

B LENFOSİT YÜZEY RESEPTÖR GENLERİNİN DÜZENLENMESİ The re-arrangement of B-cell surface receptor genes

Yusuf ÖZBAL¹, Duygu EŞEL²

Özet: B lenfositler, öncü kök hücrelerden immüoglobulin gen düzenlenmesine bağlı olarak bir çok basamaklardan geçerek gelişir ve antijen reseptörlerine göre farklılaşırlar. Her bir immüoglobulin zinciri, somatik bir genin düzenlenmesiyle oluştuğundan, gelişen hücrelerde özelleşen zincirin yeniden düzenlenmesini durdurup, diğer basamağın başlaması sağlanır. Bu gelişim dizinin son ürünü, tek özgüllükte yüzeysel immüoglobulin molekülü taşıyan B lenfositlerdir. Gelişimin son evresinde B lenfositler, hücre yüzey reseptör moleküllerine bağlanan antijenler tarafından özgül olarak uyarılmaya hazır hücrelerdir.

Anahtar Kelimeler: Reseptör, Gen düzenlenmesi, B lenfositleri

Abstract: B cells differentiate from primitive stem cells; they proceed through a series of steps that are marked by re-arrangement of immunoglobulin gene segments to generate a diverse repertoire of antigen receptors. Each immunoglobulin chain is generated by somatic gene re-arrangement, it signals the developing cell to cease re-arrangement of the set of gene segments specifying that chain and to begin re-arrangement of the next set. The end product of this process is a B-cell with surface immunoglobulin of a single specificity. At this stage of development, B-cell is ready for selective events driven by antigens binding to these cell-surface receptors.

Key Words: Receptor, Gene re-arrangement, B-lymphocytes

Kemik iliğinden çıkan bir öncü B hücresi, erken pro-B hücre şeklinden başlayarak dört basamakta (erken pro-B, geç pro-B, pre-B, immatur B hücre evreleri) immatur B hücresine farklılaşmaktadır. Devam eden basamaklarda immüoglobulin (Ig) genleri düzenlenmekte ve gelişme faktörüne bağlı olarak B hücresine özgül yüzeysel molekülleri sentezlenmektedir. B hücrelerin gelişimi, Ig genlerinin yeniden düzenlenmesi ile sonuçlanan basamaklara öncülük etmektedir. Erken pro-B hücre evresinde, hücreler henüz Ig genlerini yeniden düzenleyecek durumda değildir. Ig ağır (H) ve hafif (L) zincirlerin sentezi ayrı genler tarafından yönetilmekte ve zincirlerin değişken (V) kısımlarını çok sayıda, sabit (C) kısımlarını tek gen kodlayarak ortak hareket eden bir ekson şeklinde mRNA oluşmaktadır. B hücre gelişimi ve Ig çeşitliliği, bu genlerin yapısı ve B lenfosit kromozomal DNA'ların genleri yeniden düzenlenmesine bağlıdır. Bir tip H zincir, iki tip L zincir (ve) gen bölgesi vardır. Bunlardan H zinciri yöneten gen 14 nolu, L zinciri

yöneten gen 2 nolu ve L zinciri yöneten gen 22 nolu kromozom üzerinde yer almaktadır. Ig H zincir geni üzerinde 9 adet C izotipi (C, C, C3, C1, C1, C2, C4, C9, C2), 6 J (bağlantı) segmenti ve yüzlerce VH segmentleri sıralanmakta ve bunların arasında ayrıca D (çeşitlilik) gen segmentleride bulunmaktadır.

