szabályozása

- **Sejtfelszíni molekulák – adhéziós molekulák (CD44), CD28 – B7.1/7.2 , Notch – Notch-Ligand-kölcsönhatások, kemokin receptorok**

- **Humorális faktorok – citokinek (IL-7), kemokinek, thymozin, prothymozin-α, thymulin (FTS-Zn), thymopoietin, thymostimulin (TP-1), thymus humorális faktor (THF) és THF-g2, glukokortikoid-hormon (GC)**

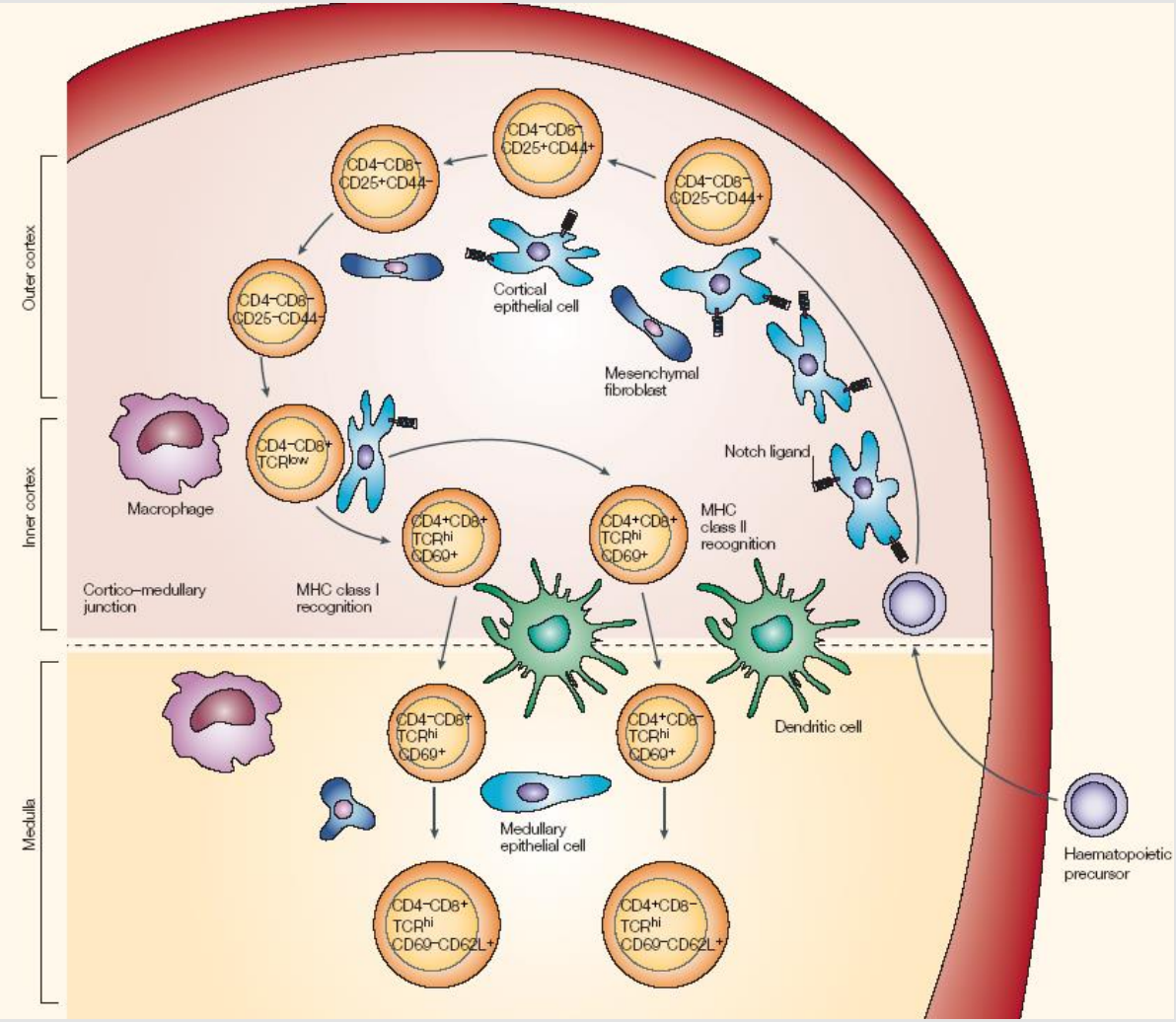
A strómasejtek szabályozzák a T sejt érést

