

6.1.GAIA: B linfzitoen antígeno-hartzaileen sormena eta aldakortasuna

Sarrera

Hautapen klonalaren teoría:

- Antigenoen hartzaileak antígenoarekin kontaktuan egon baino lehenago adierazten dira (peptidoa ezagutu dezakete ala ez). Hau da, B linfocito asko ekoizten dira BCR mota asko baitaude. Soilik gutxi batzuek batuko dira beraien antígeno espezifikoarekin.
- Linfzito bakoitzak **espezifizitate bakarreko errezeptore** mota bakarra dauka .
- Txarto eratutako edo molekula propioetarako errezeptoreak dauzkaten zelulak, goiz desagertuko dira .
- Antigenoak, linfzito aproposarekin topo egin eta gero, **linfzitoaren aktibazioa** eragiten du. Honen errezeptorearen espezifizitate bereko zelula efektoreak sortuko dira

Dibertsitatea lortzeko:

- **Aldakortasun naturaleko** mekanismoak:

- **Hezur-muina:** BLen ontogenian, antígenoarekin kontaktuan egon baino lehen

- **Aldakortasun adaptatiboaren** mekanismoak (**induzitua**)

- **Ehun linfoide sekundarioetan:** antígenoarekin kontaktuan egon eta gero .

Errekonbinazio somatikoa :

- Zelula heldugabeetan

- Soilik hezur-muineko B zelula heldugabeetan eta timoan garatzen ari diren T zeluletan
- Konplexu entzimatikoa: **V(D)J errekonbinasa**.

- Linfzitoen antigenorako hartzaileak DNAREN **hautazko errekonbinazio prozesuen bidez** eratzen dira, **ez dute antigenoaren beharra** (antígenoarekiko prozesu

independentea) . Antigenoarekin kontaktuan egon baino lehen gertatzen den prozesua da.

Ig-en dibertsitatearen eraketa

- Alde aldakorra DNA lerro germinalean:

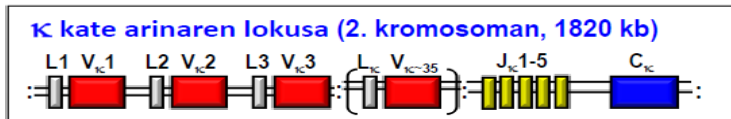
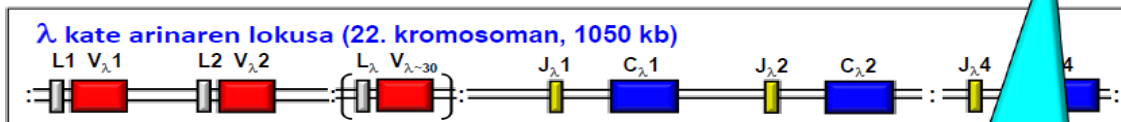
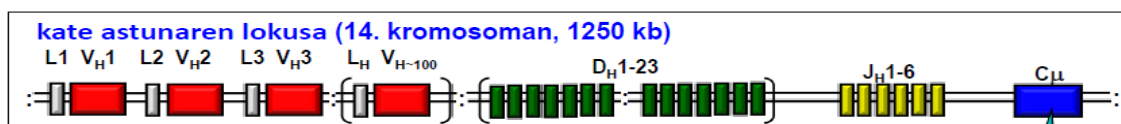
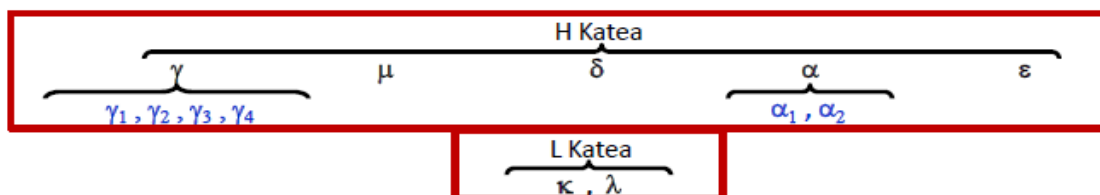
- **Kate arina (L): V eta J gene anitz**

- **Kate astuna (H): V, D eta J gene anitz**

Beraz, segmentuen ausazko aukeraketak Ig-en V aldean dibertsitate zabala ahalbidetzen du.

- Ig geneen antolaketa (kromosoma ezberdinetan):

- **L katearentzat bi lokus: L_k eta L_λ : 2. eta 22. kromosoman**
- **H katearentzat lokus bat: 14. kromosoman**

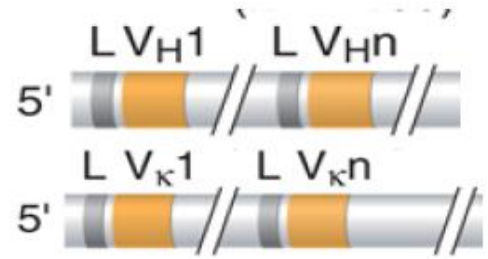


L zatiak: "leader" sekuentziak.

Horrela beraz, pillla bat konbinazio egin ditzakegu.

- **V geneak** (+/- 300 pb): 5' aldean: exon liderra (**L**):

- 30 (+/-) aminoazidozko peptido lider edo seinalea kodetzen du
- Gene promotorea transkripziorako. Ezinbestekoak transkripzioa gertatzeko.



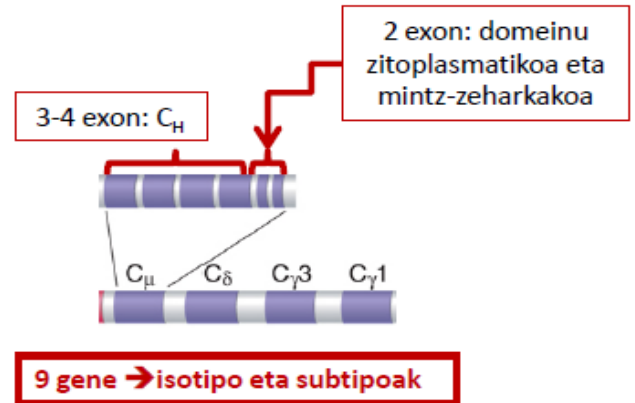
- **Kate astuna:** 9 C gene (CH) : Zergatik 9 C gene 5 Ig talde badaude? Isotipo eta subtipoak egiteko.

- (CH bakoitzak 5-6 exon)

