

ЛЕКЦИЯ 5

В-ЛИМФОЦИТЫ – ОСНОВНЫЕ ЭФФЕКТОРЫ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Адаптивный В-клеточный иммунный ответ работает по принципу **клональной селекции**.

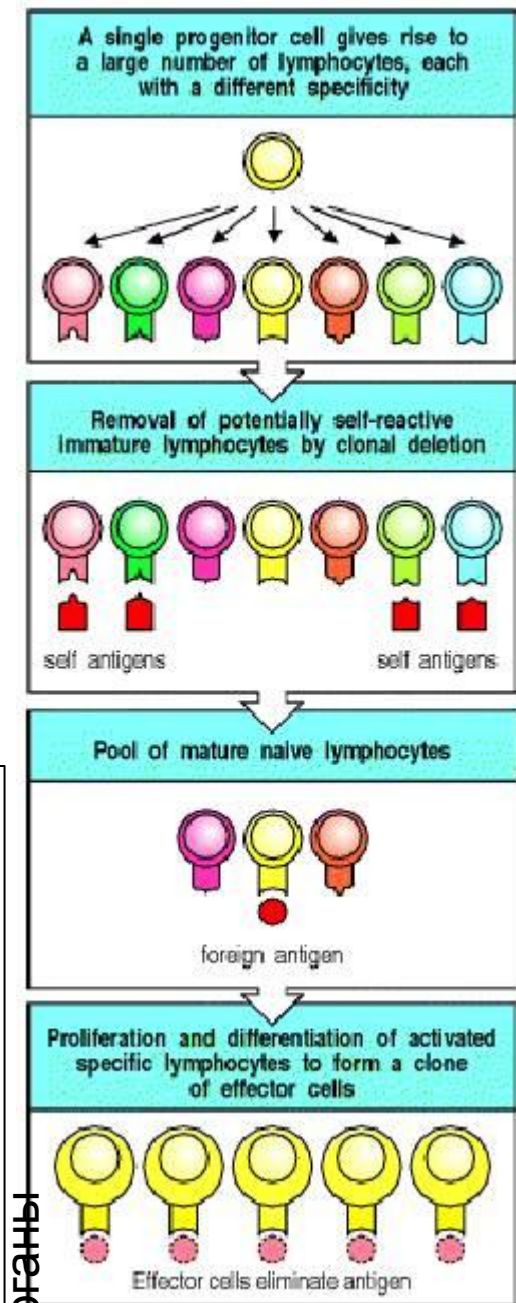
- Стволовая клетка дает начало огромному разнообразию предшественников В-лимфоцитов, отличающихся друг от друга V-областью своего BCR. Каждый вариант представлен небольшим количеством В-клеток.

- Клетки BCR которых сильно взаимодействует с собственными антигенами, элиминируются на ранних стадиях развития В-клетки в костном мозге. Процесс – **негативная селекция**.

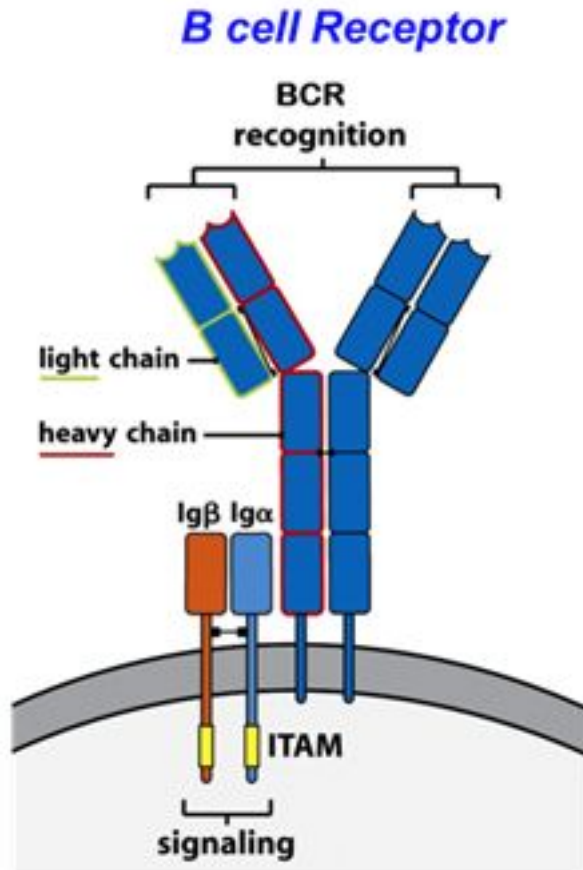
- «Наивные» зрелый В-лимфоцит, чей BCR опознал и провзаимодействовал с АГ во вторичных лимф. органах, получает сигнал к активации, размножению и дифференцировке в плазматические клетки и клетки памяти. **Позитивная селекция**. Образуется **клон** эффекторных АГ-специфичных В-клеток. Каждый клон специфичен и однороден в отношении отдельного

КОСТНЫЙ МОЗГ

Вторичные лимф. органы



Как устроен BCR?



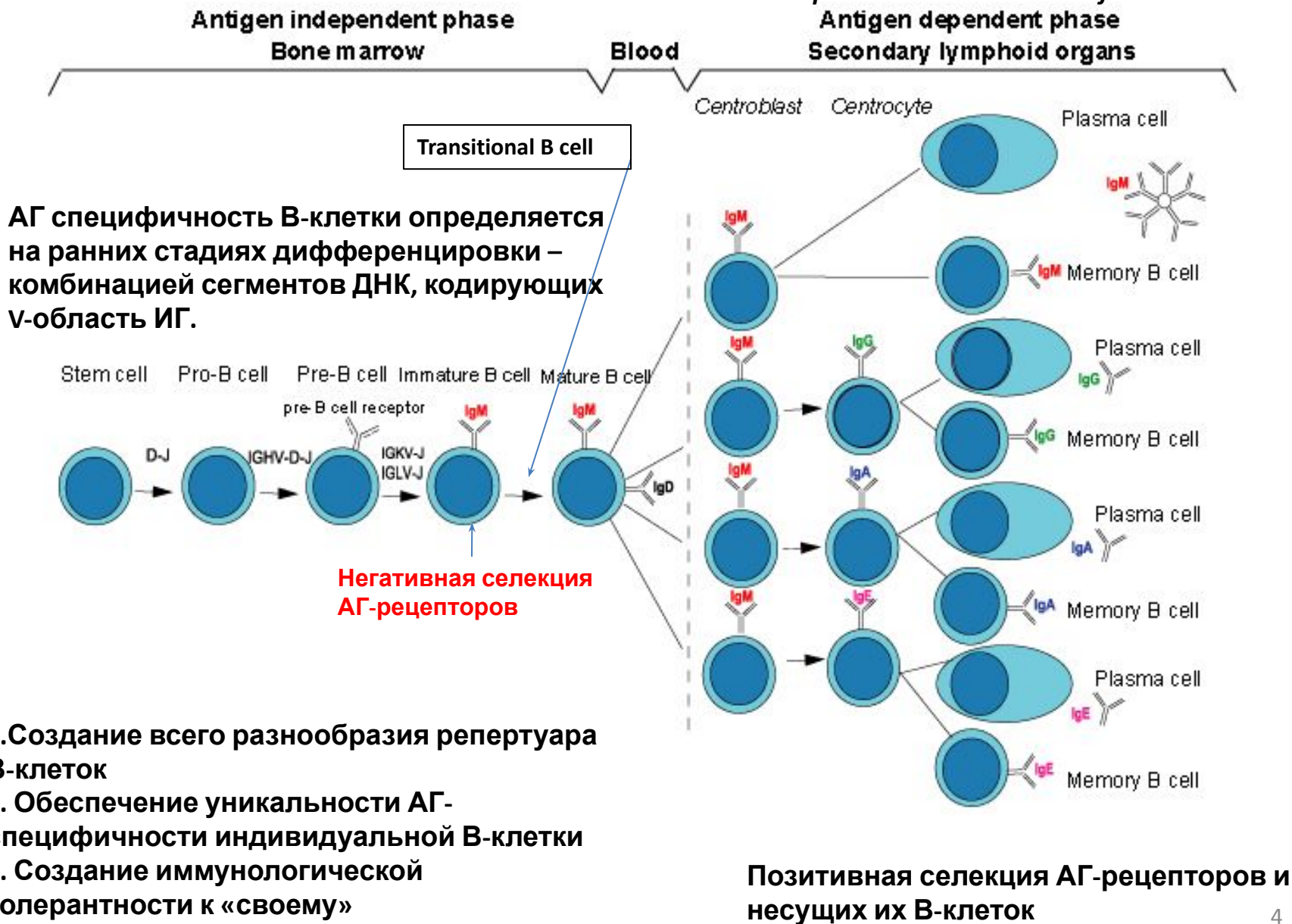
BCR – активирующий рецептор.

Igα и Igβ -инвариантные сигнальные субъединицы. Между собой связаны дисульфидной связью и образуют гетеродимер. Необходимы BCR для **сигналинга** и для эффективного **транспорта на поверхность клетки**. В цитоплазматическом хвосте – по одной ITAM последовательности.

ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif , канонический ITAM - $YxxL/Ix_{(6-8)}YxxL/$ (Y – тирозин, L – лейцин, I -изолейцин

Развитие и дифференцировка В-лимфоцитов

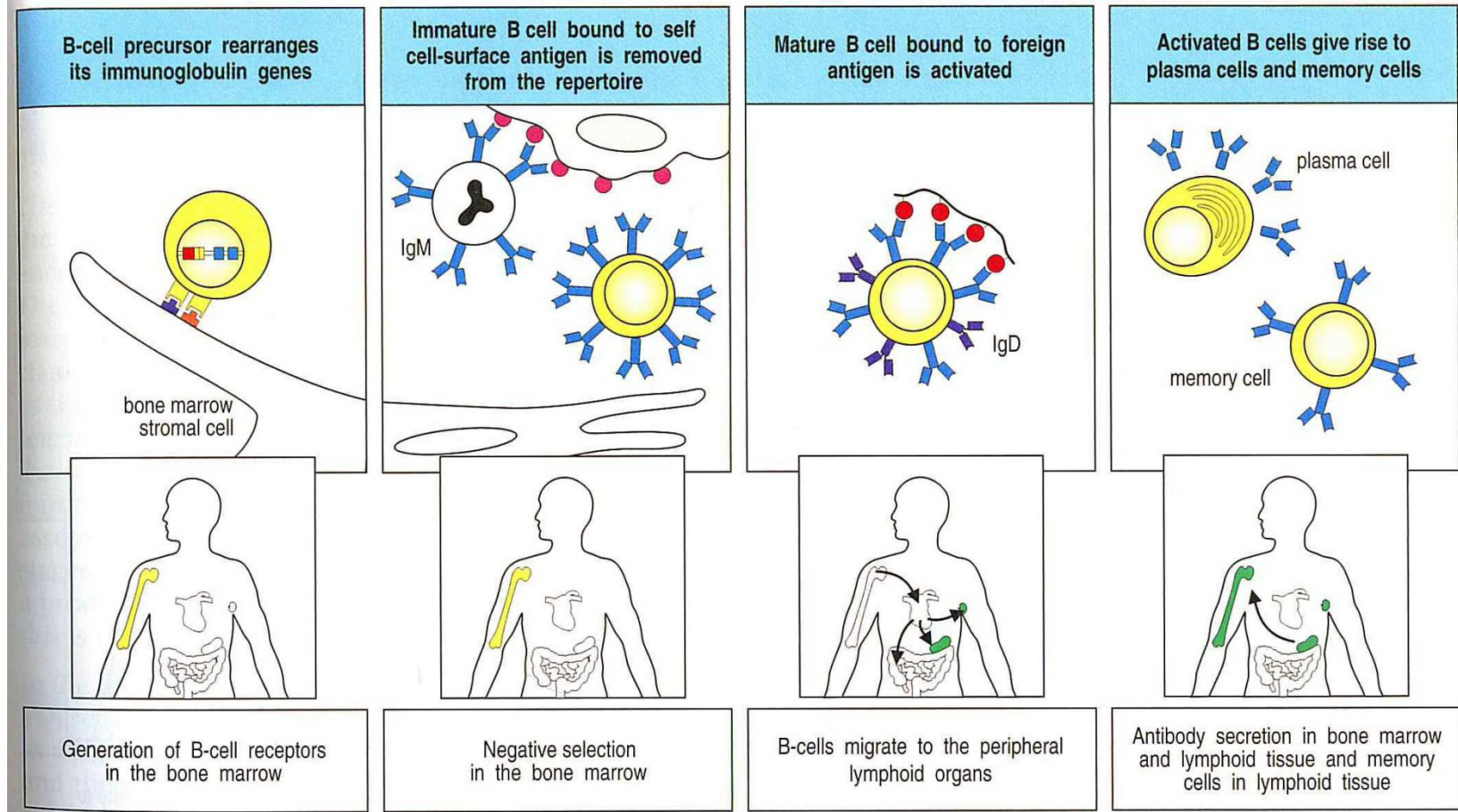
Elodie Foulquier and Marie-Paule Lefranc. 2001



АГ специфичность В-клетки определяется на ранних стадиях дифференцировки – комбинацией сегментов ДНК, кодирующих V-область ИГ.

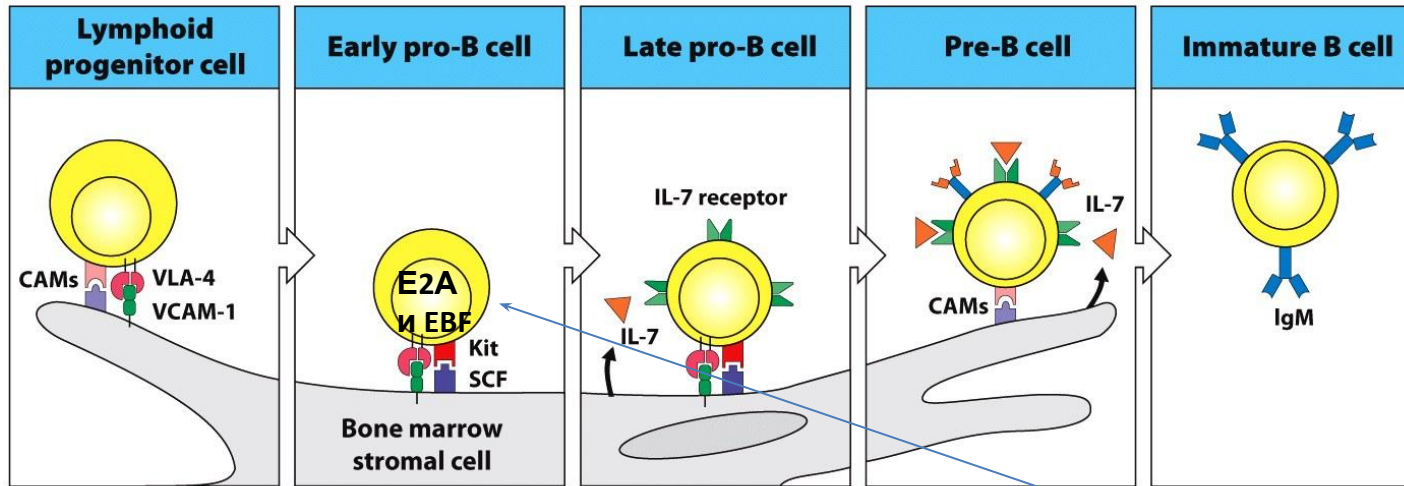
1. Создание всего разнообразия репертуара В-клеток
2. Обеспечение уникальности АГ-специфичности индивидуальной В-клетки
3. Создание иммунологической толерантности к «своему»

Первые стадии развития В-клетки проходят в **КОСТНОМ МОЗГЕ**, где осуществляется негативная селекция BCRs и В-клеток (участвуют клетки стромы костного мозга и собственные АГ). Зрелая В-клетка мигрирует в периферические лимфоидные органы, где после встречи с АГ активируется (позитивная селекция, участвуют чужеродные АГ) и дифференцируется в плазматические клетки и клетки памяти



Избыточность в производстве лимфоцитов.

При дифференцировке в костном мозге В-клеткам (от стадии предшественника до стадии незрелой/immature В-клетки) необходим тесный контакт с клетками стромы, а также ростовые факторы, секретируемые



Взаимодействие молекул адгезии на предшественнике и клетке стромы

Взаимодействие Kit и SCF (stem-cell factor) + IL-7

Начало экспрессии транскрипционных факторов, **первых специфичных для В-клеток** – E2A и EBV –early B-cell factor. Они – первые, определяющие «В-клеточность»

Начало экспрессии RAG1/RAG2 и Pax5.