1. Vándorlás:
   kemokinek

2. Proliferáció
   IL-7

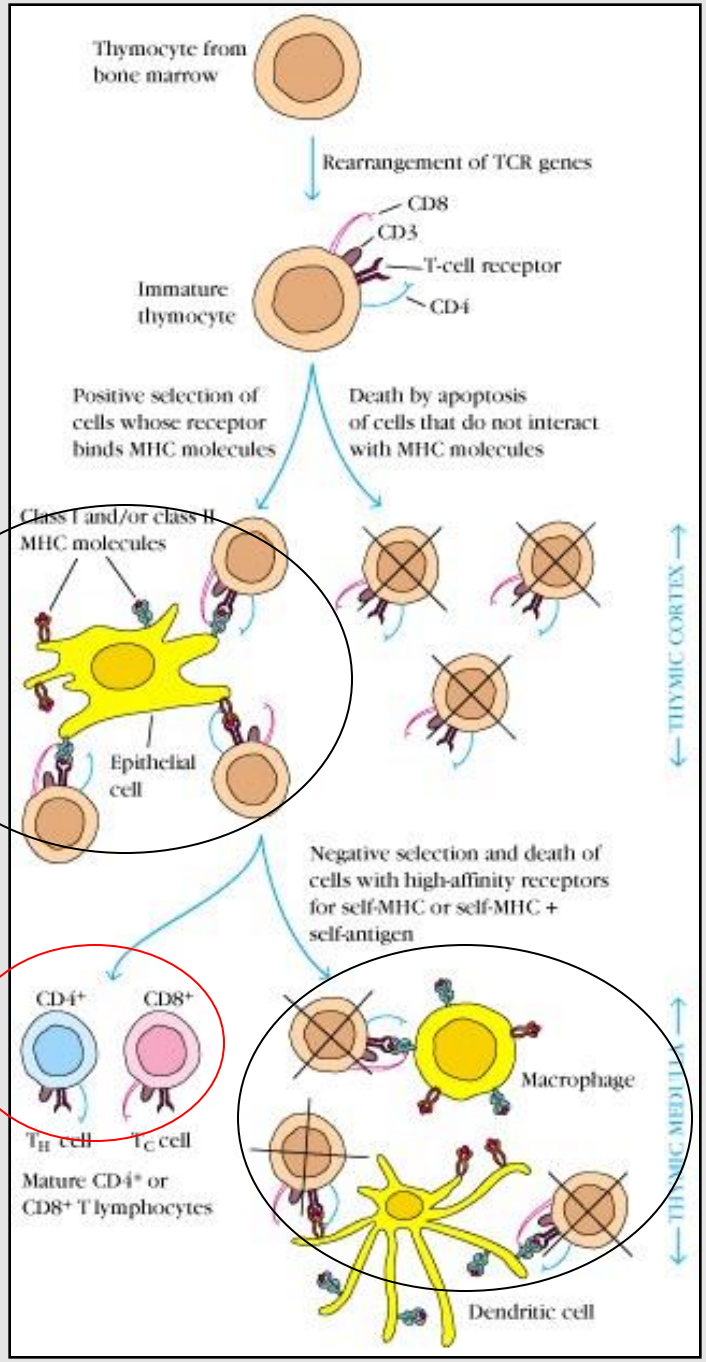
3. Differenciáció
   - TcR-génátrendeződés
   - fenotípus-változások

4. Szelekció
   Apoptózis



FOXN1: - Thymusepithel sejt differenciáció, Bőrsejtek
- Hiánya: “Nude egér” (T sejt hiány & szőr hiánya)

Thymus szelekciós folyamatok



Pozitív szelekció:

Epithel sejtek – DP-thymocyták kölcsönhatása a thymus kortexben

Azok a DP sejtek, amik képesek saját MHC-molekulákat felismerni túlélnek.
→ MHC-RESTRIKCIÓ