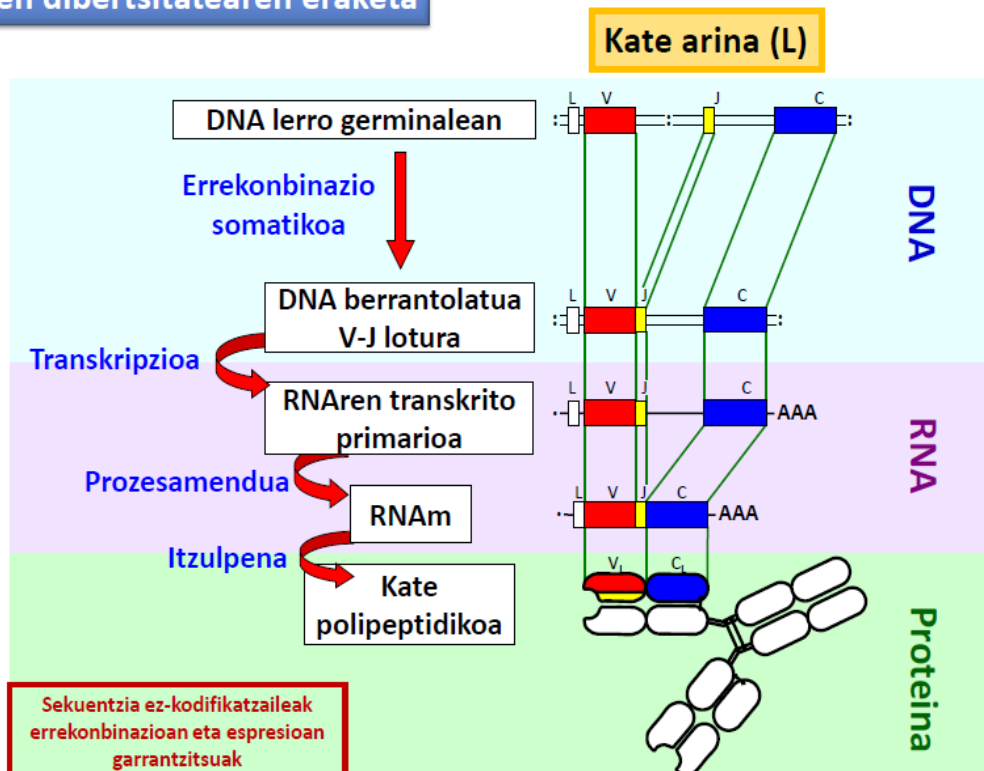


- **Kate arinean:** C gene kopuru desberdina:

- κ : 1 C (C_K) exon bakar batekin
- λ : 4 C (C_L) bakoitza exon bakar batekin

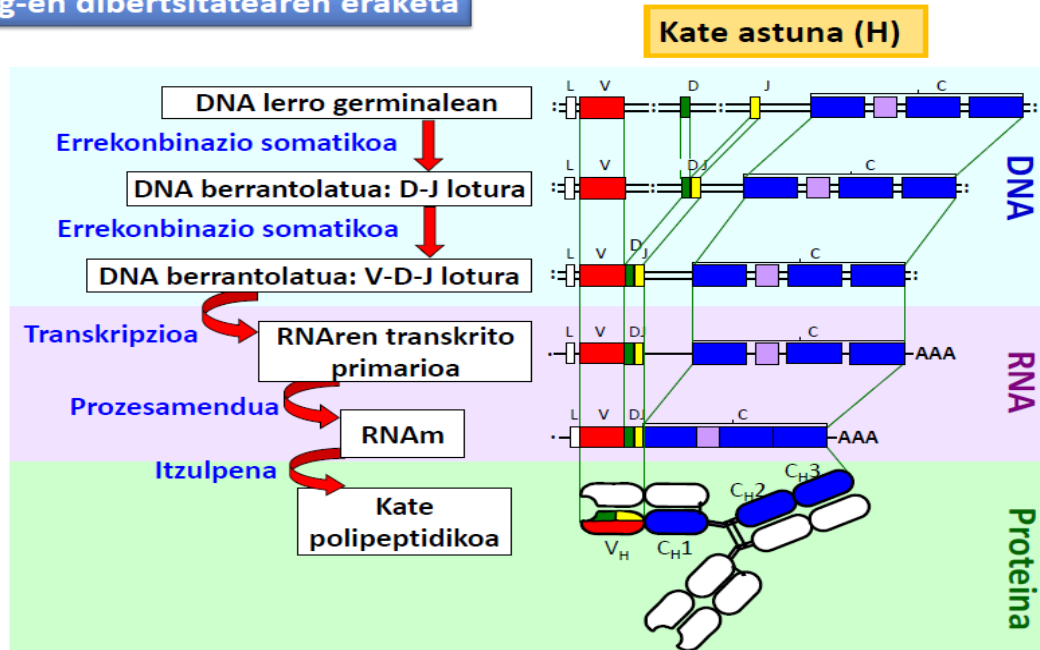


Ig-en dibertsitatearen eraketa



Hasieran DNA n V-J geneen arteko lotura ematen da. Ondoren mRNAren transkrito primarioan C genea lotu egiten zaie V-J-ri. Hauen itzulpenak kate arina (L) eratuko du.

Ig-en dibertsitatearen eraketa



Lehen urratsean, errekonbinazio somatikoa ematen da eta D-J lotura eratzen da. Ondoren bigarren errekonbinazioa gertatu ostean, V-D-J lotura sortzen da. C genea mRNAren transkrito primarioan lotzen da aurrekoei. Azkenik, itzulpenean kate astuna (H) eratzen da.

Giza-immunoglobulinen V aldeko gene-segmentuen kopurua

Segmentu	Kate astuna	Kate arinak	
	H	λ	κ
Aldakorra (V= variability)	100	30	35
Dibertsitatea (D= diversity)	23	0	0
Lotura (J= joining)	6	4	5
KONBINAZIO KOPURUA	13.800	120	175

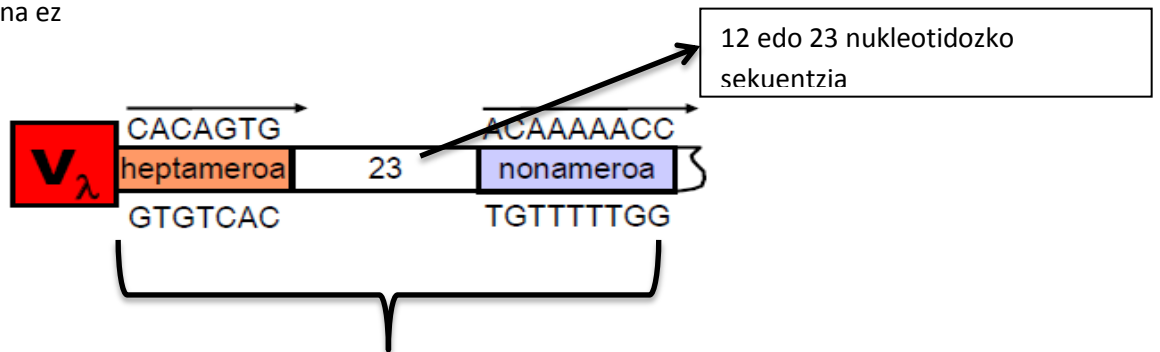
Konbinazio kopuru totala: 4.071.000 konbinazio. Hala ere, errekonbinazio somatikoa ez da nahikoa munduko Ag guztiak ezagutzeko.

1) Errekonbinazio Somatikoa

- Soilik kromosoma berdineko gene zatien artean

- Errekonbinazio-seinale sekuentziek (RSS: *Recombination Signal Sequence*) gidatzen dute prozesua:

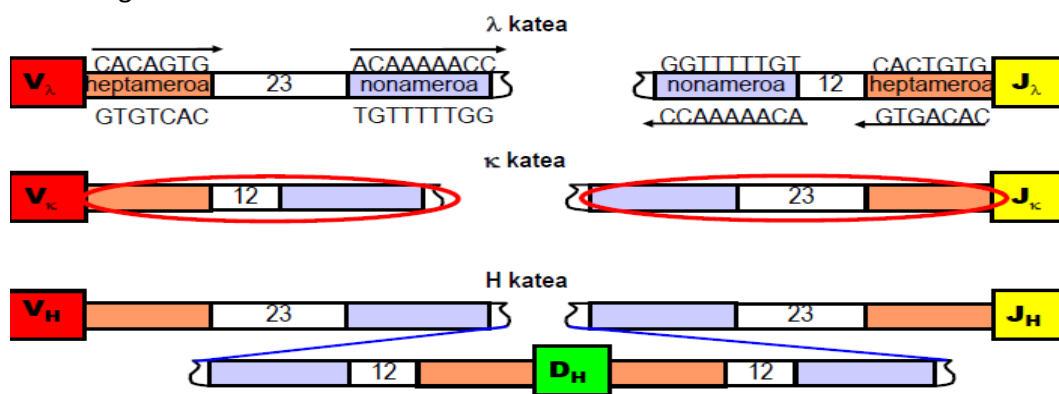
- RSS: errekonbinazio-guneen alboko sekuentziak
- DNA ez kodifikatzailea
- Egitura: **heptameroa** + 12/23 nukleotidozko sekuentzia + **nonameroa**
- Heptameroa eta nonameroa sekuentzia **kontserbatuak** dira
- Sekuentzia banatzailearen (12 edo 23 nukleotidoena) sekuentzia **aldatzen** da baina tamaina ez



RSS sekuentziak. Beti egitura bera.