V-D-J перестройка

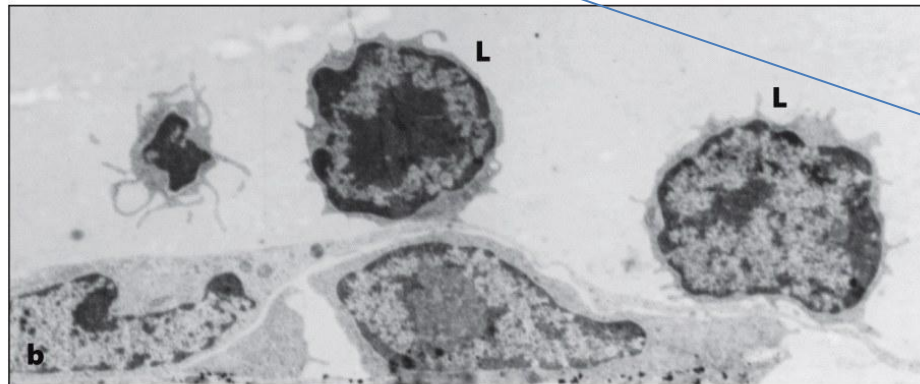
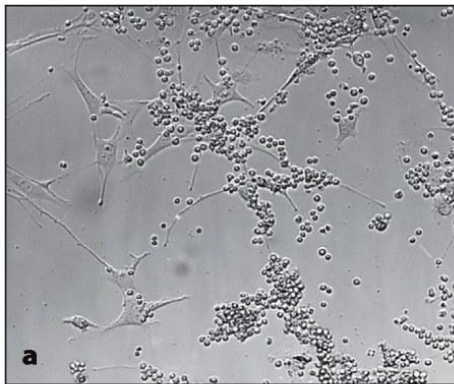


Figure 6.5 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

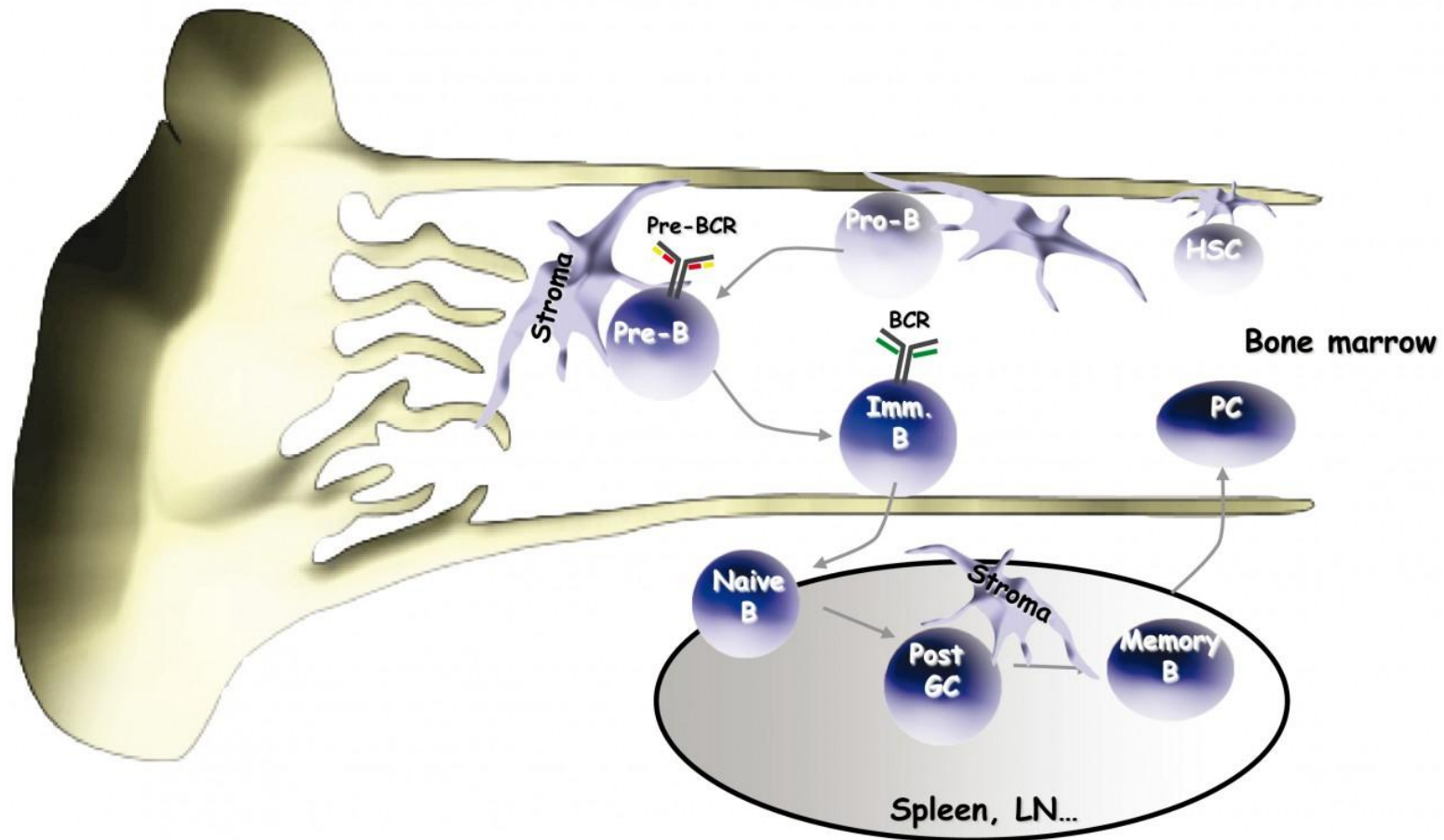
- VCAM1 - молекула адгезии
- VLA-4 - интегрин
- CAMs – молекулы адгезии
- Kit –receptor tyrosine kinase
- SCF-stem cell factor
- IL-7 – интерлейкин-7

Обеспечивают контакт В-клетки с клетками стромы

Для пролиферации про-В-клеток

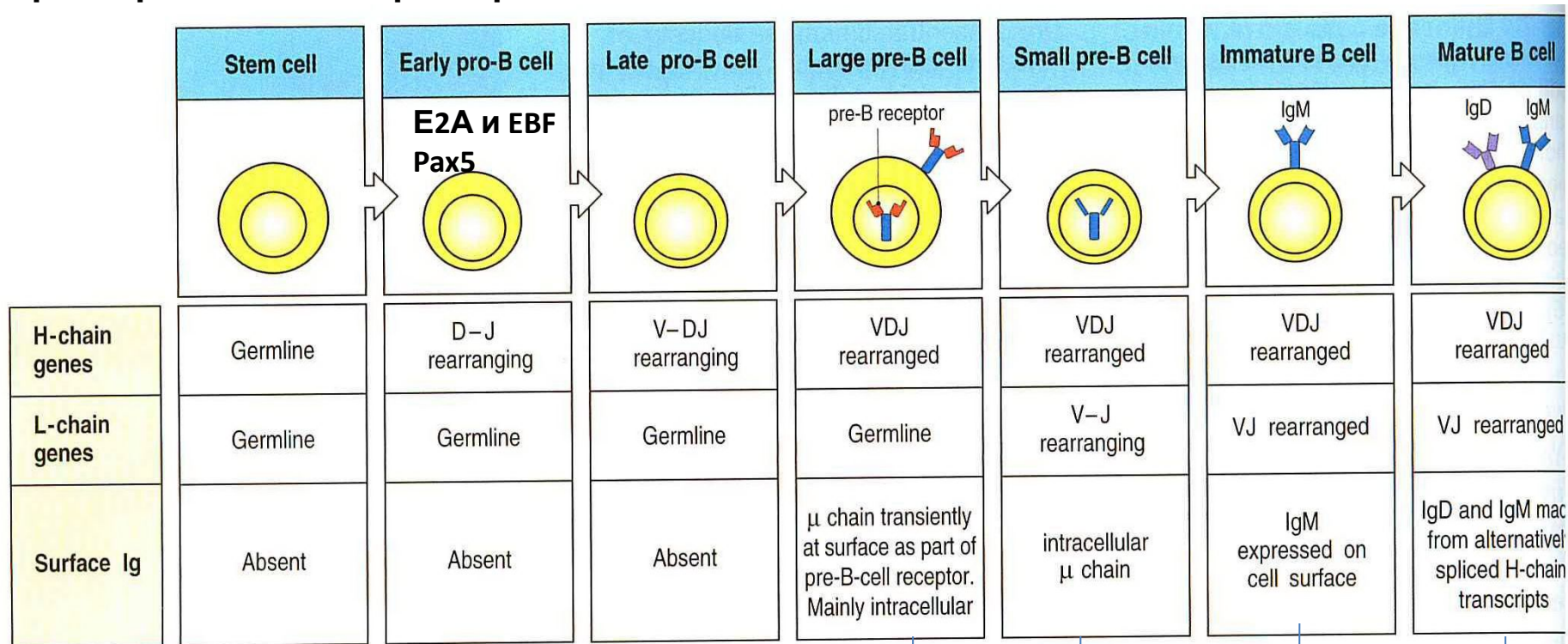
Обязателен для развития про-В-клеток

Развивающаяся В-клетка находится в контакте с клетками стромы и передвигается в костном мозге



Стадии дифференцировки В-лимфоцитов отличаются по экспрессии цепей иммуноглобулинов и поверхностных маркеров.

Развитие В-клетки в костном мозге начинается с перестройки локуса тяжелых цепей ИГ. Транскрипционные факторы E2A и EBF запускают экспрессию компонентов V(D)J рекомбиназы (RAG1&RAG2) и необходимого для развития В-клеток транскрипционного фактора Pax5



Маркеры стадий развития В-клетки

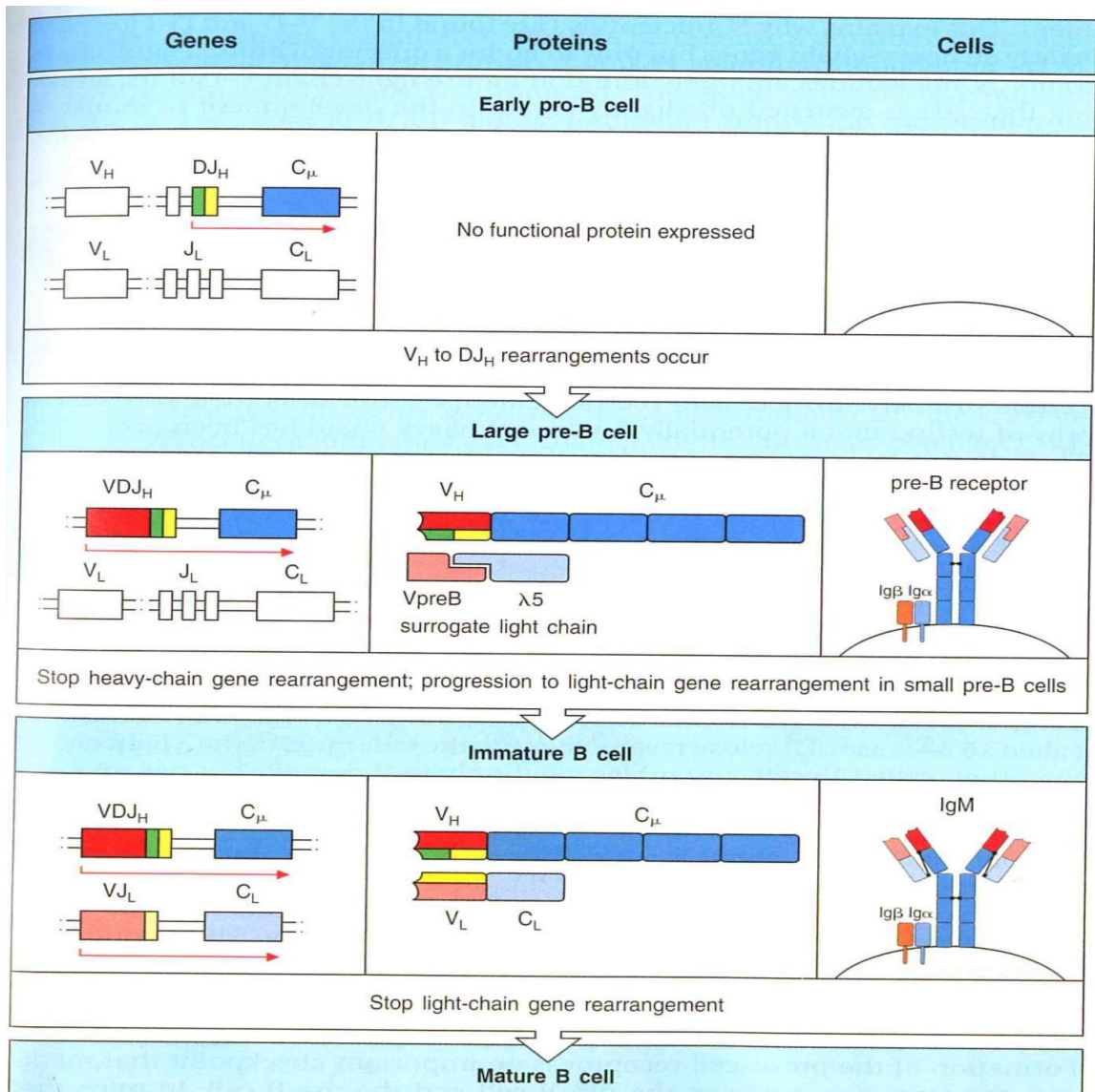


Внутриклеточные μ-цепи

Поверхностный IgM

Поверхностные IgM и IgD

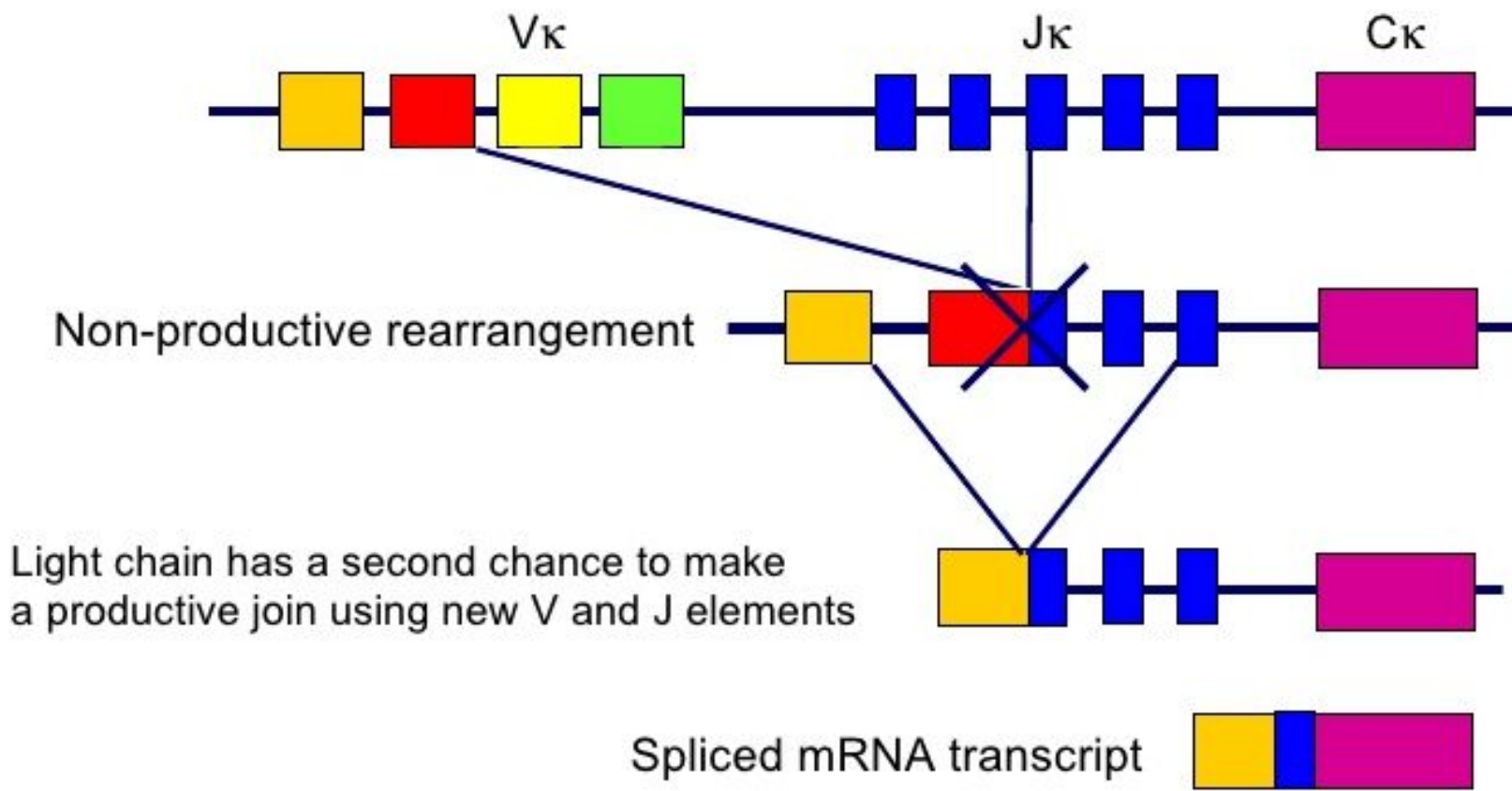
Как обеспечивается уникальность BCR на каждой В-клетке?