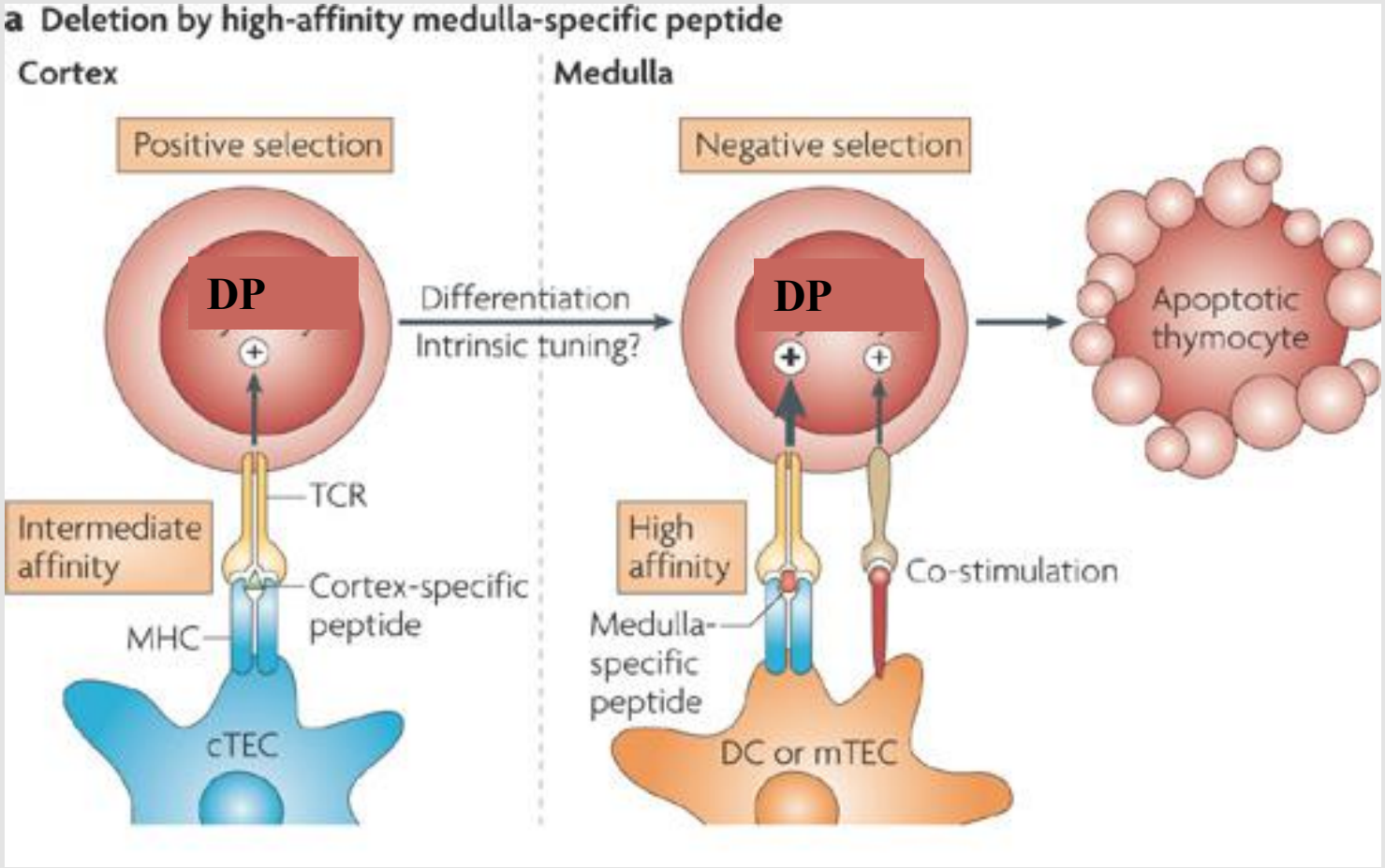
Negatív szelekció:

APC (Makrofág vagy DC) – DP-thymocyta kölcsönhatás a thymus medullában

Azon sejtek apoptózisa, amelyek TcR-al saját antigénekhez kötődnek nagy affinitással
→ TOLERANCIA