- Non kokatzen dira RSS sekuentzia horiek?

- V segmentu bakoitzaren 3'an (beti ez)
- J segmentu bakoitzaren 5'an
- D segmentu bakoitzaren albo bietan.



Errekonbinazio Somatiko gertatzeko **12/23 ARAUA** bete behar da. Hau da, errekonbinazioa gertatu ahal izateko, 12 nukleotidodun sekuentzia bat 23ko beste batekin batu behar da. **EZINBESTEKO BALDINTZA.**

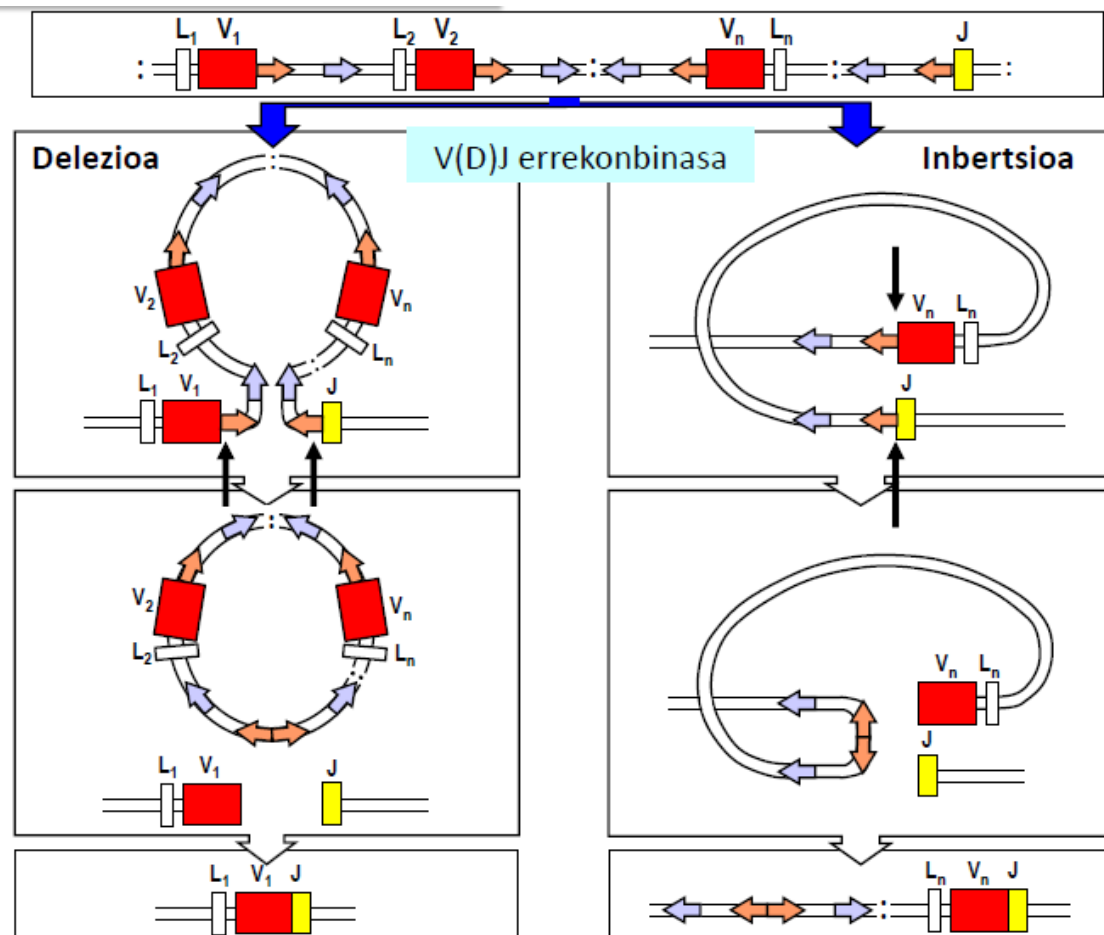
Errekonbinazio somatikoaren mekanismoak ondokoak dira:

- Delezioa
- Inbertsioa

Horretarako entzima berezi bat beharrezkoa da:

☐ **V(D)J errekonbinasa:** V(D)J errekonbinaziorako konplexu entzimatikoa

- Aktibitate endonukleasa: **RAG-1 eta RAG-2:** RSS sekuentziak ezagutzen dituzte.
- DNAren konponketa, modifikazioa eta tolestaketa: **IV ligasa, DNA-PK,...**



Delezioaren kasuan, bukle bat eratzen da eta V eta J segmentuen RSS sekuentziak alboan kokatzen dira norabide berean. Horrela delezioa gertatuko da. Prozesu honetan DNA sekuentzia bat galduko da, hori informazioa desagertu egingo da.

Inbertsioaren kasuan, J segmentuek RSS sekuentzia ezkerrean dutenean soilik gertatzen da. Hemen ez da informaziorik galtzen.

Normalean(J) →RSS sekuentzia eskuinean →Delezioa

Kasu batzuetan → RSS sekuentzia ezkerrean → Inbertsioa

2) Dibertsitatearen handiagotzea

1. Dibertsitate konbinatorioa: Konbinazioaren eraginez

1.1. B linfozito klon bakoitzak **V, D eta J segmentu genikoen konbinazio** bakarra adierazten du: **Baztertze alelikoa**.