В про-В-клетке правильно перестроенный ИГ V_H-ген немедленно экспрессируется (транскрипция идет всегда) и тестируется в виде пре-BCR. Сигналинг через этот пре-BCR останавливает перестройку V_H на гомологичной хромосоме и запускает следующую стадию развития В-клетки – перестройку V-гена легкой цепи, для которой действует то же правило остановки перестройки на гомологичной хромосоме.

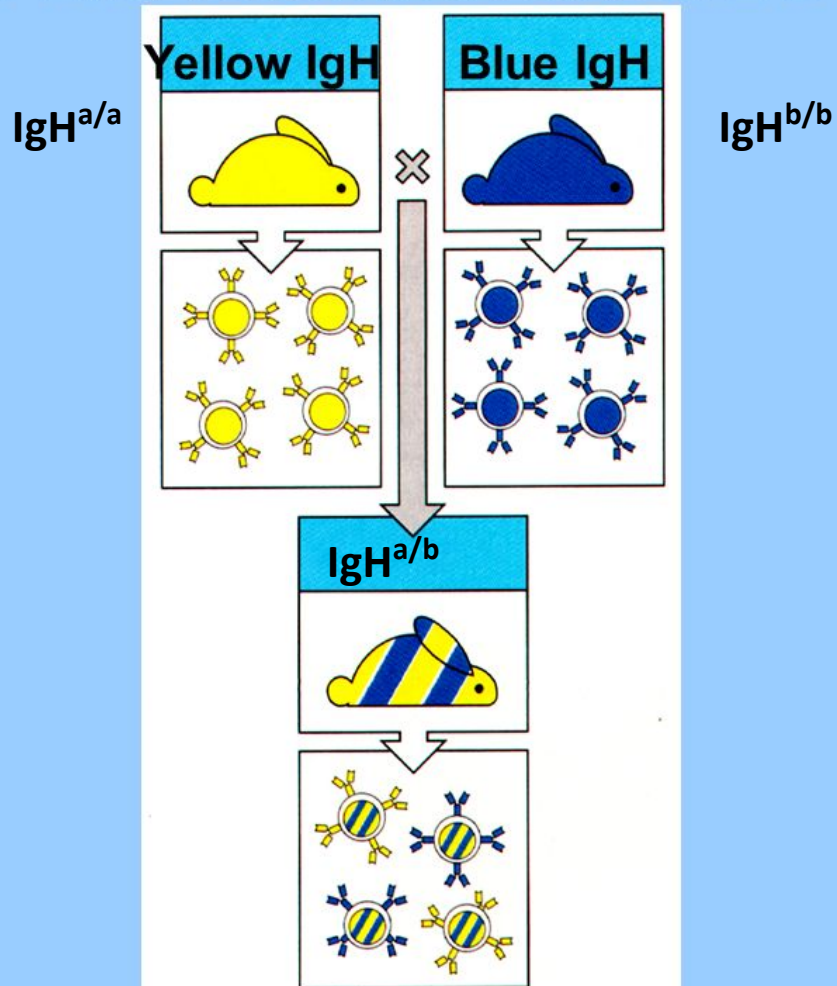
У легких цепей ИГ есть несколько попыток V-J перестройки!

Непродуктивная перестройка V-J генных сегментов легких цепей ИГ может приводить к повторным попыткам перестройки в этом же локусе.



Для генов иммуноглобулинов – **аллельное исключение** в В-клетках. В каждой В-клетке экспрессируется только **один** аллель для тяжелой и для легкой цепи.

ALLELIC EXCLUSION IN INDIVIDUAL B CELLS



Дифференцировка на первых стадиях развития контролируется перестройками генных сегментов BCR.

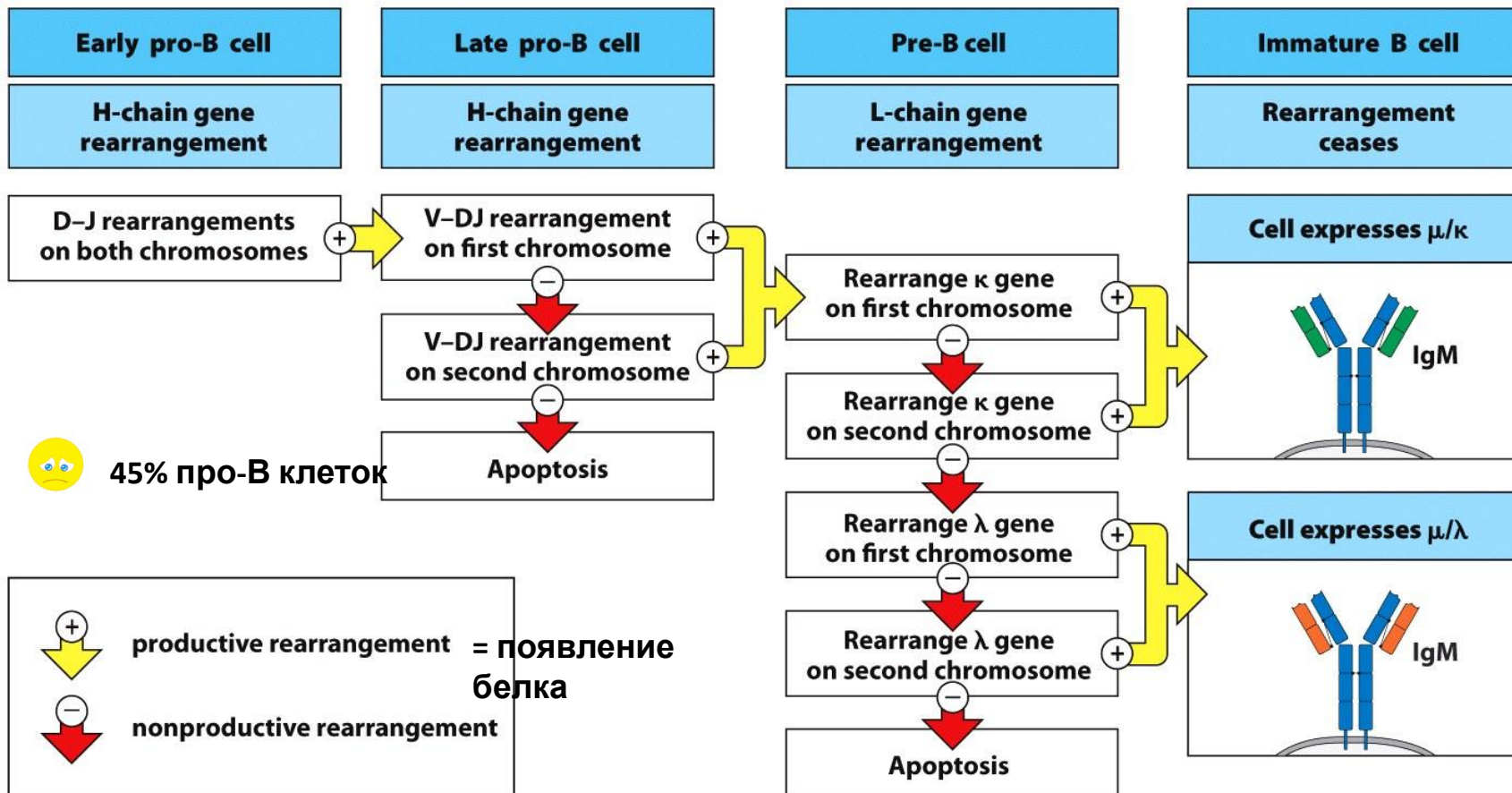
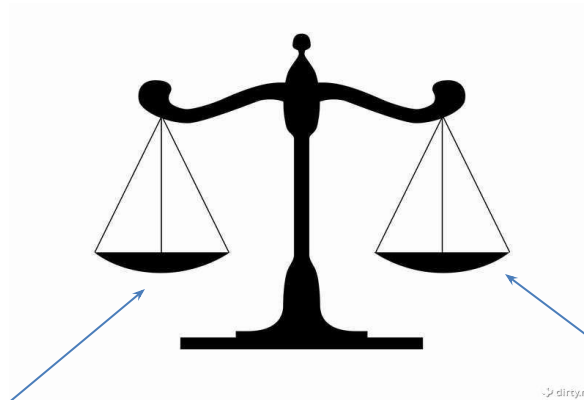


Figure 6.16 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Большая часть (по сравнению с про-В клетками) пре-В-клеток дает следующее поколение В-клеток

При VDJ или VJ перестройках – вероятность добавки/потери нуклеотида и нарушения рамки считывания. Продуктивная перестройка, останавливающая перестройку на второй хромосоме, обеспечивает клональность BCR. Аллельное и изотипическое (в каждой клетке – только λ или только κ) исключение.

Дилемма для В-клеток



Огромное **Разнообразие**
BCRs - потенциально против
всех возможных патогенов

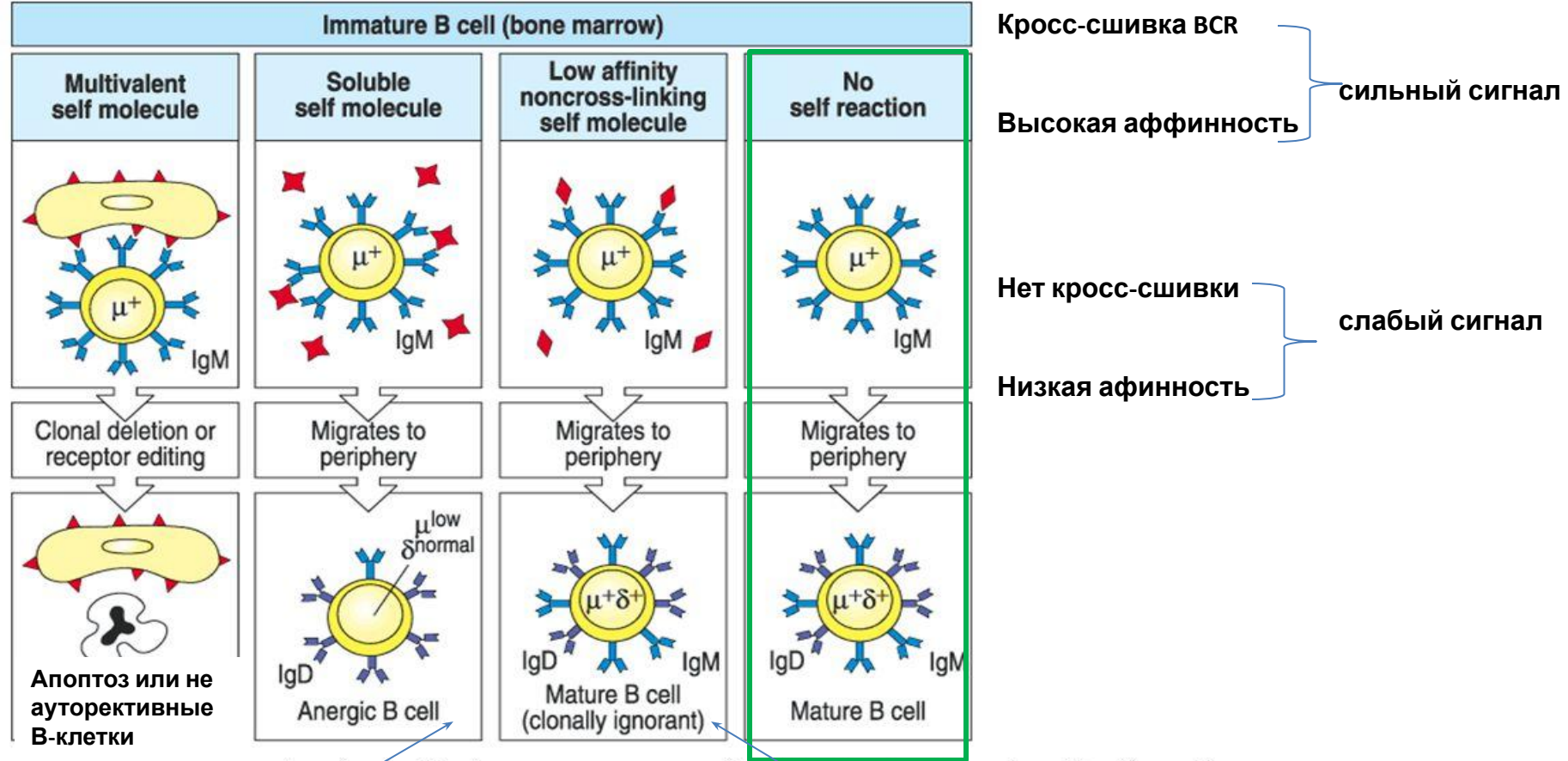
Отсутствие
реактивности BCRs с
собственными
антигенами или
Толерантность к
собственным АГ

Незрелые В-клетки **первый раз** проверяются на аутореактивность в костном мозге.

Центральная толерантность.

КАК?

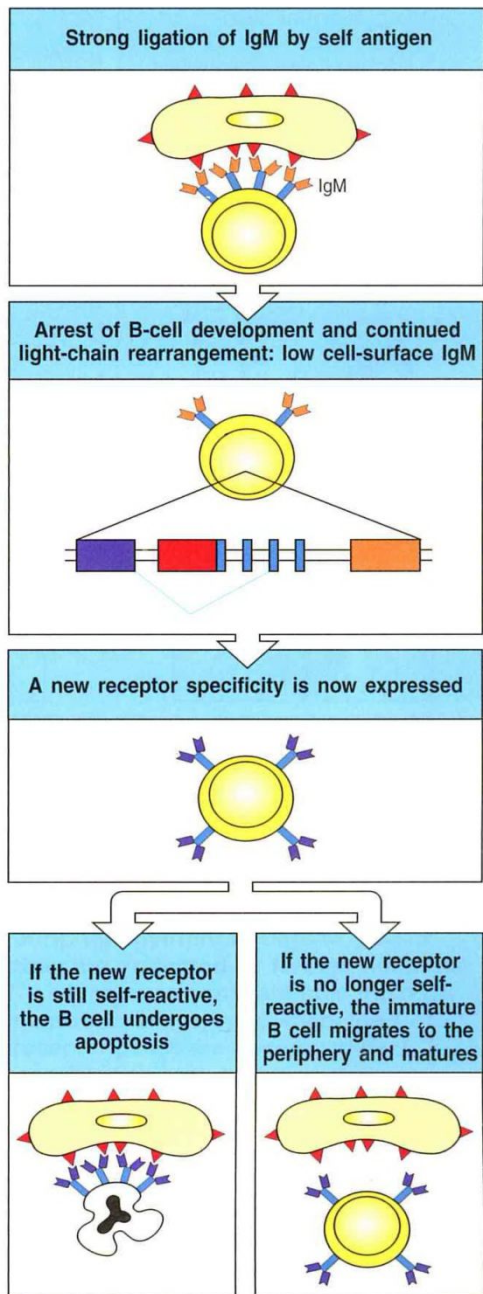
-По взаимодействию **BCR** со своими антигенами. Негативная селекция – self or



Binding to self molecules in the bone marrow can lead to the death or inactivation of immature B cells.