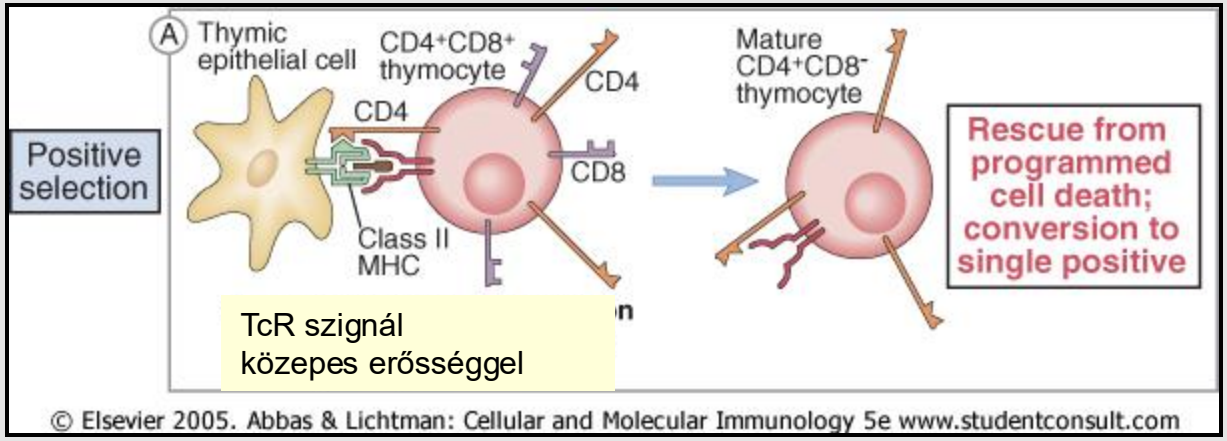
Differenciáció érett T sejtekké

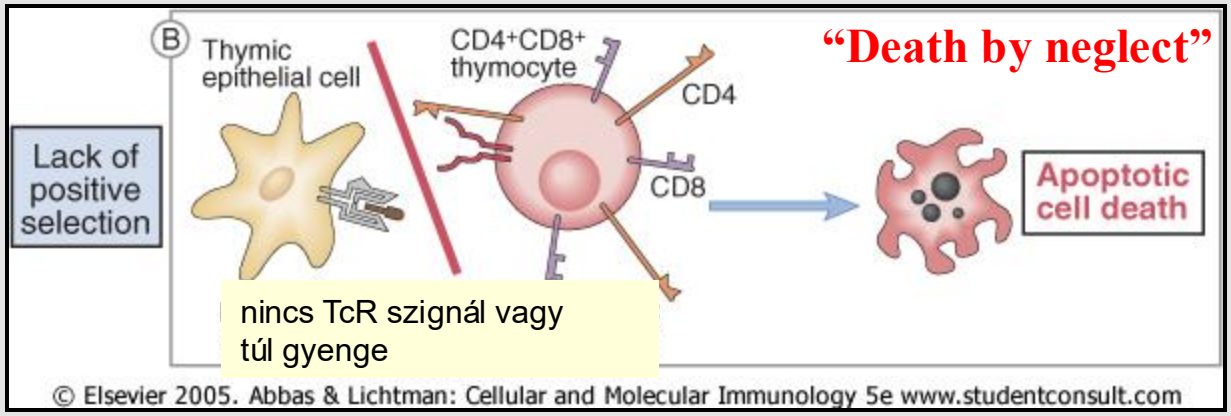
A pozitív / negatív szelekció affinitás modellje

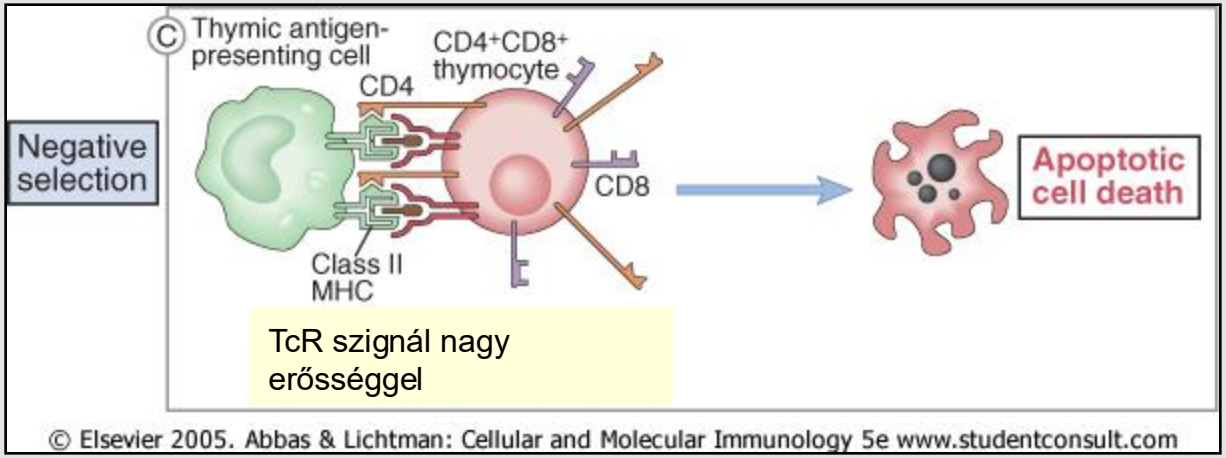


AIRE (=Autoimmune regulator):