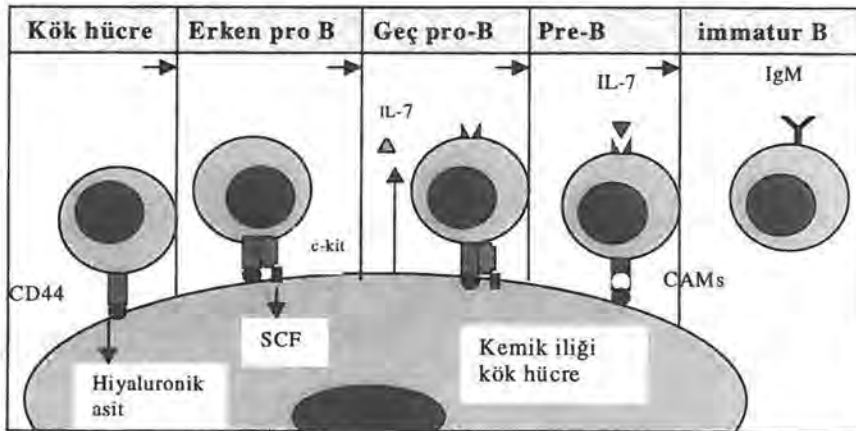
İkinci basamakta DH gen segmentinin JH segmentine (DH-JH) bağlanması ile erken pro-B hücreleri geç pro-B hücre şekline dönüşmekte ve üçüncü basamak olan pre-B hücre şekline dönüşüm için ağır zincirler sentezlenmektedir (Tablo 1). Geç pro-B hücrelerde bir VH segmenti DJH segmentine katılarak hücre membranında düşük, sitoplazmada yüksek oranda ağır zincir üreten pre-B hücreler oluşmaktadır (1,2). Ağır zincir oluşuktan sonra hafif zincir V/J gen düzenlenmesi başlamaktadır. Hafif zincir genleri yeniden düzenlenmesiyle immatur B hücrelerine dönüşüm için hücre yüzeyinde H/L zincirli Ig molekülleri tamamlanmakta ve hücreler yüzey IgM reseptörlü immatur B lenfosit şeklini alarak farklılaşma sonlanmaktadır. Bu olay kemik iliğinde geçmektedir. Lenfositlerde yeniden gen düzenlenmesi sırasında nadiren nokta mutasyon (somatik hipermutasyon)'lar da olmaktadır.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi 38039 KAYSERİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Prof. Dr.¹, Araş. Gör. Dr.².