- мало IgM на мембране
- не активируются АГ и Т-клетками

Практически нормальные В-клетки могут быть активированы в особых условиях (воспаление, например), основа аутореактивности



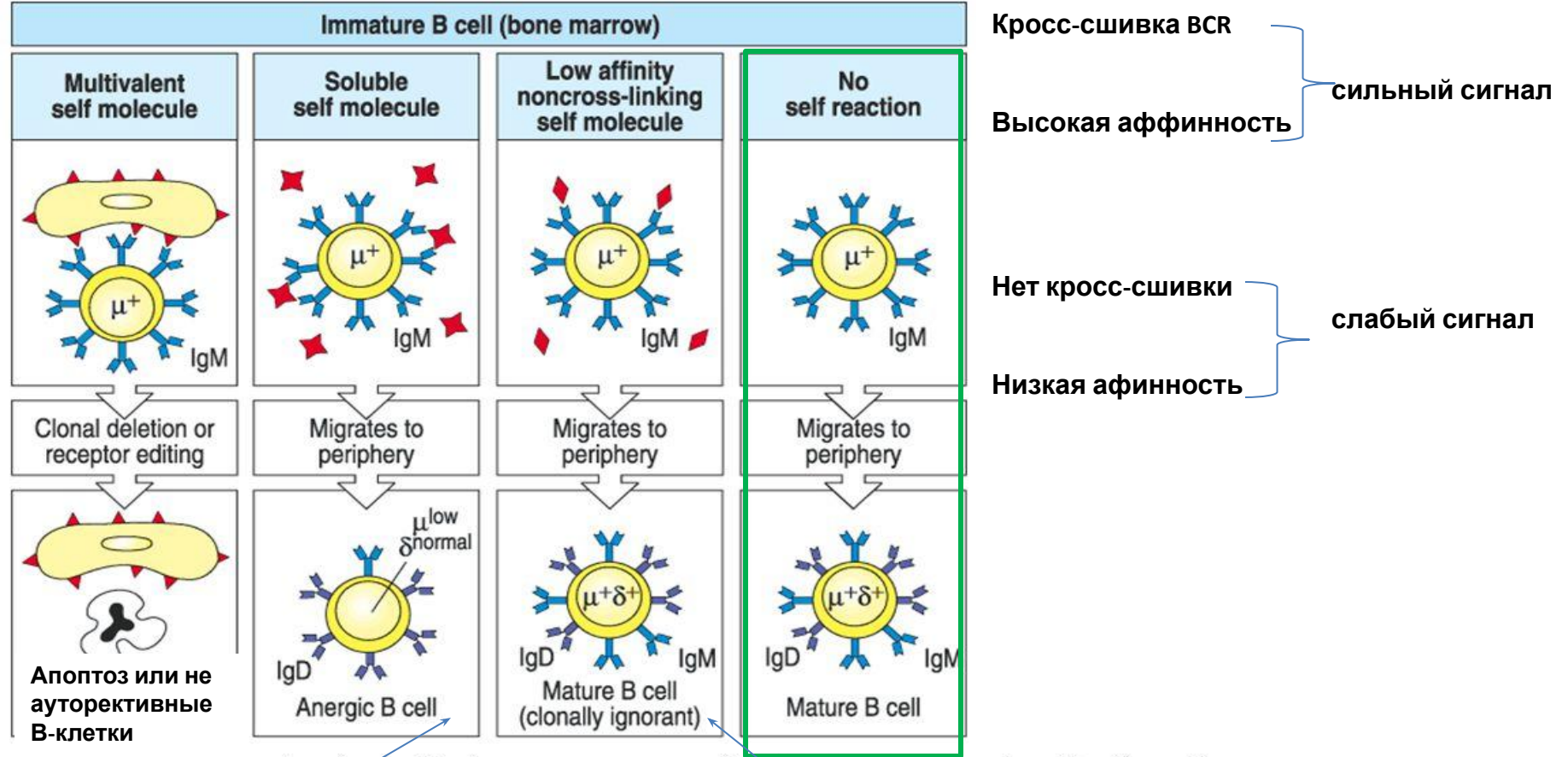
Редактирование BCR (**Receptor editing**) с помощью замены легкой цепи и, соответственно, их антигенной специфичности «спасает» некоторые В-клетки.

Незрелые В-клетки **первый раз** проверяются на аутореактивность в костном мозге.

Центральная толерантность.

КАК?

-По взаимодействию **BCR** со своими антигенами. Негативная селекция – self or



Binding to self molecules in the bone marrow can lead to the death or inactivation of immature B cells.

- мало IgM на мембране
- не активируются АГ и Т-клетками

Практически нормальные В-клетки могут быть активированы в особых условиях (воспаление, например), основа аутореактивности

Центральная толерантность – не идеальна, позволяет редким аутореактивным В-клеткам созреть.

Зачем?

- Для поддержания баланса между огромным разнообразием BCRs и отсутствием сильной реактивности к собственным АГ



Огромное **Разнообразие**
BCRs - потенциально против
всех возможных патогенов

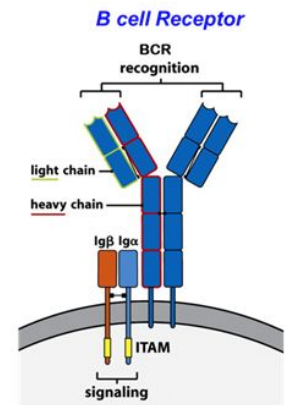
Отсутствие
реактивности BCRs с
собственными
антигенами или
Толерантность к
собственным АГ

Аутоиммунные заболевания

Зрелая наивная В-клетка рециркулирует между кровью, лимфой и вторичными лимфоидными органами, пока не встретится с **АГ**, к которому направлен ее BCR



BCR – В-клеточный рецептор



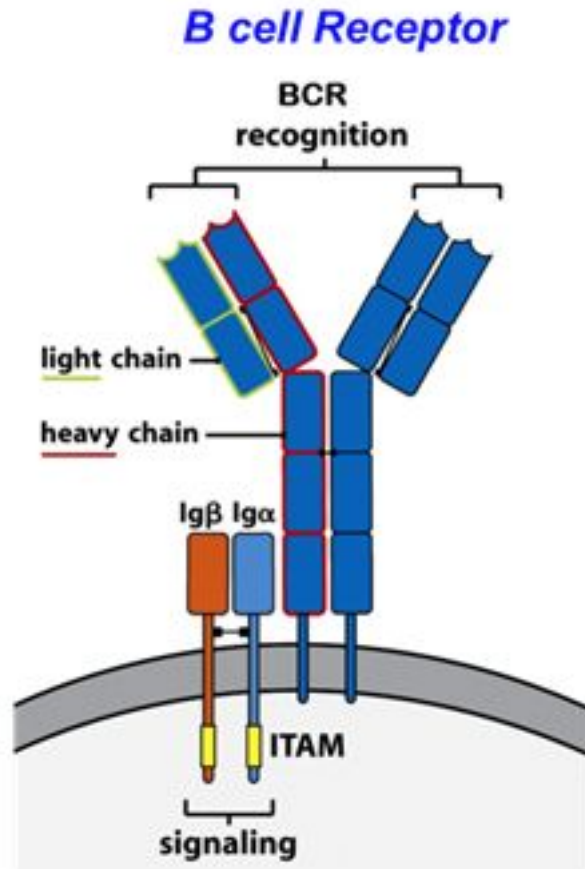
Для чего нужен BCR?

- Для взаимодействия В-клетки с окружающей внеклеточной средой. Рецептор – снаружи клетки, может воспринять внеклеточный сигнал (лиганд). Задача – передать его внутрь клетки, т.е. превратить его во внутриклеточное молекулярное событие. Процесс – signal transduction. Начинается – на поверхности, заканчивается – в ядре.

Как работает BCR?

- Связывание BCR со своим лигандом (АГ) генерирует цепь внутриклеточных сигналов – запускает signaling pathway, что приводит к изменению транскрипции определенных генов и к изменению морфологии и поведения В-клетки (меняется цитоскелет, секреторный аппарат и т.д.).

Как устроен BCR?



BCR – активирующий рецептор:

sIgM +

Igα и Igβ -инвариантные сигнальные субъединицы. Между собой связаны дисульфидной связью и образуют гетеродимер. С sIgM связаны гидрофильными связями между трансмембранными участками. Необходимы BCR для сигналинга и для эффективного транспорта на поверхность клетки. В цитоплазматическом хвосте – по одной ITAM последовательности.

ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif , канонический ITAM - $YxxL/Ix_{(6-8)}YxxL/I$ (Y – тирозин, L – лейцин, I –изолейцин).

Связывание рецептора с лигандом (кросс-сшивка BCR с АГ приводит к кластеризации рецептора на мембране лимфоцита

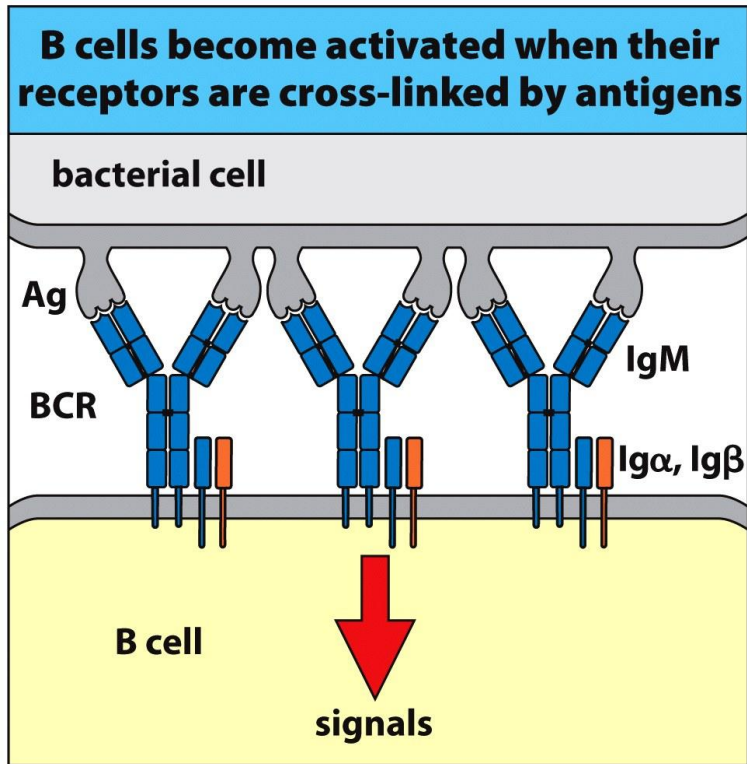
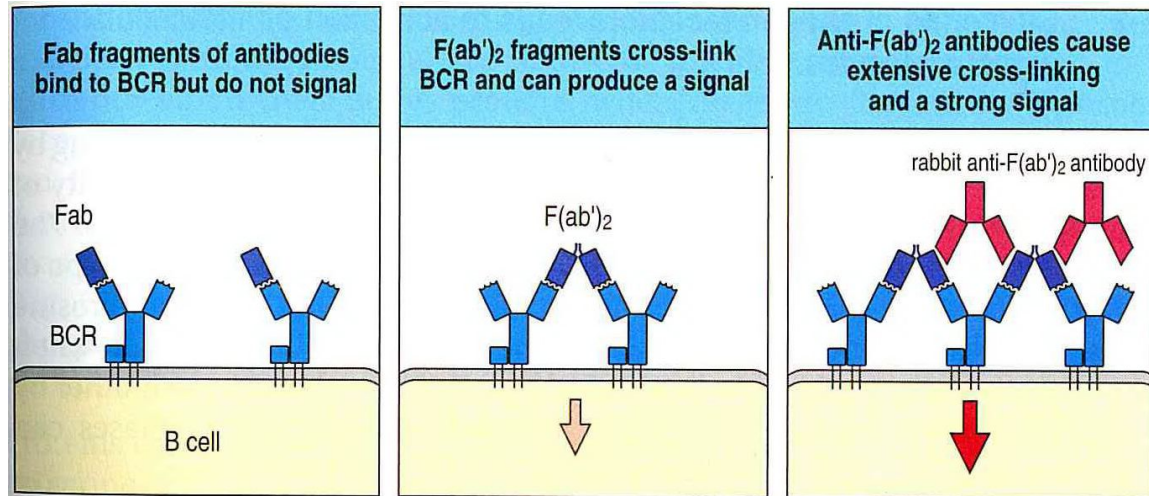


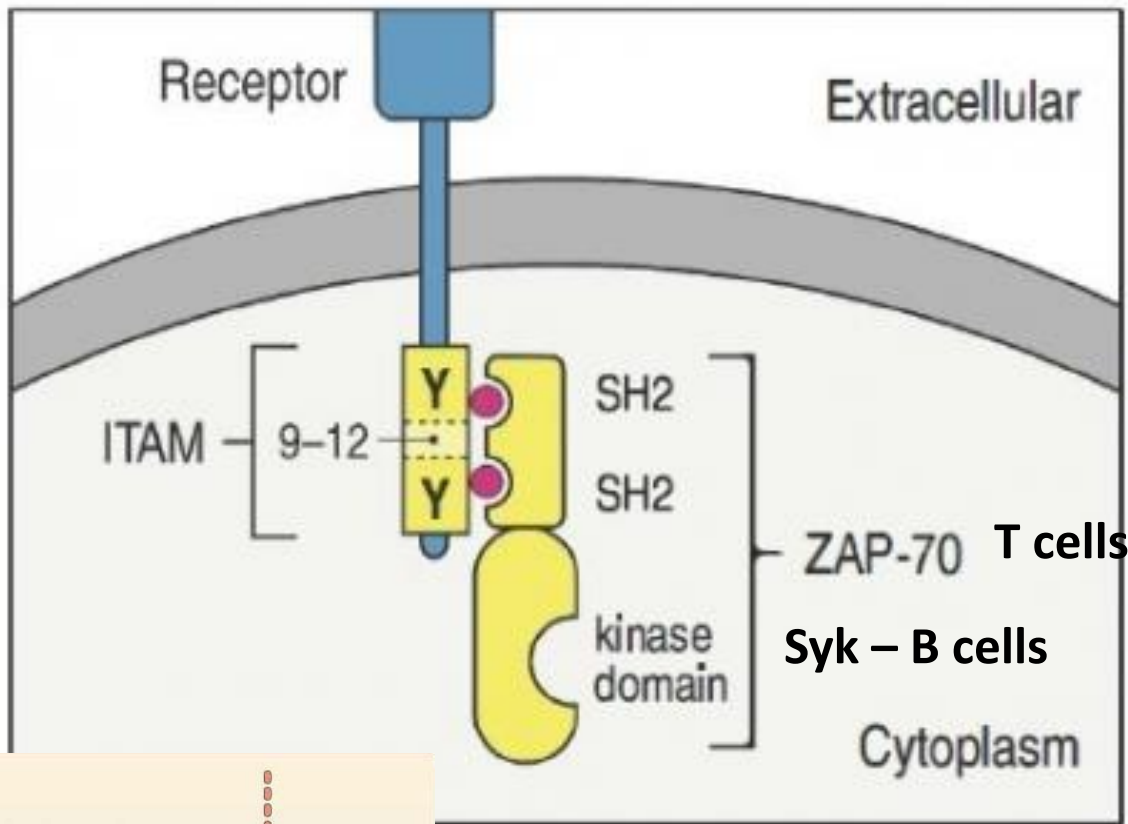
Figure 9.1 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)



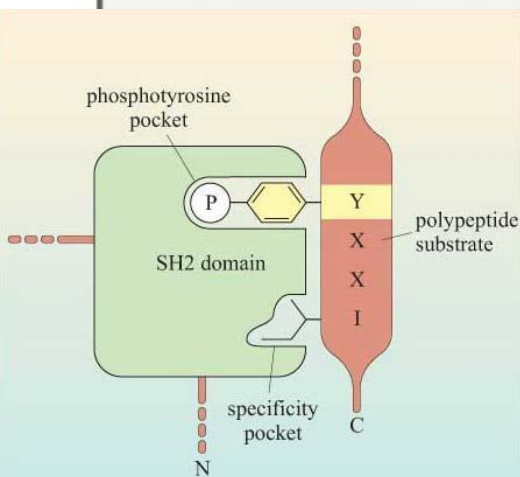
Кросс-сшивка рецептора с помощью антител к этому рецептору используется как методический подход при изучении функциональных свойств нового рецептора, лиганд которого не известен.

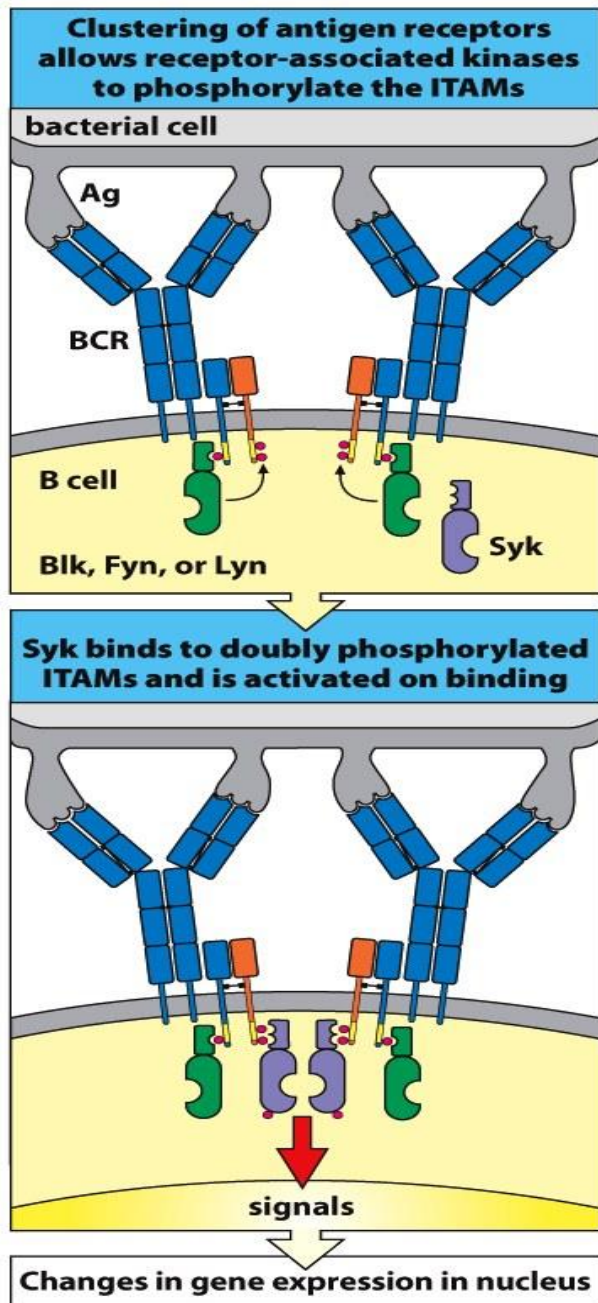
Детали кросс-сшивки и кластеризации BCRs после взаимодействия с растворимыми мономерными АГ не известны. Помощь Th1 клеток и использование ко-рецепторов?