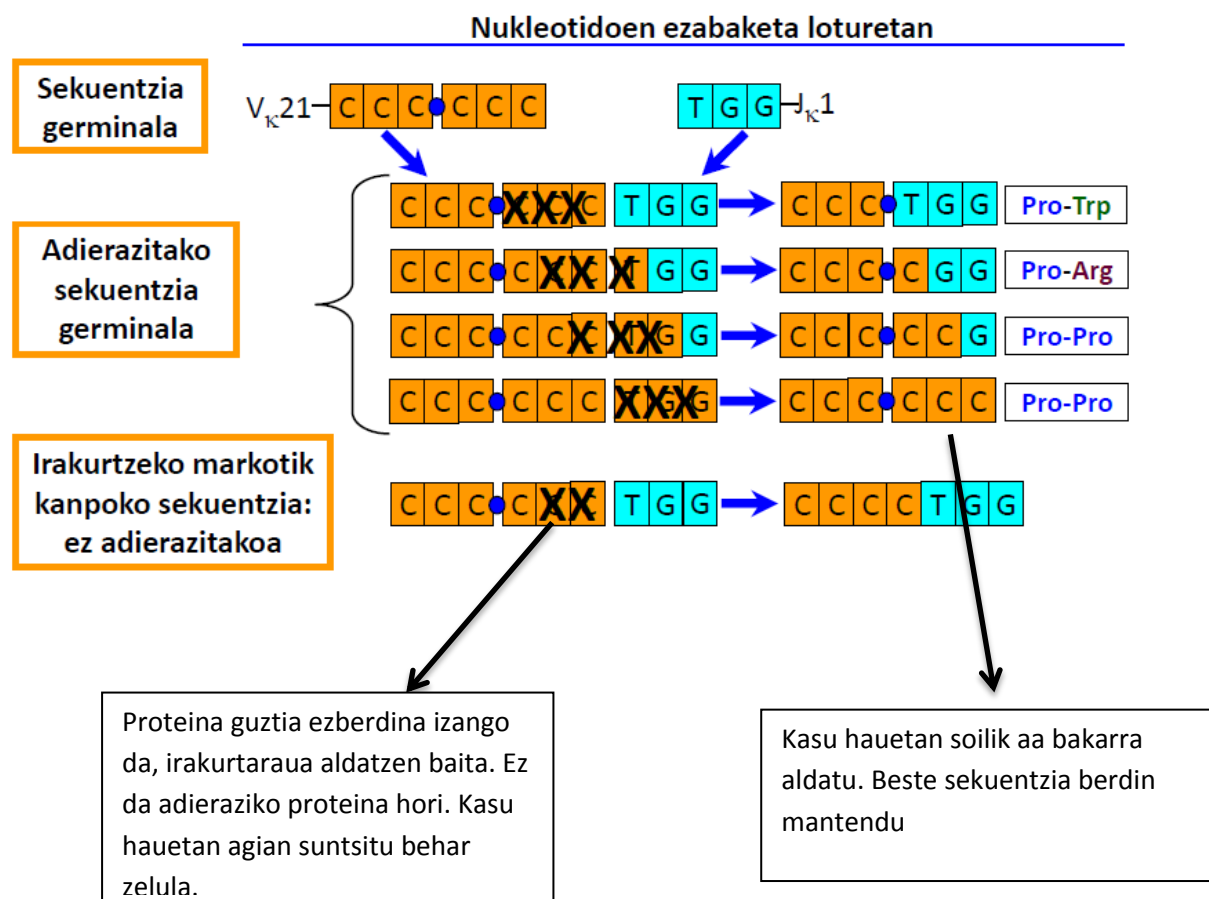
1.2. *Bi V eskualde desberdinak (L eta H kateenak).*

2. Loturaren dibertsitatea

Zati genikoen lotura gunetan **hautazko nukleotidoen eransketa**

2. Loturaren dibertsitatea

Exonukleasek lerro germinalako sekuentziaren nukleotidoak ezabatzen dituzte.



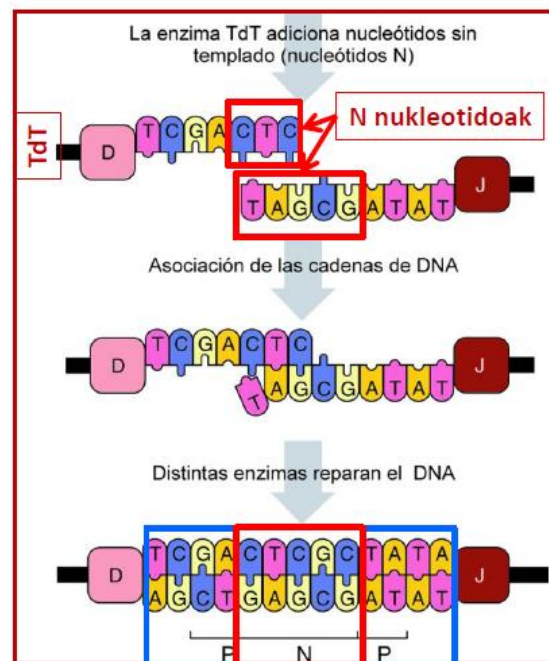
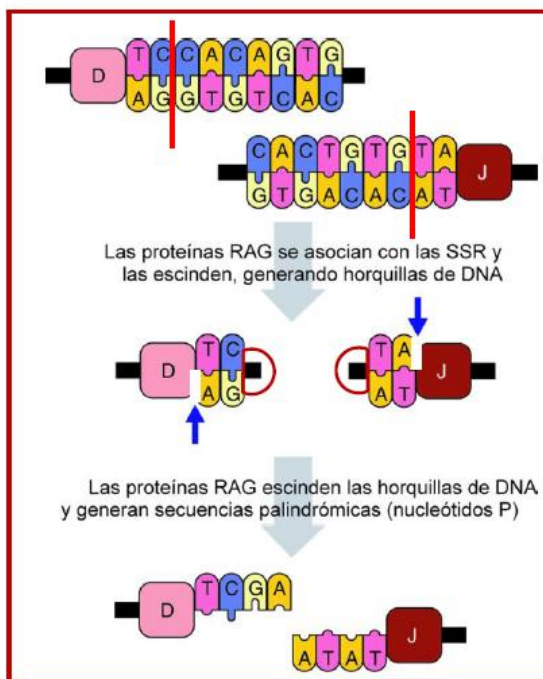
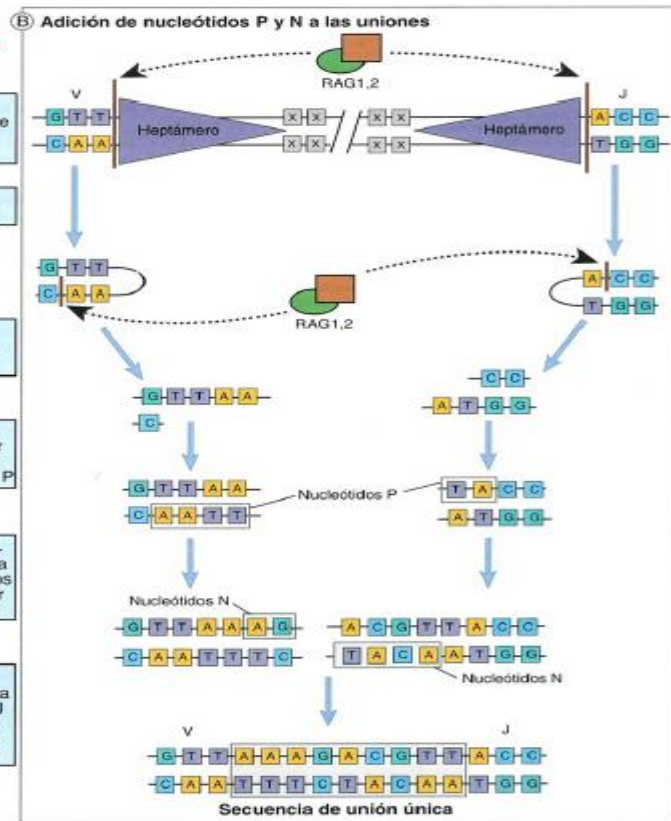
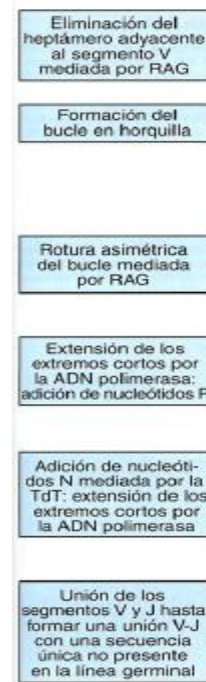
- Zati kodetzailearen apurketa asimetrikoak egin ondoren, falta diren nukleotidoak gehitzen dira : **P nukleotidoak**.