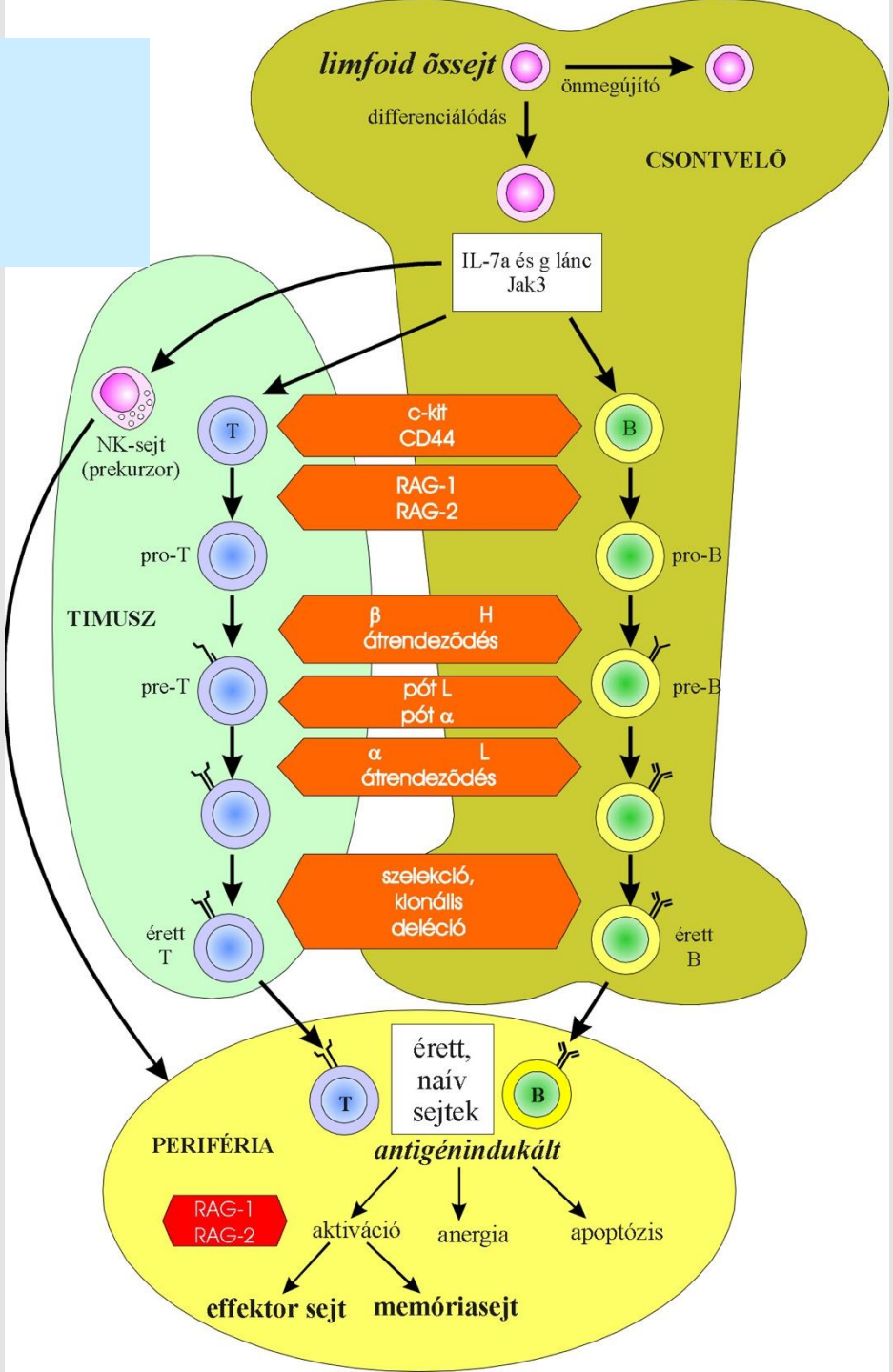
- “Promiszkuus” génexpresszió az epithel sejtekben (thymuson kívüli antigének exressziója)
- Hiánya: multiplex autoimmun betegségek kialakulása


A
Thymic epithelial cell
CD4+CD8+ thymocyte
CD4
CD4
CD8
Class II MHC
Mature CD4+CD8- thymocyte
Positive selection
Rescue from programmed cell death; conversion to single positive
TcR szignál
közepes erősséggel
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