Как работают ITAM-содержащие рецепторы?



1. Лиганд кросс-сшивает рецептор.
2. Тирозины в ITAM-мотиве фосфорилируются тирозин-киназой, ассоциированной с рецептором.
3. После этого сигнальный белок, содержащий два SH2 (Src Homology 2) домена на определенном расстоянии «чувствует» фосфорилированные тирозины и подстыковывается к ним и сам фосфорилируется, становясь активной киназой.





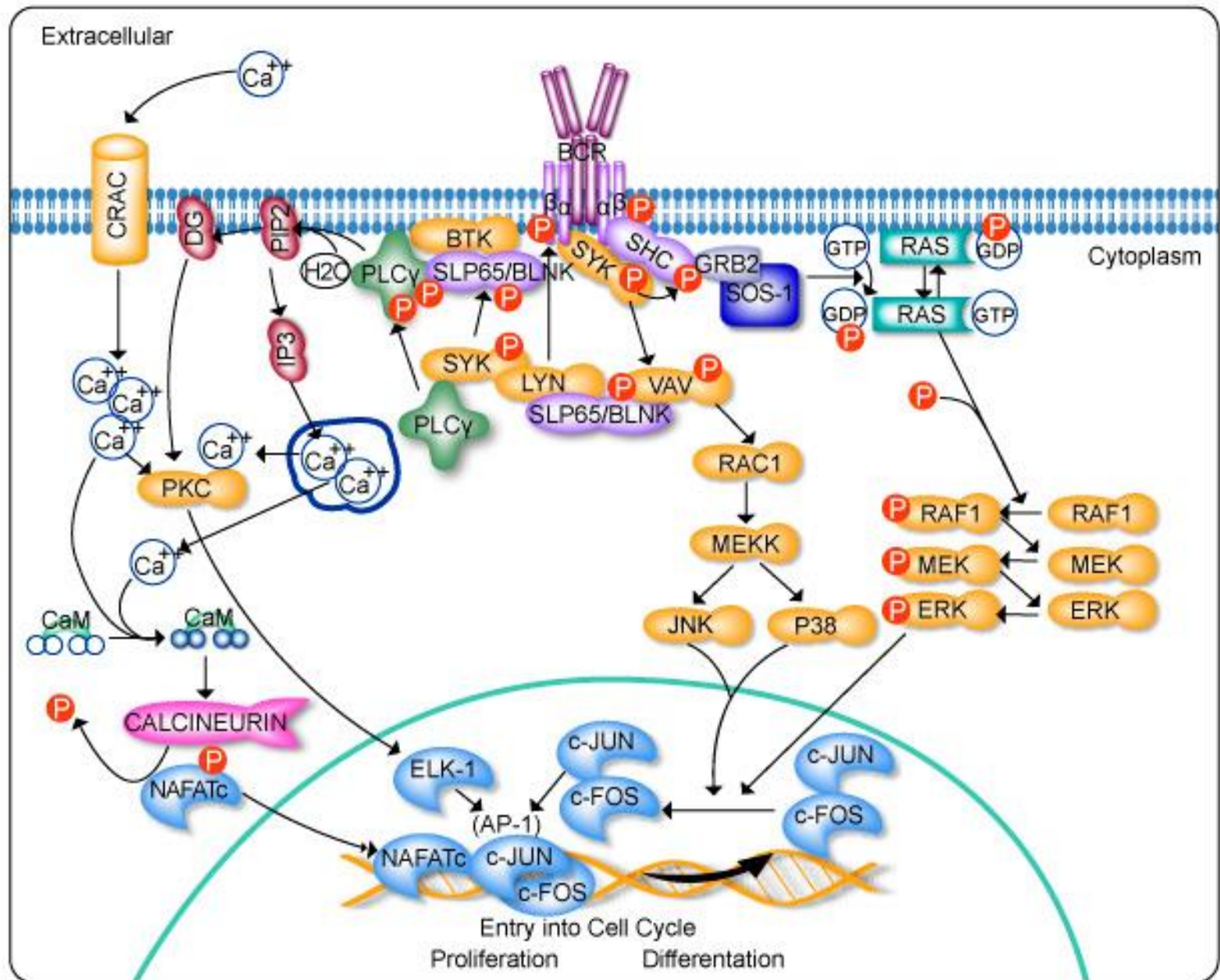
Связывание АГ с BCRs приводит к их кластеризации, что вызывает взаимоактивацию ассоциированных с рецептором тирозин-киназ семейства Src (Blk, Fyn, Lyn) и далее – фосфорилирование ITAMs в сигнальных субъединицах $Ig\alpha$ и $Ig\beta$.

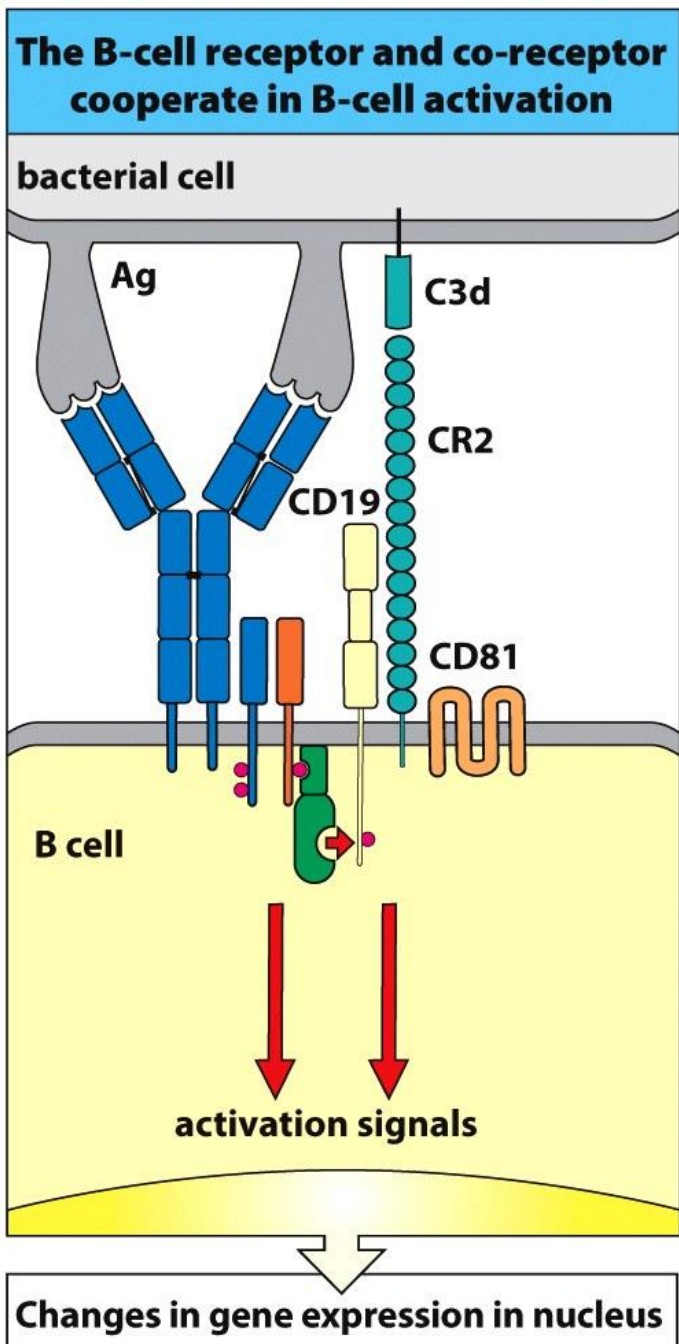
Далее рекрутируется из цитозоля содержащая два SH2 домена тирозин-киназа Syk, которая активируется присоединяясь к фосфорилированным сайтам $Ig\beta$ и становясь активной киназой, и инициирует дальнейший сигнальный каскад, приводящий к активации транскрипционных факторов (NFkB, NFAT, AP-1).

Активированная таким образом В-клетка начинает процесс размножения и дифференцировки в плазматическую клетку (или памяти).

Figure 9.2 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

BCR signaling pathway





Сигналинг через BCR усиливается ко-рецепторами, которые связывают тот же самый лиганд: ко-рецепторный комплекс CD19/ CD21 (CR2)/ CD81 может связывать тот же самый бактериальный антиген, что и BCR.

Кросс-сшивка BCR с ко-рецепторным комплексом CD19/ CD21 (CR2)/ CD81 приводит к фосфорилированию цитоплазматического «хвоста» CD19 тирозин-киназами, связанными с BCR, что приводит к активации еще одного сигнального пути и усиливает сигналинг в 1000- 10000 раз.

CD19 – пан-В-клеточный маркер, начинает экспрессироваться на стадии про-В клеток и исчезает на стадии плазматических клеток.

Все антигены, на которые отвечает В-клетка делятся на:

Т-независимые (LPS) и Т-зависимые (белки, в основном)

Ответ есть без Т-клеток

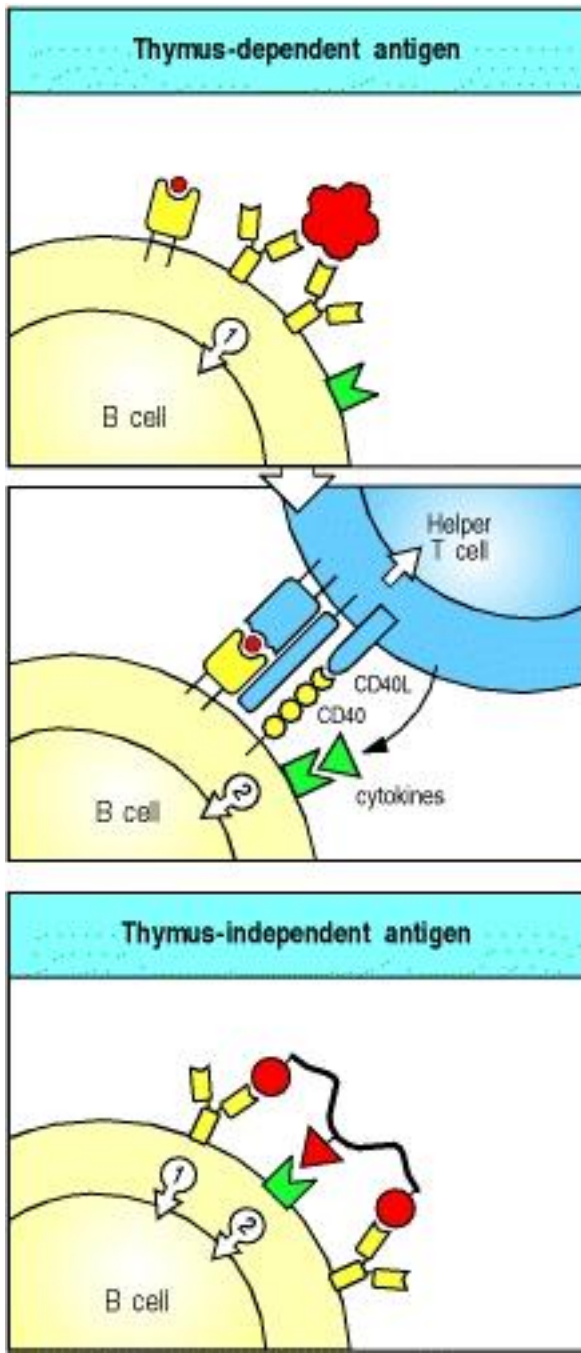
Ответа нет без Т-клеток

Активируют В-клетки
напрямую

Антитела- низко аффинные.
Как правило нет класс-
переключения – только IgM

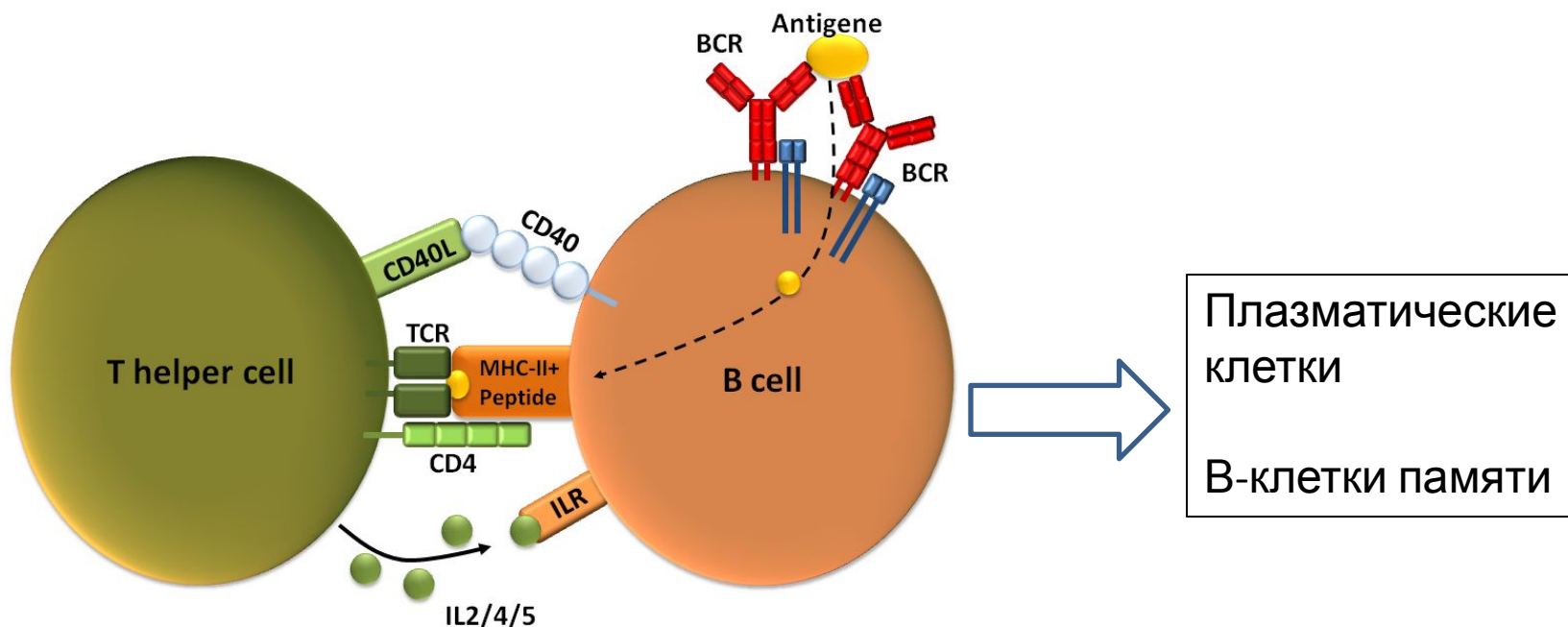
Требуют сигнала от CD4+ Т-
лимфоцита

Антитела – высоко аффинные,
результат соматического
гипермутагенеза. Есть класс-
переключение.



Для эффективной активации наивной В-клетке требуется, как правило, два сигнала: 1 – от BCR, 2- от Т –клетки (Т-зависимые АГ) или от TLR (Т-независимые АГ).