- Sekuentzia palindromikoak eratzen dira horrela

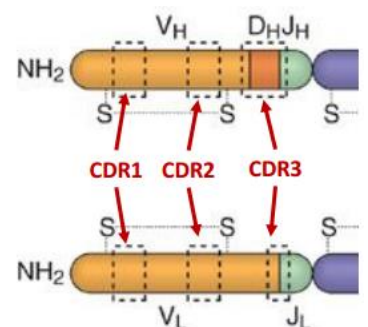
sitatea

- Lotura guneeetan lerro germinalean ez zeuden nukleotido sekuentzia berrien **gehitzea**: **N** nukleotidoak

- TdT (desoxirribonukleotidil transferasa terminala) entzimak bideratutakoa
- Bereziki VH-DH eta DH-JH loturetan
- Ez dakigu zergatik gehitzen diren nukleotidoak. Seguraski dibertsitatea areagotzeko.



CDR3 sekuentzia da aldakortasun gehien daukana nukleotidoen eransketa eta eliminazioaren ondorioz. Izan ere, L eta H kateetan V geneek CDR1 eta CDR2 kodifikatzen dituzte. CDR3-ri dagokionez, ordea, L katean V_L eta J_L arteko loturan kokatutako segmentu baten kodifikatzen du (lotura guen bat) eta H katean $V-D_H-J$ segmentuak (bi lotura guene). Mekanismo hauetan nukleotidoen eransketa eta eliminazioa ausazkoa denez, horrek irakurketa markoan aldaketak eragin ditzake eta, ondorioz, proteina ez funtzionala lortzen da gehienetan, apoptosira eramango duena.

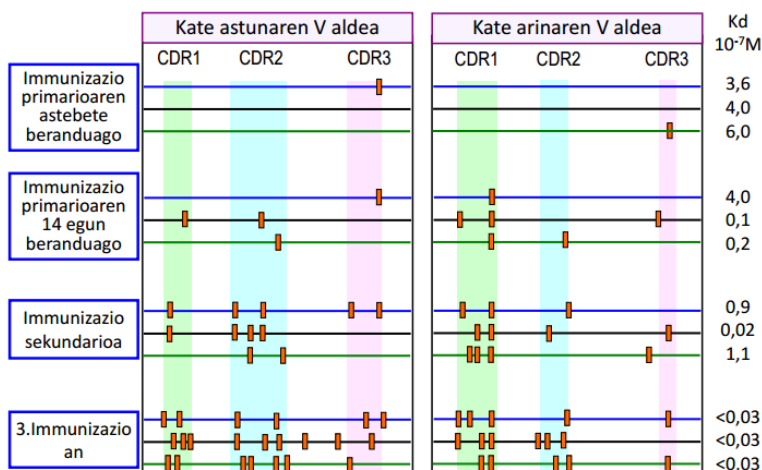


3. Hipermutazio somatikoak:

Antigenoarkein kontaktuan jarri ondoren Ig-en H eta L kateen V zatietan gertatzen diren mutazio puntualak dira (CD40L-CD40, Th linfzitoak). Mutazioen ondorioz, mitosien ostean V(D)J zati desberdinak izango dituzte jatorrizko zelularekin konparatuz. Mutazioak ausazkoak dira eta SLOetan ematen dira, ez hezur-muinean. Hipermutazio somatikoaren helburua afinitate altuagoko antigorputzak sortzea da, erantzun immune humorala aurrera doan heinean idiotopo gehiago sortzeko.

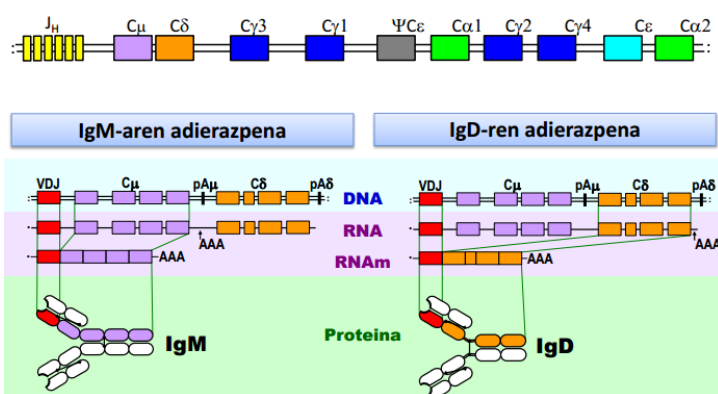
Mutazioak B zelulentzat kaltegarriak badira edo antigenoarekiko afinitatea gutxitzen badute, zelula apoptosian sartuko da. Bestale, mutazioen ondoren aukeratutako B linfzitoek antigenoarekiko afinitate handiago izango dute.

Mutazioak positiboak badira, afinitatea hobetzen joango da zelulak zatitzen joan ahala, hau da, zelula beretik eratorritakoak izango dira, baina ez zelula bera. Linfzitoaren eta antigenoaren arteko 1. kontaktuanen ondoren (astebete beranduago, adibidez) mutazio gutxi batzuk gertatuko dira. Denbora gehiago pasatakoan (14 egun) mutazioen kopurua handiagotu egingo da. 2. Kontaktuaren ondoren oraindik gehiago sortuko dira eta gauza bera gertatuko da 3. immunizazioan.



4. Isotipo-aldaketa:

Antigenoarkein kontaktuak egon ondoren, isotipo aldaketa eman daiteke. Mekanismo hau ez da dibertsitatea handitzeko. Gizakiaren kate astunaren C alde konstanteko geneen antolaketa dela eta, hasieran B linfzito guztiak IgMz eratutako BCR-ak hasten dira adierazten. Ondoren, heldu birjinetan, IgM eta IgD-ren koespresioa ematen da mintzean.



Isotipo aldaketa gertatzeko hainbat osagai behar dira:

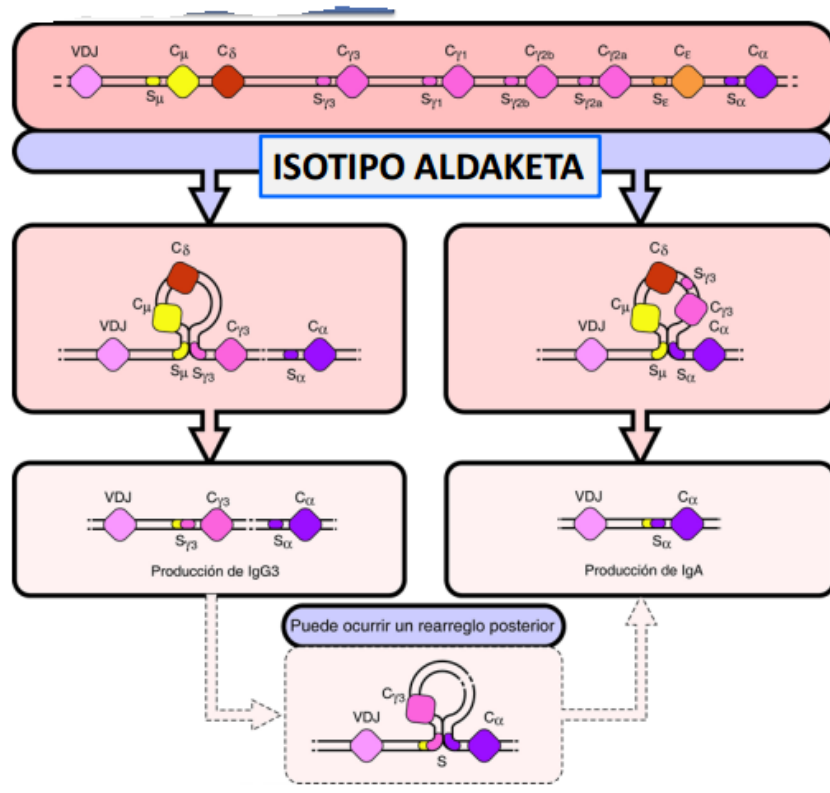
- Th linfozitoak, CD40-CD40L edo zitokinen bidez prozesua zuzentzen dutenak.
- Entzima desberdinak (AID: *activation induced desaminase*).
- Isotipo aldaketa zuzentzeko sekuentzia bereziak: S aldaketa seinaleak edo *switching signals*, C bakoitzaren aurretik doazenak (δ geneak dira salbuespen bakarra). S zatien artean errekonbinazioak gertatzen dira isotipo desberdinak lortzeko eta, horren ondorioz, DNA-ren zati bat galtzen da betirako.