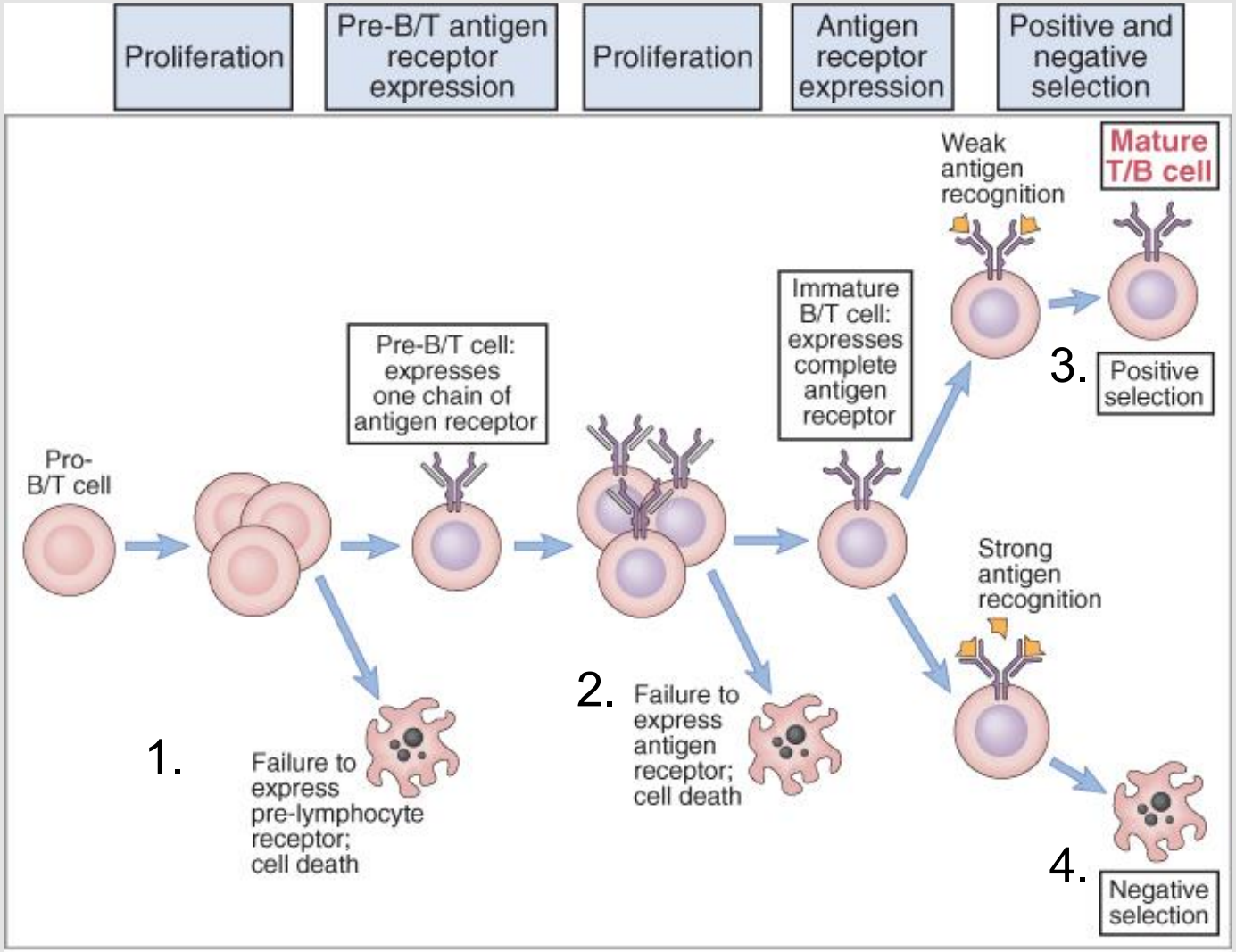

B
Thymic epithelial cell
CD4+CD8+ thymocyte
CD4
CD8
"Death by neglect"
Lack of positive selection
Apoptotic cell death
nincs TcR szignál vagy
túl gyenge
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com


C
Thymic antigen-presenting cell
CD4+CD8+ thymocyte
CD4
CD8
Class II MHC
Negative selection
Apoptotic cell death
TcR szignál nagy
erősséggel
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

A B- és T sejt érés hasonlóságai



„Ellenőrző pontok” a központi B/T-lymphocyta érésben



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Köszönjük a figyelmet!