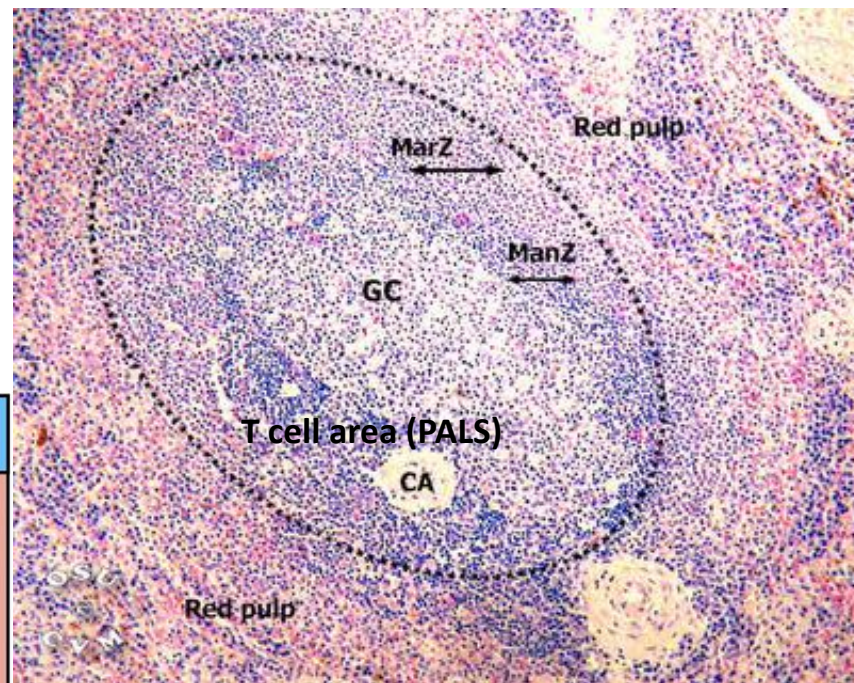
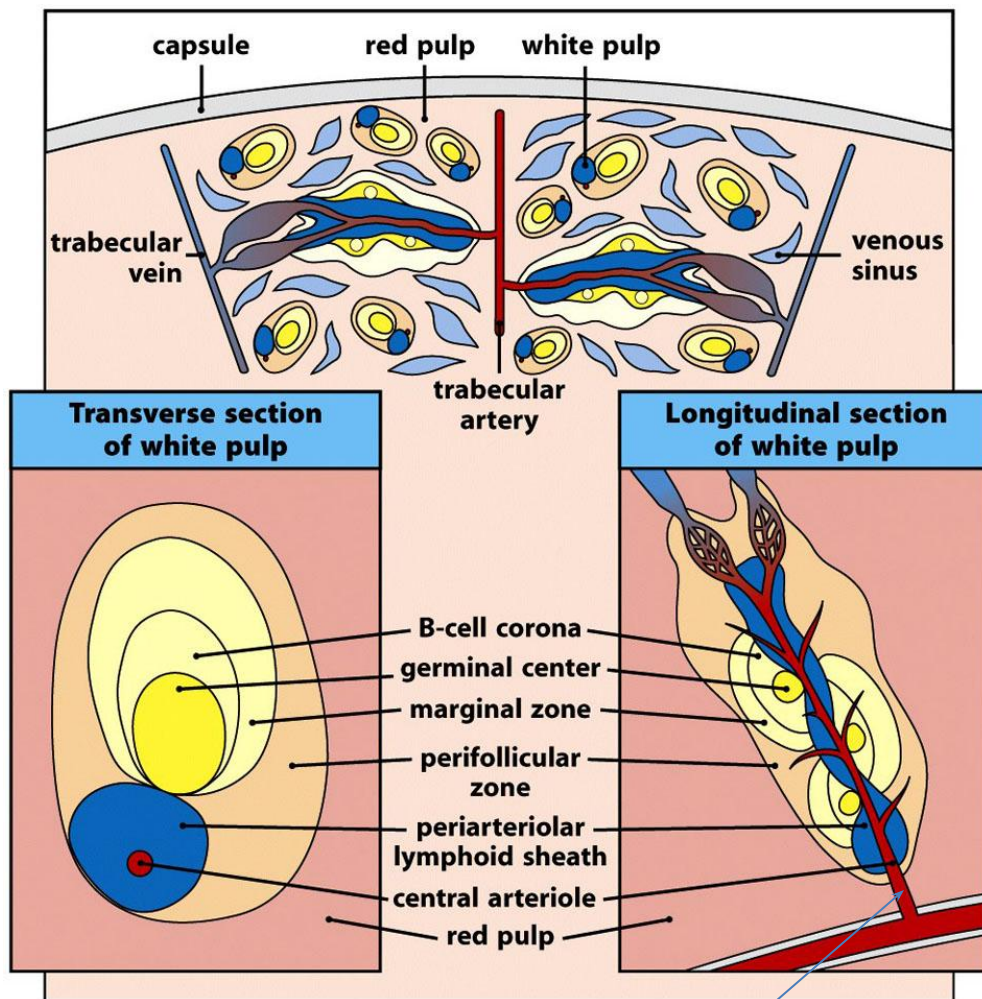
Для получения «помощи» от Т-лимфоцита В-клетка должна сначала интернализировать АГ, и затем «представить» его на своей поверхности в узнаваемом для Т-лимфоцита виде, т.е. в комплексе с молекулой МНСII. Взаимодействие происходит, если а) Т-клетка уже активирована, б) Т-клетка имеет TCR, распознающий хотя бы часть того АГ, который распознает В-клетка.



После распознавания Th2 клеткой АГ в комплексе с МНСII на поверхности В-клетки, Т-клетка начинает синтезировать и выставлять CD40L на своей поверхности и секретировать интерлейкины 2, 4 и 5, что приводит к пролиферации В-клетки и далее – к ее дифференцировке.

Активация В-клеток происходит во вторичных лимфоидных органах, где В- и Т-клетки занимают строго определенные гистологические компартменты.

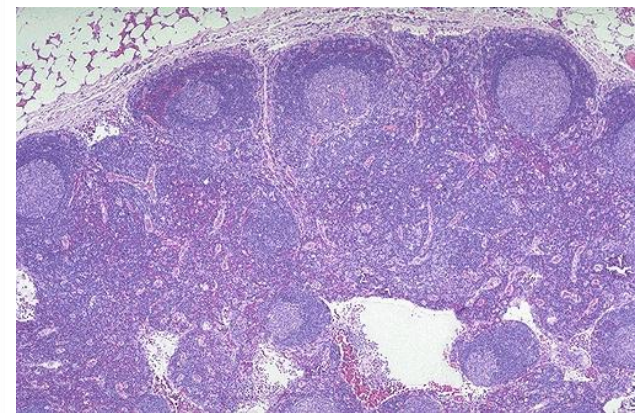
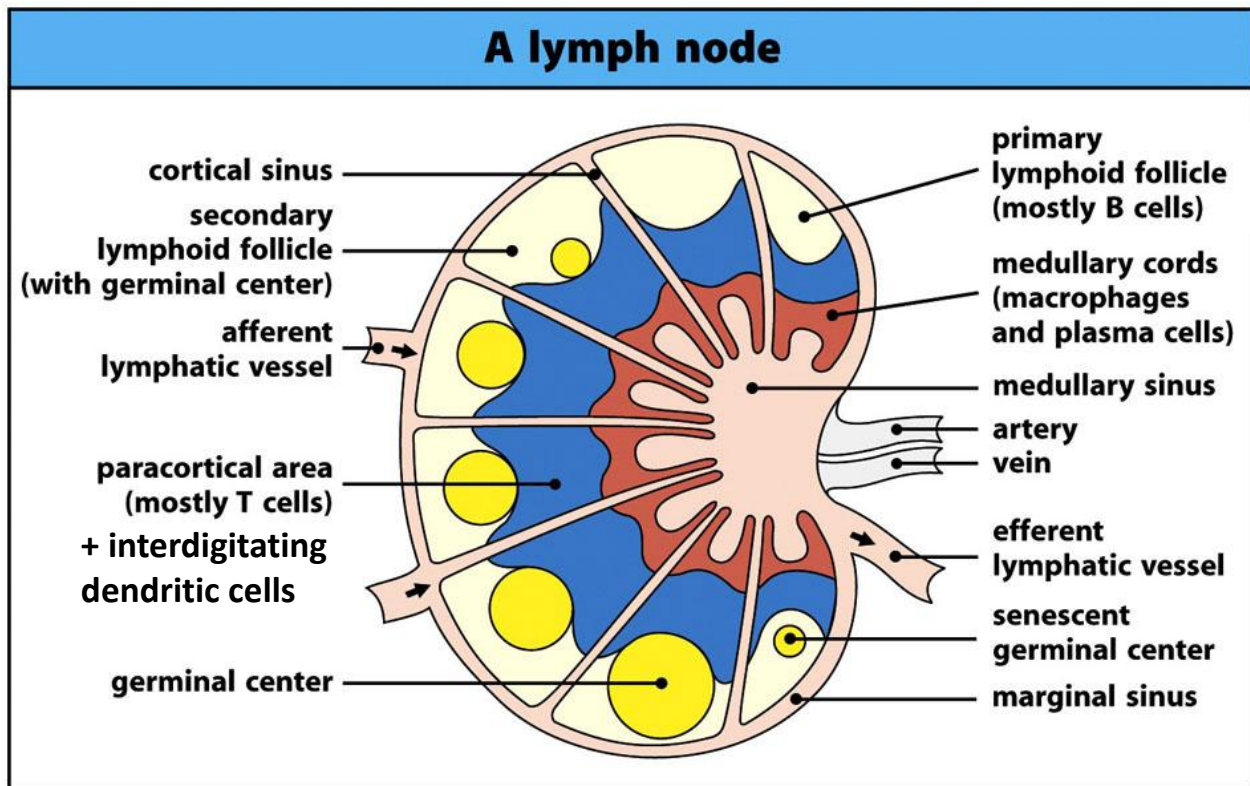
Строение селезенки



GC – germinal center, зародышевый центр, активация АГ, размножение и дифференцировка В-клеток
 Mantle zone – мантийная зона, наивные фолликулярные В-клетки (IgM+IgD+)
 Marginal zone – нерециркулирующие В-клетки маргинальной зоны (B1-клетки?), макрофаги.
 Red pulp – рециркулирующие клетки, плазматические клетки, очень много эритроцитов

В-клетки и АГ приходят в селезенку через центральную артериолу с кровью

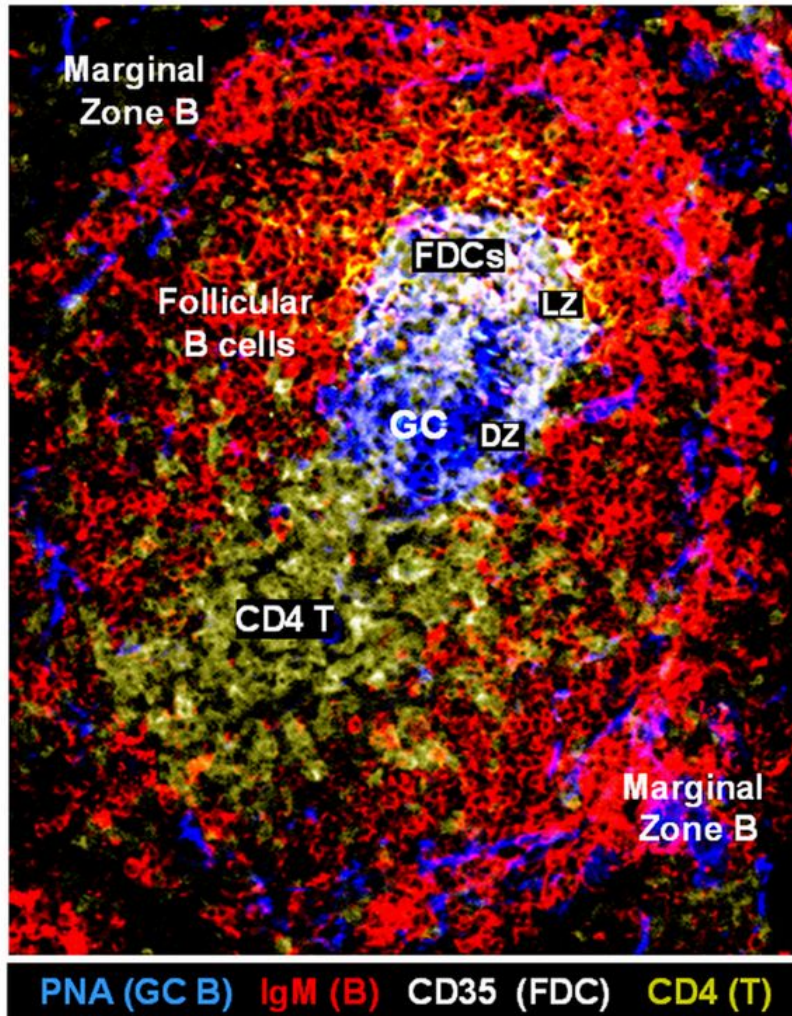
Лимфоузлы имеют похожие на селезенку клеточные компартменты. Но АГ и АГ-несущие дендритные клетки и АГ-несущие макрофаги приходят в лимфоузлы с лимфой. Наивные В-клетки приходят из крови через венулы, а уходят - через выносящий лимфоидный проток.



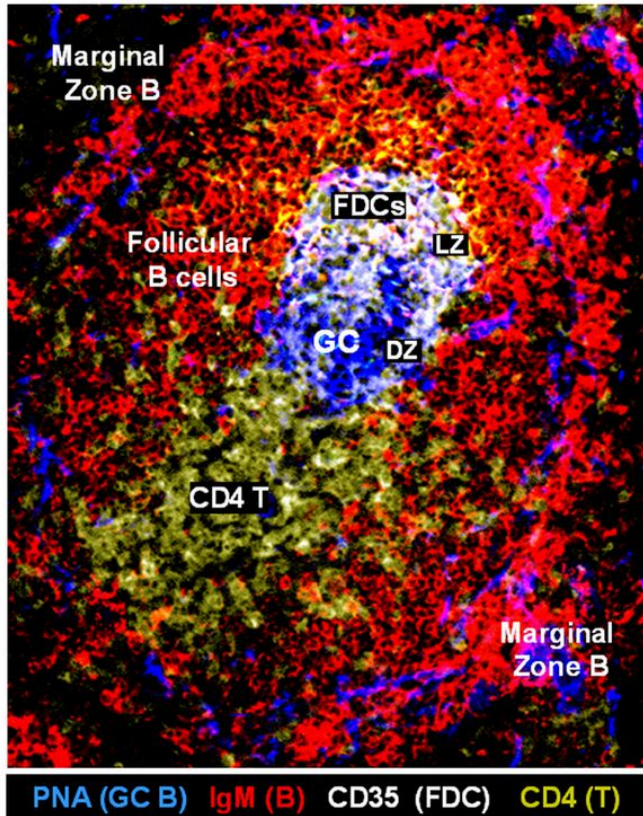
Реактивный лимфоузел со множеством GC.

Точное расположение В-, Т-клеток, макрофагов и дендритных клеток в тканевых компартментах контролируется хемокинами, которые продуцируются как этими клетками, так и клетками стромы.

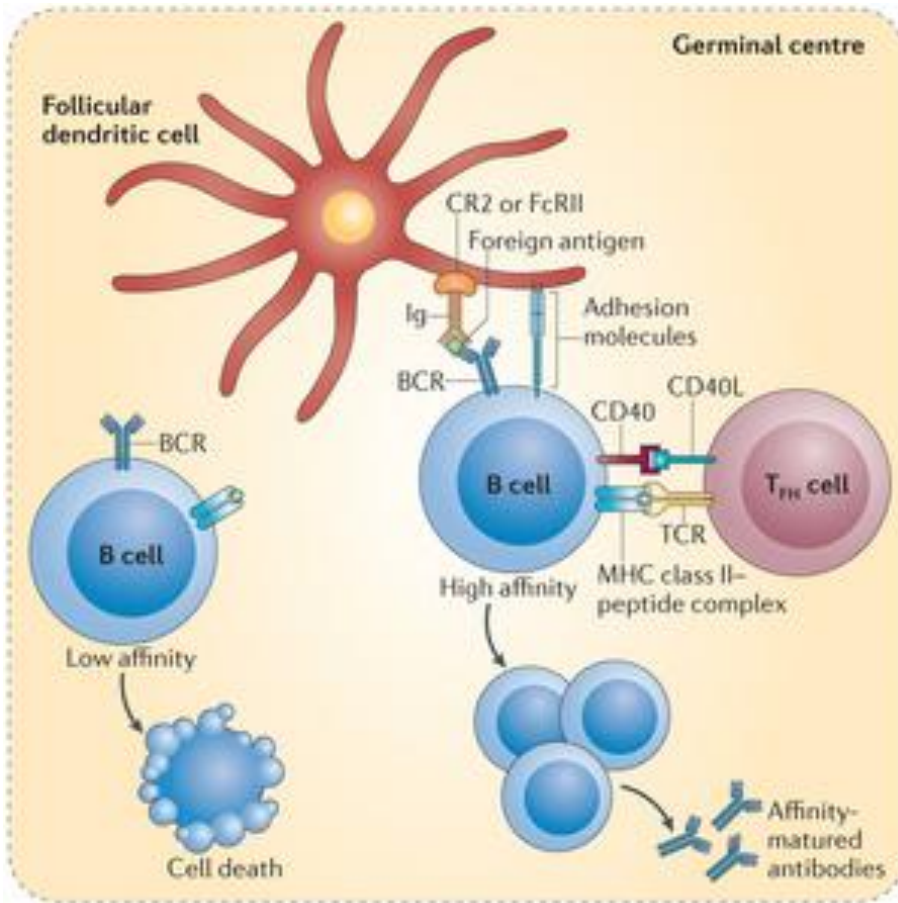
Вторичный лимфоидный фолликул селезенки мыши с зародышевым центром



FDC – фолликулярные дендритные клетки, имеют длинные отростки и **рецепторы к комплементу и Fc–рецепторы**, не способны к фагоцитозу, но захватывают и удерживают на своей поверхности иммунные комплексы (АГ-АТ или АГ-АТ-комплемент) и выставляют АГ на поверхности для «узнавания» В-клеткой. В-клетка «узнает» антиген через BCR и при наличии ко-стимулов от Т-клетки запускает процесс активации, размножения и дифференцировки (реакции зародышевого центра).