Isotipo aldaketa eta VDJ errekonbinazio somatikoa mekanismo desberdinak dira:

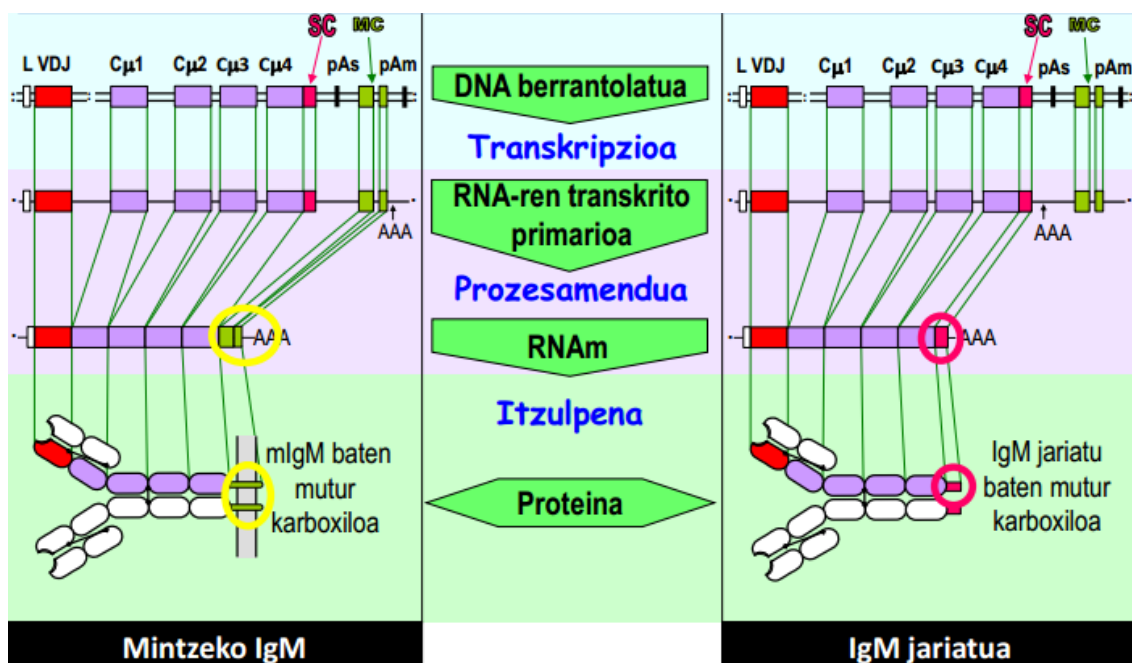
- Isotipo-aldaketa seinalea jasotzen duten B linfozito klon batzuetan soilik ematen da, errekonbinazio somatikoa B linfozito guztietan ematen den bitartean.
- VJD errekonbinazioa asko ez dira produktiboak, irakurketa markoa alda baitaiteke eta ondorioz, proteina afuntzionala lor daiteke. Isotipo-aldaketan, berriz, Ig-a eginda dago eta errekonbinazio guztiak onak, bideragarriak dira.
- VDJ errekonbinazioak zelulen heltze-prozesuan ematen dira, antigenoa agertu aurretik. Isotipo-aldaketa, ordea, antigenoaren estimuluaren ondoren gertatzen da, erantzun immunearen garapenean.
- VDJ birkonbinazioak ausaz gertatzen dira, isotipo-aldaketa gertatzeko kanpoko seinaleek bideratzen duten bitartean.

Isotipo aldaketa gertatzeko kanpoko seinaleak behar dira. Hasiera, linfozito helduen mintzean IgM eta IgD adieraziko dira eta ondoren, seinaleen arabera, isotipo desberdinak adieraziko dira. Horretarako S sekuentziak beharrezkoak dira. Hauek C bakoitzaren aurrean agertzen dira, δ -n izan ezik.

Hasiera batean, B linfozito helduen mintzean IgM eta IgD adieraziko dira. Izan ere, irudian ikus daitekeen bezala, VDJ sekuentzien ondoren dauden lehen geneak adieraziko dira, $C\mu$ eta $C\delta$ alegia (lehenengo dagoen S sekuentzia $S\mu$ da eta horren ondoren $C\mu$ eta $C\delta$ datoz, adieraziko direnak, azken honek ez baitu bere aurretik S sekuentziarik). Ondoren, Th-k zuzendutako kanpoko seinaleek behar den isotipoaren adierazpena eragingo dute. Horretarako beharrezkoak dira C geneen aurretik dauden S sekuentziak, horien arteko errekonbinazioen ondorioz adieraziko baitira isotipo ezberdinak. Errekonbinazio horien ondorioz errekonbinatu diren bi S zatien artean gelditzen zen DNA zatia galdu egingo da betirako. Beste errekonbinazio bat gerta daiteke, baldin eta sortu nahi den isotipoaren C genean ez badagaldi aurreko errekonbinazioan. Adibidez, ezkerreko bidetik lehenengo errekonbinazioaren ondoren IgG sortuko da. Ondoren gerta daiteke beste errekonbinazioa bat IgA emango duena. Eskuineko bidetik, aldiz, lehenengo errekonbinazioan IgA sortu da eta ezinezkoa da ondoren IgG sortzea, bere genea galdu baita aurreko errekonbinazioan.



B linfotitoa ororien zelula edo zelula plasmatikoa izango den erabaki behar da. Oroimenezkoak Ig-ak mintzean finkatuko dituzte eta plasmatikoeak jariatu. Mintzeko immunoglobulinak eta jariatuak kate astuneko sekuentzia beretik datoz, baina RNA prozesamendua desberdina da. C genearen hainbat exonen ondoren, SC edo MC sekuentziak jartzen dira, DNA-n biak daude baina prozesatu ondoren bakarra gelditzen da. Horrela, itzultzean, Ig-en karboxilo muturrak desberdinak izango dira. MC sekuentzia aukeratzen bada, Ig-a mintzean finkatuko da (BCR) eta linfotito hori oroimen zelula izango da. SC sekuentzia aukeratzen bada asierazteko, berriz, Ig-a jariatu egingo da eta zelula plasmatikoa izango da.



Beraz, B linfzitoen immunoglobulinaren erreperitorioaren dibertsitatea honako mekasimoen bidez lortzen da:

- Errekonbinazio somatikoa (DIBERTSITATE KONBINATORIOA I)
- Ig-en kate astun eta arinen konbinazioak (dibertsitate konbinatorioa II)
- Geneen arteko loturen dibertsitatea.
- Hipermutazio somatikoa

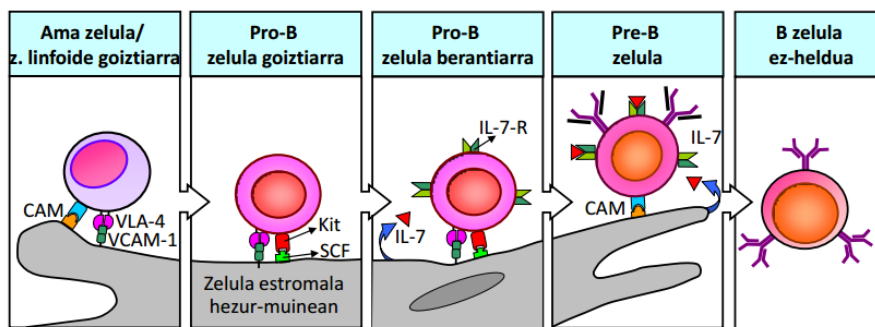
Isotipo aldaketak ez du dibertsitatea handitzen.

B linfzitoen heltze prozesua:

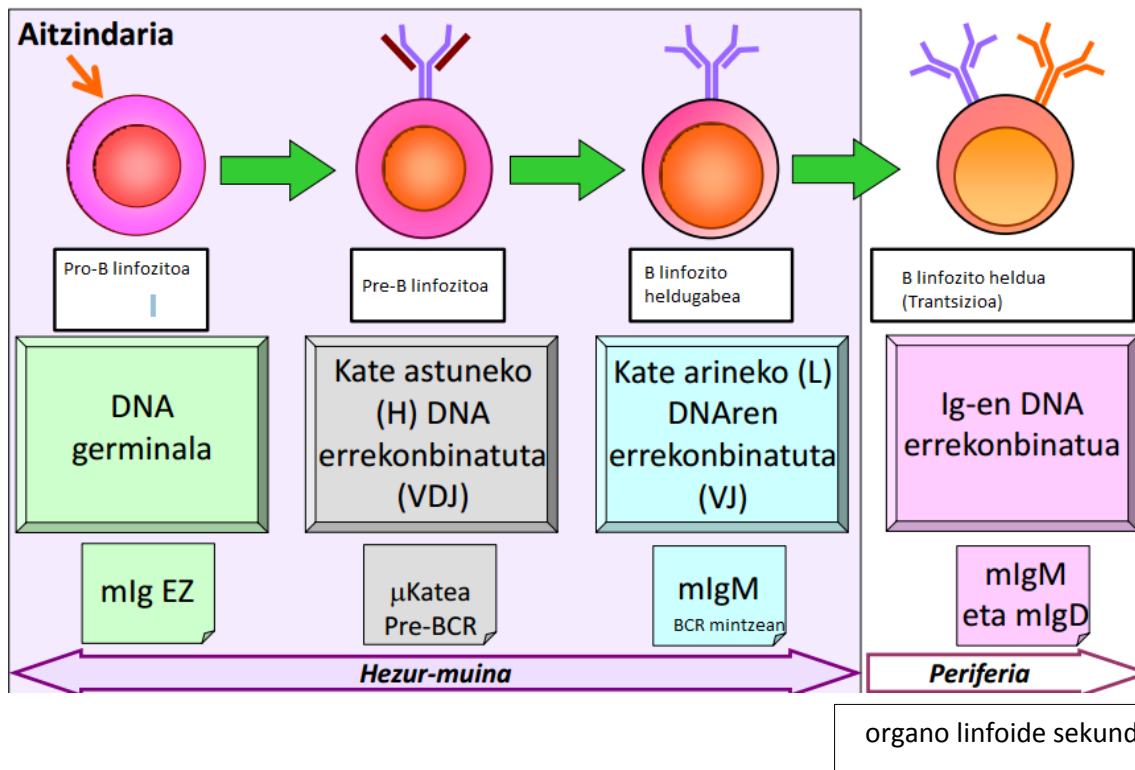
B eta T linfzitoak aitzindari linfoide beretik datoz. Bat edo bestea bereizteko mekanismoa ezaguna ez bada ere, badakigu transkripzio faktore ezberdinak aktibatzen direla. **Notch-1** hartzailea adierazten bada, aitzindari linfoidearen T leinurako desberdintzea eragingo du. Seinale horren falta edo inhibizioak, berriz, B leinurako desberdintzea faboratuko du.

LLinfzitoen heltze-prozesuaren pausu bakoitza modu egokian bete behar da jarraitzeko, pausuren batean akatsa badago apoptosia geratzen da. Hezur-muinean heltzen diren B linfzitoetatik %75 ez da inoiz zirkulaziora heltzen. Horren arrazoiak bi dira: batetik, errekonbinazio ez emankorra, hau da, ez dituzte proteinak sortzen; bestetik, errezeptore ez erabilgarri edo autoerreaktiboak (hautespen negatiboak) sortzen dituzte.

B linfzitoen heltze prozesuan estromako zelulak beharrezkoak dira, B linfzitoen hazkuntzarako euskarria osatzen baitute. Horretarako, proliferazioa estimulatzeko duten atxikidura molekulak, zitokinak eta hazkuntza faktoreak sintetizatzen dituzte: IL-7, SCF (*Stem Cell Factor*), SDF (*Stromal Derived Factor*). B linfzitoen heltze prozesua hezur-muineko zeluletan adierazten diren atxikidura-molekulek zuzentzen dute.



CAM: cell adhesion molecule
SCF: stem-cell factor



Pro-B fasea:

Pro-B linfzitoek ez dute Ig-rik ekoizten. CD19 eta CD10 molekulak adierazten dituzte. Ig-en H katea kodifikatzen duten geneen berrantolaketa gertatzen da bertan (errekonbinazio somatikoa). Hori bi pausutan gertatzen da:

- Lehenik D_H-J_H fragmentuen asoziazioa gertatzen da bi kromosometan.
- Ondoren, V_H fragmentu bat lotuko zaio D_H-J_H zatiari. Azken pausu hau kromosoma batean soilik gertatzen da, hau da, soilik genomako alelo bakar baten H katea adieraziko dela ziurtatzen da, baztertze alelikoaren bidez. Lehenik, kromosoma batean gertatuko da bigarren pausu hau; ondo ateratzen bada, horrela geldituko da eta beste kromosoman ez da gertatuko; konbinazioa ona ateratzen ez bada, berriz, 2. Kromosoman probatuko da. Bi kromosometan probatu ondoren konbinazio egokirik lortzen ez bada, zelularen apoptosia gertatuko da.