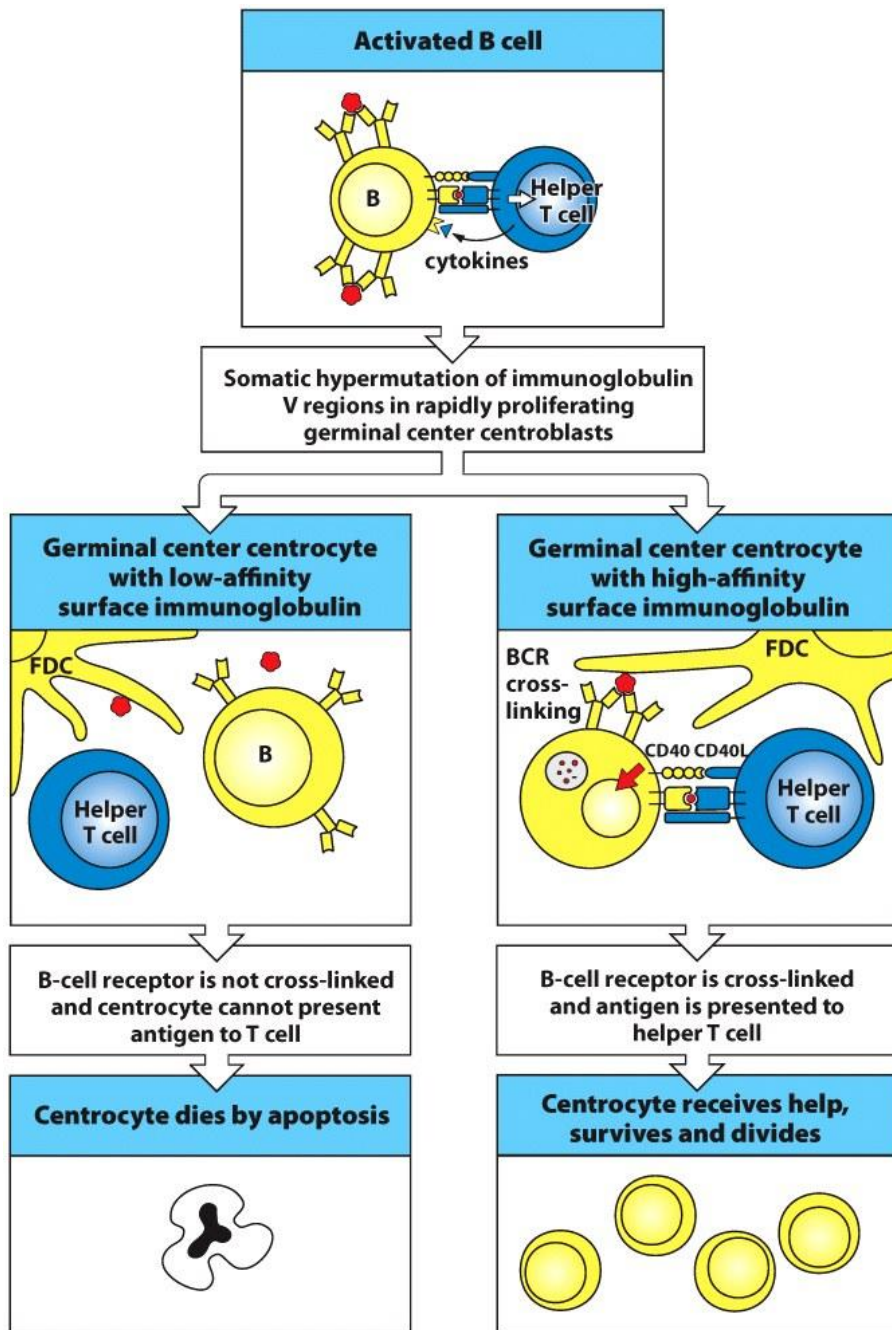


Зародышевые центры – компартменты, где происходит размножение и дифференцировка активированных В-клеток (в случае хронической инфекции). Два основных процесса: **класс-переключение** и процесс **соматического гипермутагенеза** V-областей АТ (во время транскрипции) и отбираются клетки, продуцирующие ИГ с наибольшей аффинностью к АГ (аффинное созревание АТ) и с разными эффекторными функциями. Клетки с низкоаффинными ИГ удаляются апоптозом. Результат реакций зародышевого центра – два типа клеток, В-клетки памяти и плазматические клетки



Как отбираются клетки с высоко аффинным BCR?

Считается, что В-клетки с более высоко аффинным BCR сильнее взаимодействуют с АГ, лучше представляют АГ T_{FN} клеткам в зародышевом центре и имеют больший шанс получить от них помощь и остаться в живых.



Аффинное созревание иммунного ответа в зародышевом центре.

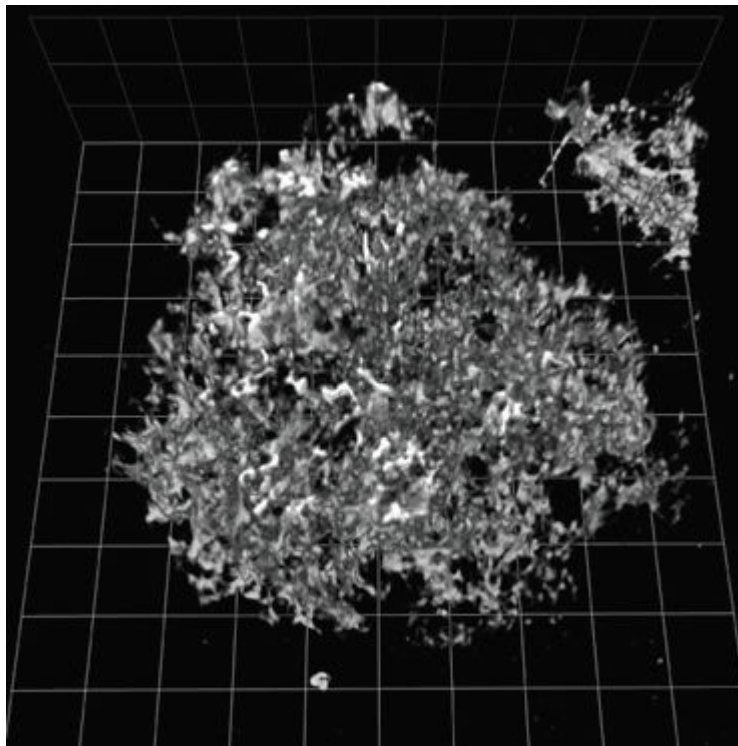
Точечные мутации в CDRs V-областей ИГ, постепенно накапливаются по мере деления В-клетки и изменяют антиген-связывающую способность BCR. Большая часть мутаций снижают аффинность BCR и клетки погибают в результате апоптоза. Редкие клетки с повышенной аффинностью получают помощь от Т-клеток, делятся и дифференцируются, давая начало клону плазматических клеток, секретирующих высоко аффинные антитела к АГ.

Figure 9.15 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

ФОЛЛИКУЛЯРНЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ (FDC)

– уникальная популяция клеток, необходимая для развития зародышевого центра и продукции высоко аффинных антител

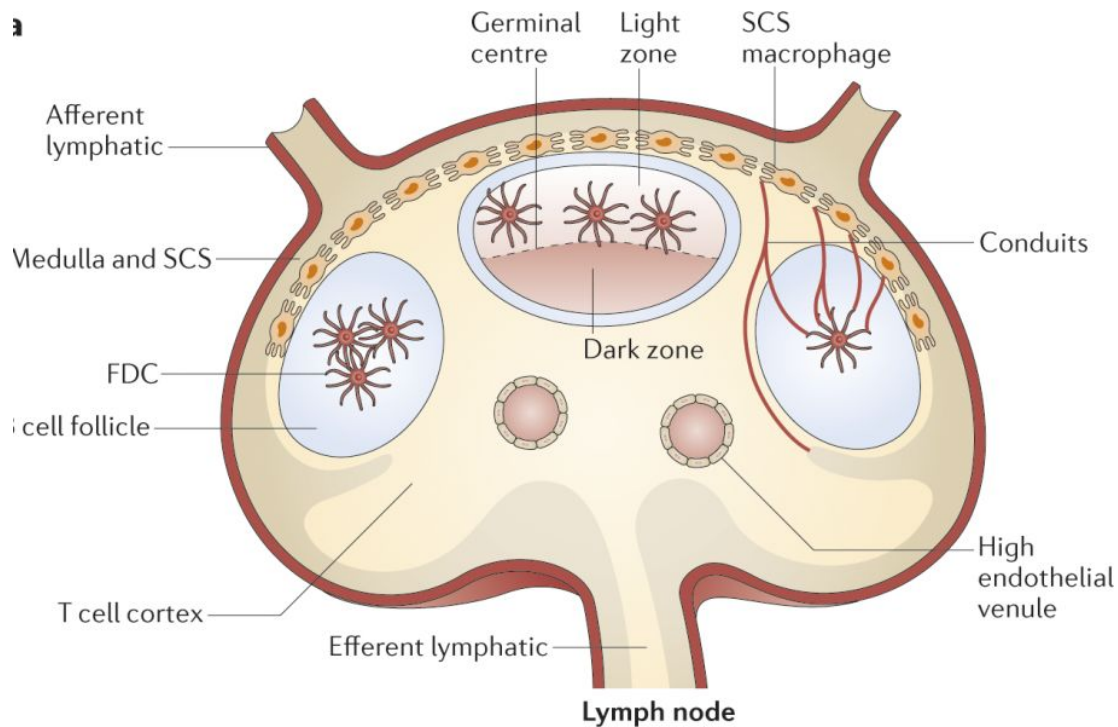
Образуются: FDC селезенки – нелимфоидного происхождения, из предшественников периваскулярных клеток стромального происхождения, которые распространены по всему организму. FDC – субпопуляция клеток стромы (из разряда клеток эндотелия кровеносных сосудов)



Трехмерная структура сети FDC в В-клеточном фолликуле лимфоузла (окрашивание с помощью антител к CR1).

Balthasar A. Heesters et al., Nature Reviews Immunology 2014

FDC необходимы для поддержания архитектуры первичных фолликулов, зародышевых центров и для аффинного созревания антител

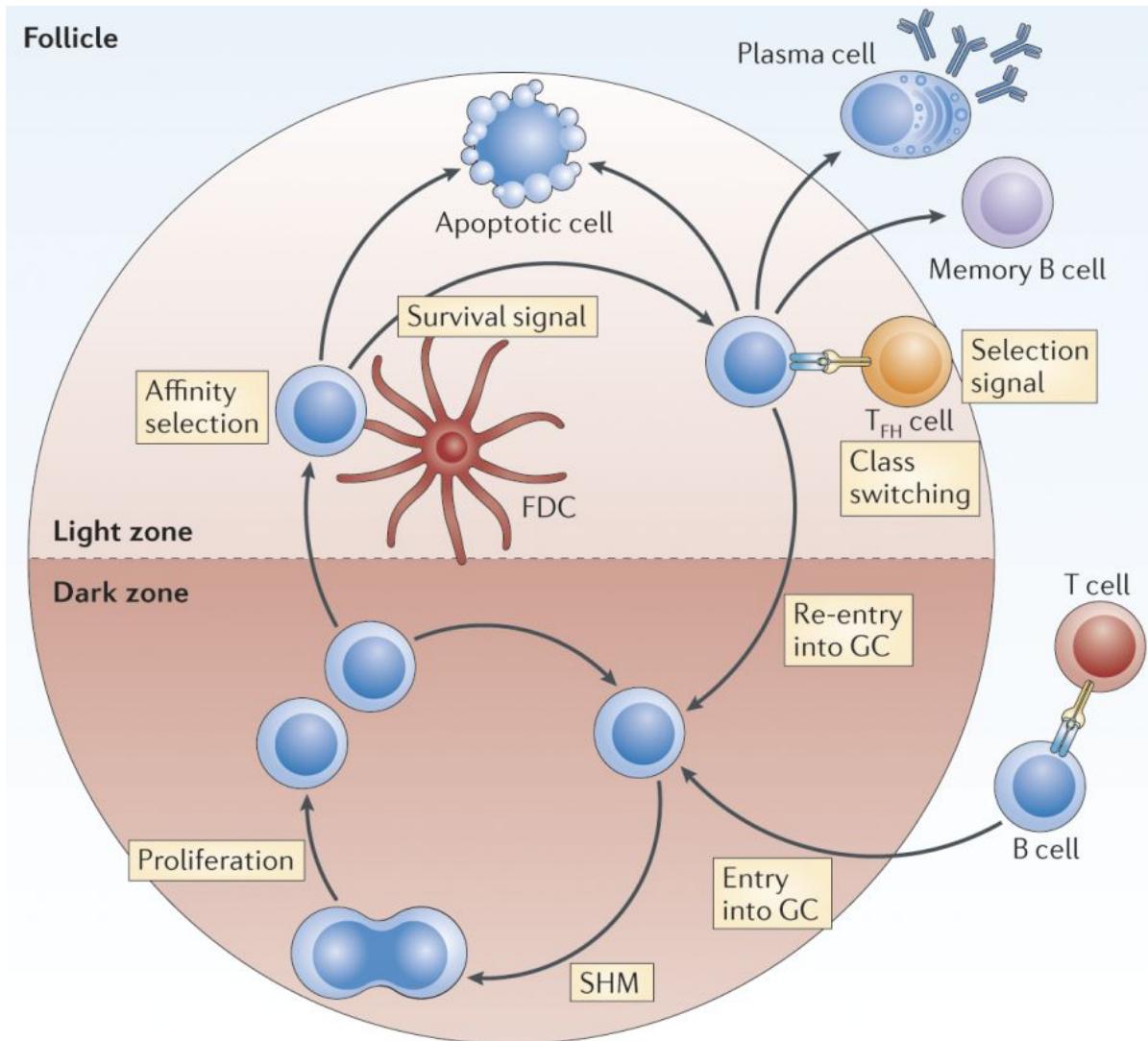


Локализация FDC – первичные В-клеточные фолликулы и светлая зона GC вторичных В-клеточных фолликулов.

Экспрессируют хемокин CXCL13, который привлекает В- и Т-лимфоциты в фолликул через рецептор CXCR5. Нет FDC – нет организации В-клеток в круглые фолликулы, есть неорганизованные «полоски» клеток

Balthasar A. Heesters et al., Nature Reviews Immunology 2014

FDC отвечают за реакции GC и, следовательно, за аффинное созревание АТ и формирование долговременного иммунного ответа



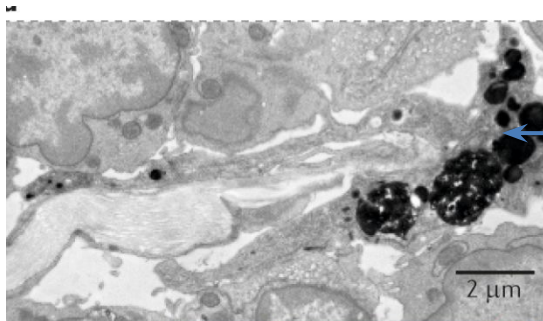
Balthasar A. Heesters et al., Nature Reviews Immunology 2014

FDC отвечают за доступность антигена для В-клетки после ее деления и соматического гипермутагенеза (SHM) и дают ей сигнал для выживания (IL-6 и BAFF - B cell-activating factor). Нет сигнала для выживания – апоптоз В-клетки.