Pro-B	Pre-B	B inmaduro	B transicional		B maduro (B2)
			BTr1	BTr2	
CD10 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺	CD19 ⁺ CD20 ⁺	CD19 ⁺ CD20 ⁺	CD19 ⁺ CD20 ⁺	CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺	CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺
CD40 ⁺ CD45 ⁺ CMH II ⁺	CD40 ⁺ CD45 ⁺ CMH II ⁺	CD40 ⁺ CD45 ⁺ CMH II ⁺	CD40 ⁺ CD45 ⁺ CMH II	CD40 ⁺ CD45 ⁺ CMH II ⁺	CD40 ⁺ CD45 ⁺ CMH II ⁺
	Pre-BCR ⁺	IgM ^{neg}	IgM ^{alto} IgD ^{bajo}	IgM ^{alto} IgD ^{alto}	IgM ^{medio} IgD ^{alto}

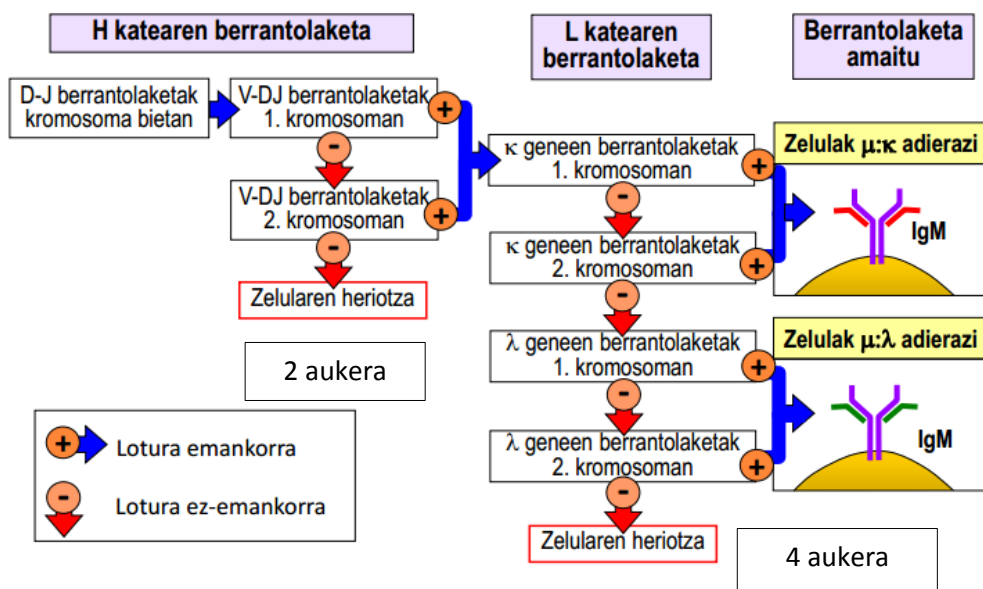
Pre-B fasea:

Aurreko fasean errekonbinatu den H kate astuna (μ) mintzean jar daiteke baina, L kate arinik ez dagoenez, ordezeko bat jartzen da. Horrela, Pre-BCR sortzen da. Horri esker biziraupenerako

seinaleen transdukzioa gerta daiteke. Hori **Btk** proteinek bideratzen dutela uste da. Btk proteinan emandako mutazioek X-ri lotutako gammaglobulinemia eragiten dutela ikusi da, hau da, pro-B fasean geratu diren linfoiztoen akumulazioa.

Bestale, fase honetan L kate arina eratuko duten geneen berrantolaketa gertatzen da (errekonbinazio somatikoa). Horrela, V_L eta J_L asoziatzen dira. Kate arinaren eraketan ere baztertze alelikoa gertatzen da: lehenengo L_κ kromosoma batean geratzen da errekonbinazioa eta, ona ateratzen ez bada, κ katearen (2. Kromosoman kokatzen da) 2. Kromosoman probatzen da. κ katearekin errekonbinazio onik lortzen ez bada, λ katearekin gauza bera egingo da.

Immunoglobulin geneen berrantolaketa zelula ugari galtzen dira. Kate astunaren geneak kromosoma bakarrean daudenez, 2 aukera bakarrik daude konbinazio egoki bat lortzeko. Kate arinaren kasuan, ordea, 2 kromosoma desberdinetan kokatzen dira geneak (κ katearen geneak 2. Kromosoman eta λ katearenak 22.ean). Ondorioz, 4 aukera ditugu konbinazio egokia lortzeko.

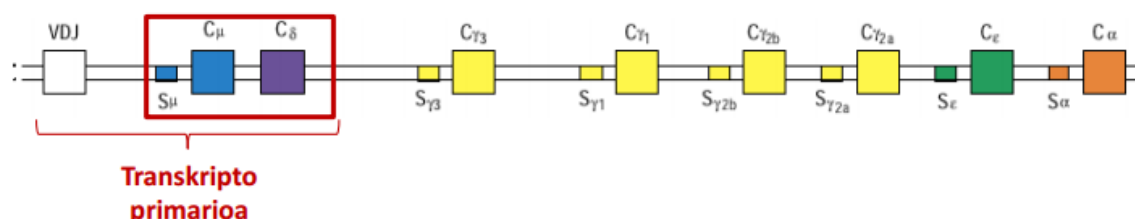


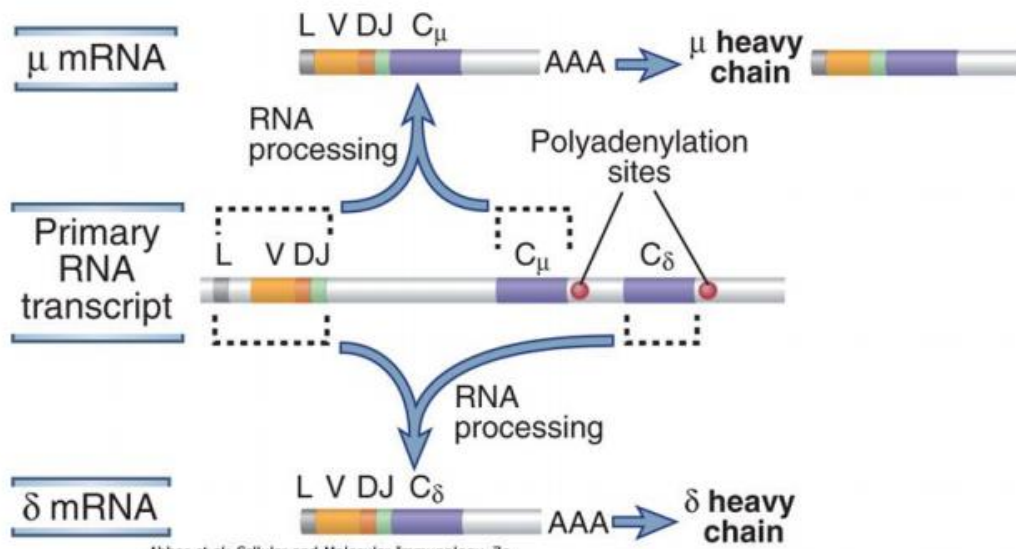
B heldugabea:

B linfzito heldugabea jada Immunoglobulina osoa errekonbinatuta dago. Aurreko fasean errekonbinatutako L kateen sintesia ematen da eta, aurretik eratutako H kateekin asoziatuz, BCR osoa jartzen da mintzean. Adieraziko den BCR hori, hasiera batean IgM izango da (IgD gutxi). Hemendik aurrera kontrol mekanismoak hartzailearen espezifitatearekin lotuta egongo dira eta molekula propioak ezagutzen dituzten linfzitoak kontrolatzeko mekanismoak egongo dira: B tolerantzia zentralaren indukzioa. Hau hezur-miunean gertatuko da.

B tolerantzia zentralaren indukzioa honela gertatuko da:

- Antigeno propioak ezagutzen ez dituzten B linfzito heldugabeek ez dute seinalerik jasoko hartzaileen bidez. Horrela, hezur-miunetik aterako dira euren heldu-prozesua jarraitzeko. RAG proteinen adierazpena jaitsiz berrantolaketa gelidutuko da.
- B linfzito heldugabeek antigeno propioak ezagutzen badituzte:





Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.
 Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.