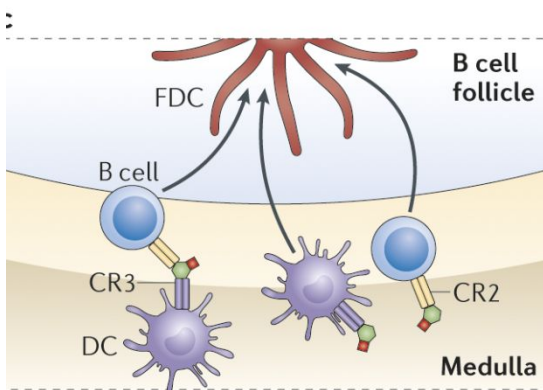
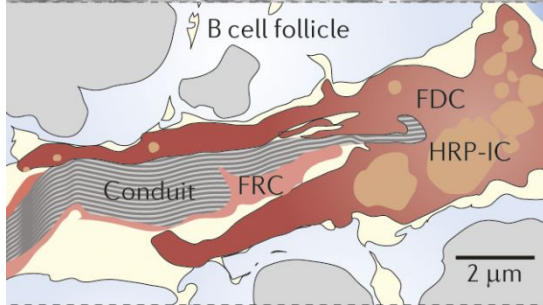
Нет FDC – хуже аффинное созревание, хуже память

Уникальная особенность FDC

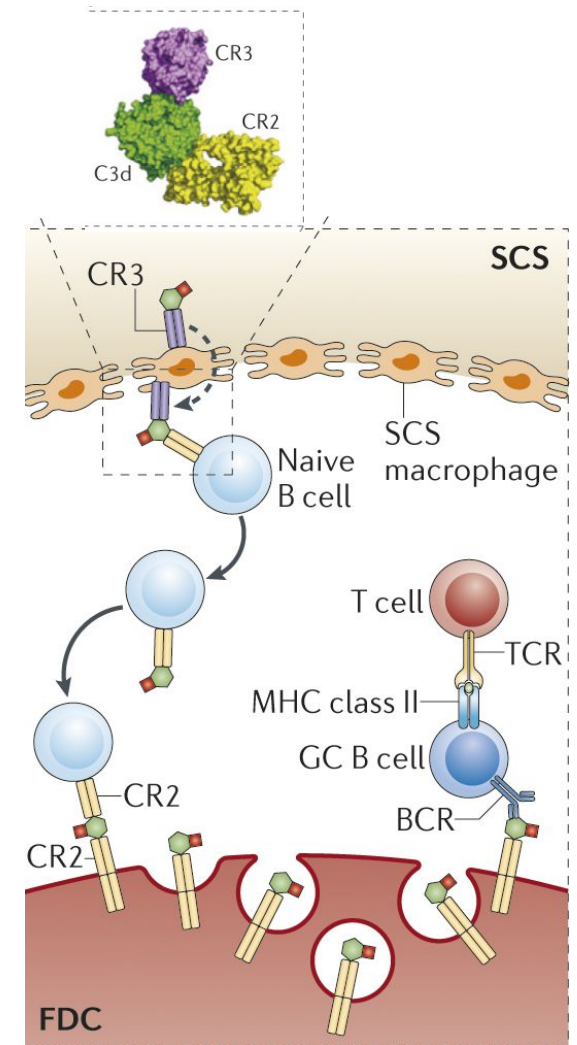
- поглощают и длительно сохраняют антиген без его разрушения
- Рецепторы к комплексу CR1 и CR2 (CD21) необходимы для функционирования FDC



FDC, нагруженная иммунными комплексами, мечеными HRP



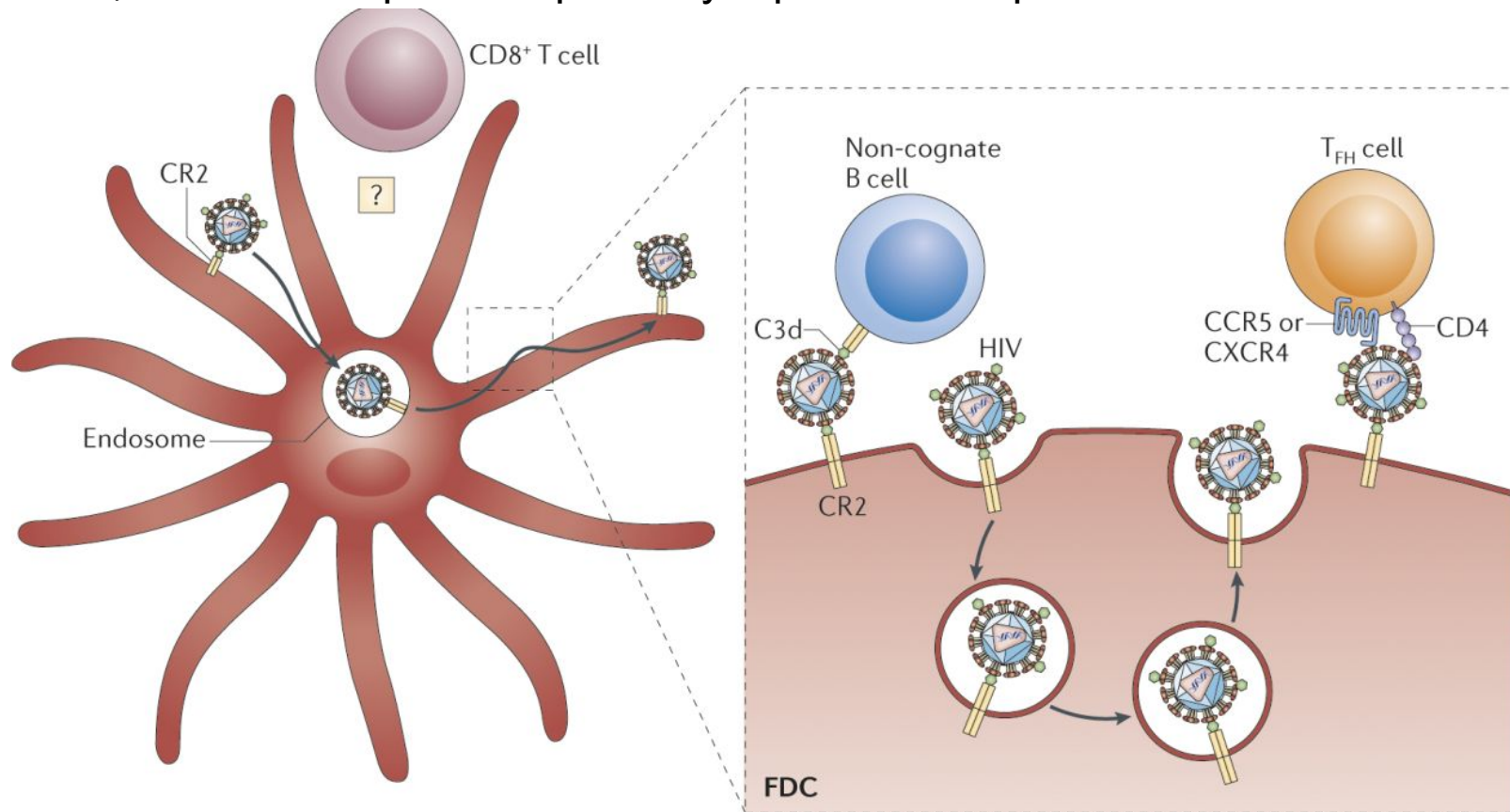
FDC (оседлые) получают небольшие АГ непосредственно из лимфы или большие опсонизированный С3d АГ от наивных В-клеток, которые могут получить его разными путями – от макрофагов субкапсулярного синуса, от ДК медуллы или непосредственно из лимфы. FDC сохраняют интактные комплексы С3d- АГ-СR2 в своем специальном эндосомальном компартменте без



Патологическое значение FDC

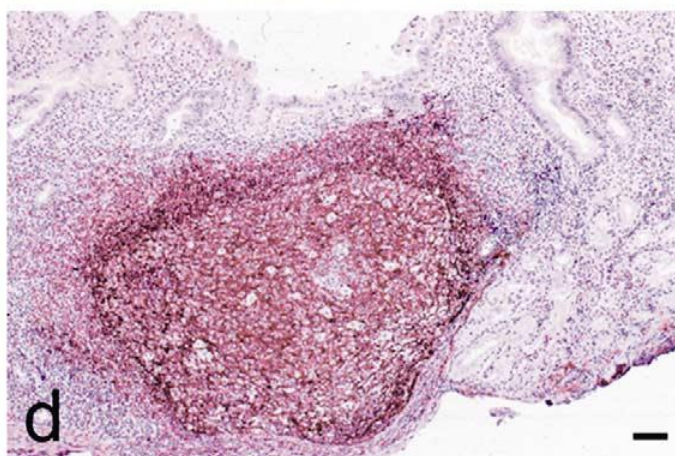
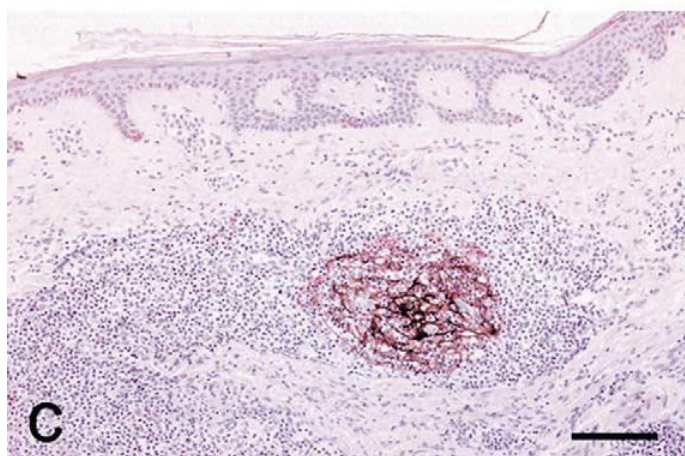
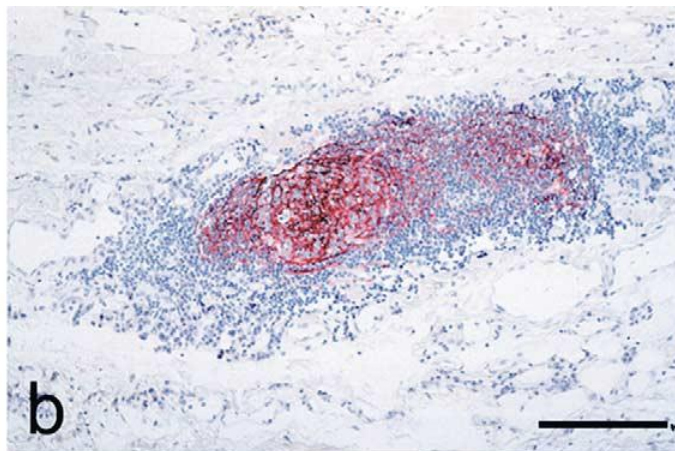
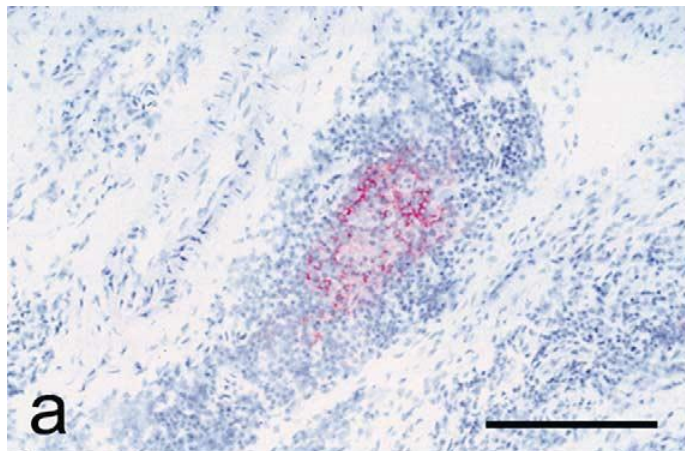
FDC - резервуары для HIV

HIV спонтанно связывает C3d и через CR2 попадает в недеградирующие условия FDC – становится «невидимым» для CD8+ T-клеток, для антиретровирусной терапии, но может заражать фолликулярные хелперные T-клетки



Balthasar A. Heesters et al., Nature Reviews Immunology 2014

FDC, образующие зародышевые центры в нетипичных местах при патологических состояниях: а) в суставе при ревматоидном артрите, б) в стенке аорты при атеросклерозе, с) в коже при псевдо В-клеточной лимфоме, д) в слизистой желудка при инфекции *Helicobacter pylori*.



Класс-переключение – особенность активации В-клеток в зародышевом центре.

Ранние стадии ответа – секреция IgM, далее класс-переключение – IgG и IgA.

Как регулируется класс-переключение? По-видимому, цитокинами. Механизм не ясен.

Influence of cytokines on antibody isotype switching							
Cytokine	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgA	IgE
IL-4	Inhibits	Inhibits	Induces		Inhibits		Induces
IL-5						Augments production	
IFN-γ	Inhibits	Induces	Inhibits		Induces		Inhibits
TGF-β	Inhibits	Inhibits		Induces		Induces	

Figure 9.16 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Два типа плазматических клеток

Все антигены, на которые отвечает В-клетка делятся на:

Т-независимые (LPS) и

Т-зависимые

В1 клетки, МZ В клетки

Follicular B cells - отвечают и на Т-независимые АГ

Более высокая базальная активация (экспрессия *Blimp1* – выше, *Rax5* и *Vcl6* – ниже). Поэтому – более быстрая дифференцировка в плазматические клетки (ПК) без дополнительных стимулов.

Коротко-живущие ПК

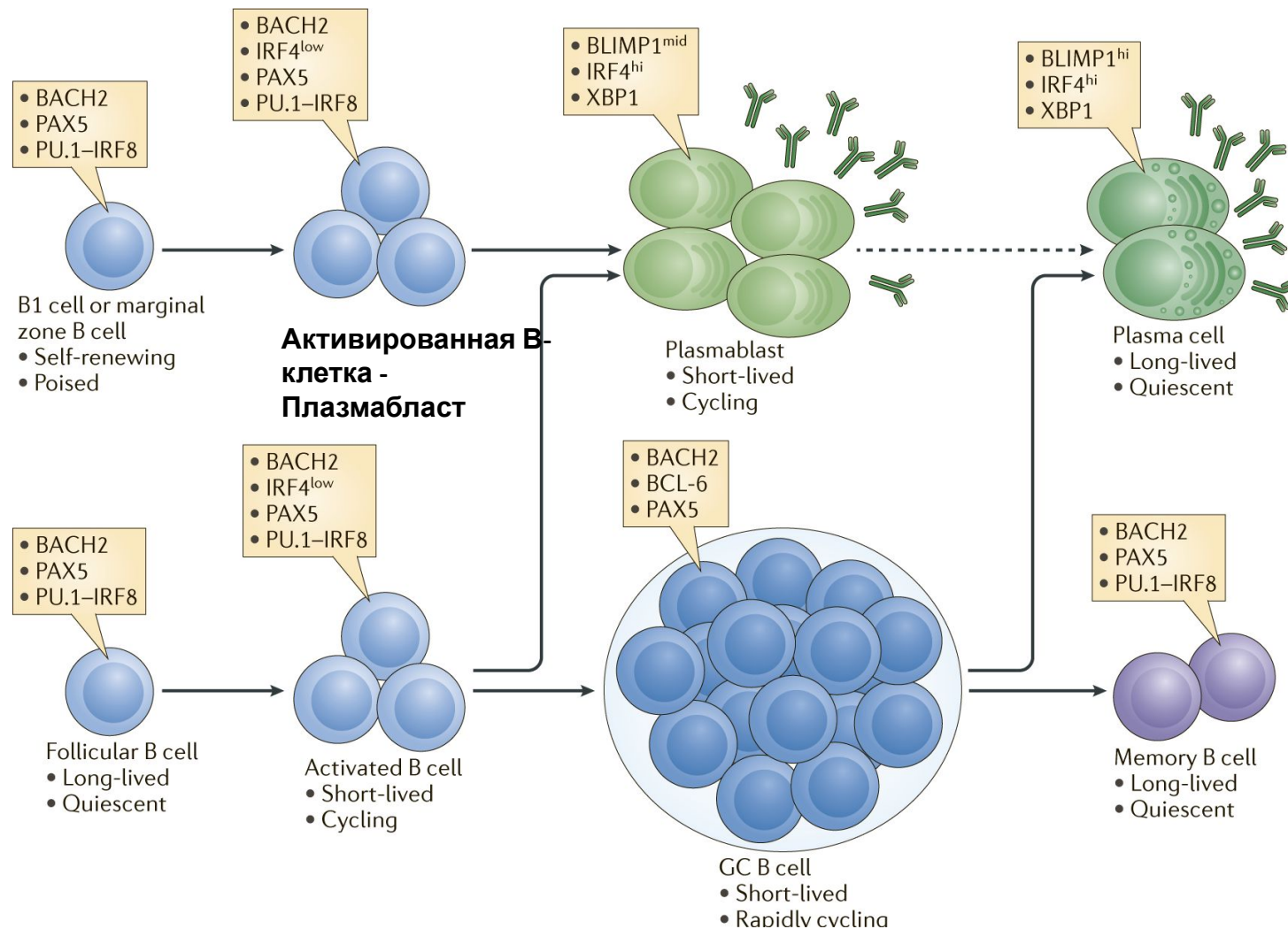
Слабый соматический гипермутагенез V-сегментов - низко-аффинные АТ, IgM

Более низкая базальная активация – поэтому более медленная дифференцировка в ПК, но сначала – сильное размножение, необходимость в помощи Т-клеток

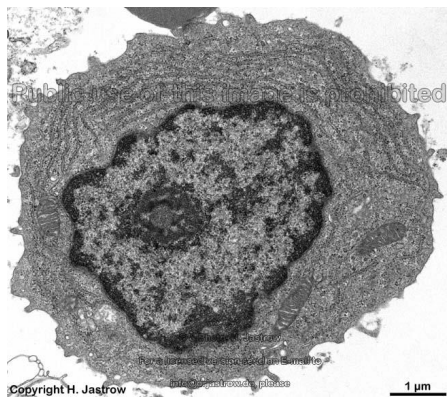
**Клетки-памяти
Долго-живущие ПК**

Высокий соматический гипермутагенез V-сегментов - высоко-аффинные АТ, IgG/IgA

Поздние стадии В-клеточной дифференцировки регулируются множеством транскрипционных факторов



BLIMP1 – основной регулятор дифференцировки В-клетки в плазматическую



Плазматическая клетка – терминальная стадия дифференцировки В-клетки.

Сильные морфологические и функциональные изменения по сравнению со зрелой В-клеткой: усиливается способность к синтезу/секреции ИГ, теряется способность к активации.



B-lineage cell	Property					
	Intrinsic			Inducible		
	Surface Ig	Surface MHC class II	High-rate Ig secretion	Growth	Somatic hypermutation	Isotype switch
 Resting B cell	High	Yes	No	Yes	Yes	Yes
 Plasma cell	Low	No	Yes	No	No	No

Fig 9.10 © 2001 Garland Science

Plasma cells secrete antibody at a high rate but can no longer respond to antigen or helper T cells.

Модель жизни плазматической клетки в костном мозге