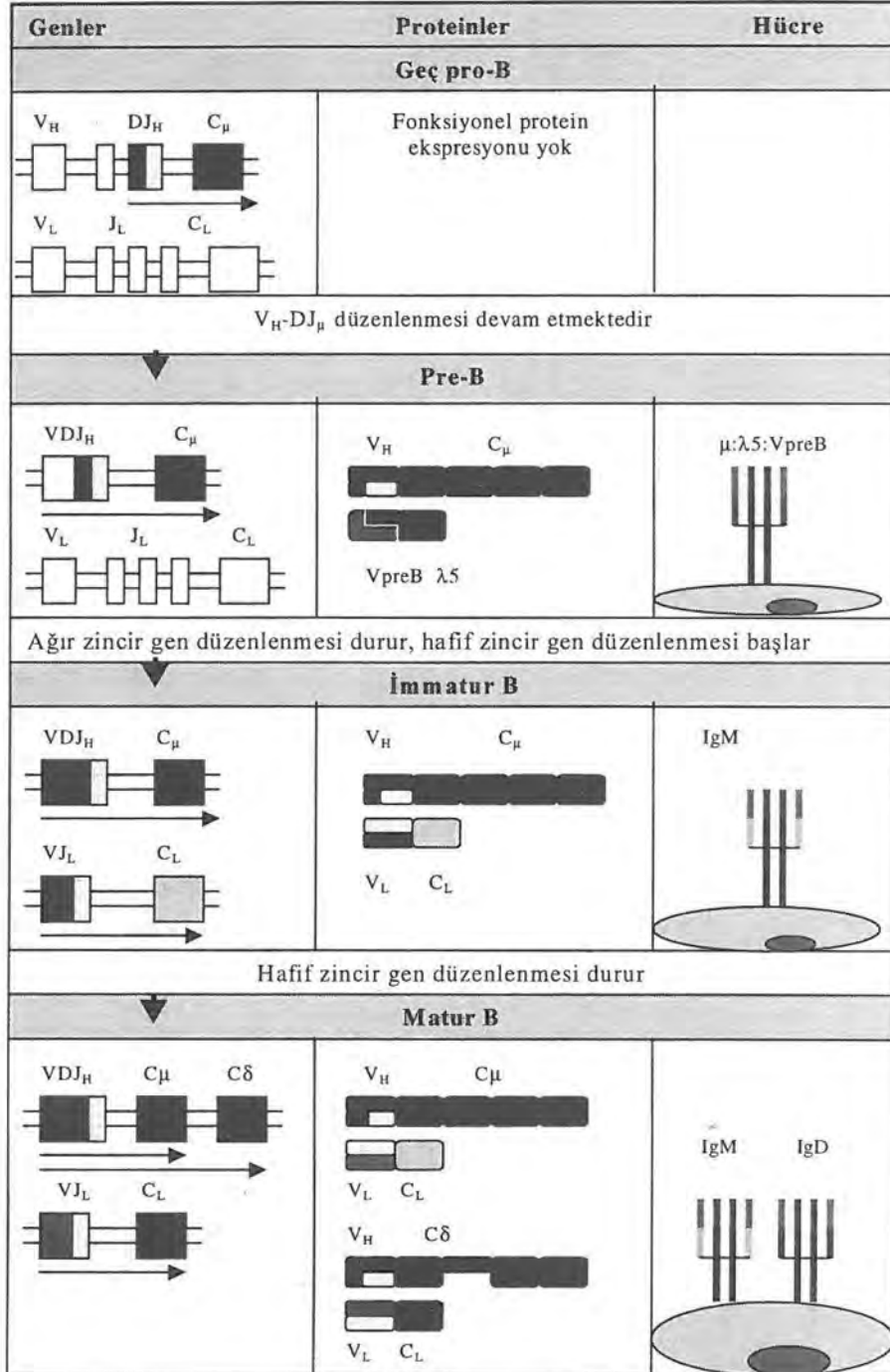
Geliş tarihi: 9 Şubat 1999

Tablo I. B lenfositlerin gelişim evreleri

B hücre		Ağır-zincir geni	Hafif-zincir geni	Hücre içi protein	Yüzey proteinler	
Antijene bağımsız	Kök hücre	Tohum geni	Tohum geni	TdT	MHC-II CD10,CD19 CD38	Kemik iliği
	Erken Pro-B	Tohum geni	Tohum geni	RAG-1 RAG-2 TdT	CD45R MHC-II CD19,CD38	
	Geç Pro-B	D-J yeniden düzenlenmesi	Tohum geni	RAG-1 RAG-2 TdT	CD45R MHC-II (D),CD19 CD38,CD40	
	Pre-B	Sitoplazma ve yüzeyde zinciri	V-DJ yeniden düzenlenmesi	Tohum geni	RAG-1 RAG-2	
Antijene bağımlı	İmmatur B	Hücre yüzeyinde IgM reseptör	VDJ yeniden düzenlenmesi membranda zincir sentezi	V-J yeniden düzenlenmesi	CD45R MHC-II IgM, CD19 CD20, CD21 CD40	Perifer
	Matur B	IgM/IgD reseptör	VDJ yeniden düzenlenmesi membranda zincir ve + mRNA sentezi	VJ yeniden düzenlenmesi	CD45R MHC-II IgM/IgD CD19,CD20 CD21,CD40	
	Bellek B	IgG reseptör	C, C veya C somatik hipermutasyon	VJ yeniden düzenlenmesi somatik hipermutasyon	CD45R MHC-II IgG/IgA CD19,CD20 CD21,CD40	
Terminal farklılaşma	Plasma hücresi	IgG sentezi	İzotipler ve mRNA sentezi	VJ yeniden düzenlenmesi	Plasmosit antijeni CD19,CD20 CD21,CD38	



Şekil 1. B. Lenfositlerin gelişimi (SCF: stem-cell factor, CAM: cell adhesion molecule)



Şekil 2. B lenfositlerin gelişimi sırasında gen yeniden düzenlenmesi

B hücrelerin gelişimi sırasında salınan gelişme faktörlerine bağlı olarak hücre yüzeyinde birçok protein moleküller oluşmaktadır. Bunlar; lenfositlerin göçümünde, gelişiminde ve diğer hücreler ile ilişkilerinde rol oynayan hücre yüzey adezyon proteinleridir. B lenfositlerin gelişimi için CD44 ve tirozinkinaz aktivite gösteren c-kit reseptörü önemlidir. Lenfoid öncü hücreler ve erken pro-B hücrelerin CD44 reseptörleri kemik iliği stromal hücrelerin hyalüronik asit molekülüne, daha sonra bu hücrelerin c-kit tirozinkinazı stromal hücrelerdeki "stem-cell factor" (SCF)'e bağlanarak kinaz aktivasyonu ve proliferasyon sağlanmakta geç pro-B hücreleri oluşmaktadır (Şekil 1). Bu hücrelerin gelişimi için IL-7 gereklidir (2,3). Stromal hücreler tarafından salınan IL-7, geç pro-B hücrelerde bulunan IL-7 reseptörüne bağlanarak pre-B şekline ve diğer adezyon moleküllerinin de bağlanmasıyla membran Ig molekülü içeren immatur B lenfositlere dönüşüm sağlanmaktadır. CD45R molekülü (CD45'in transmembran tirozinfosfataz formu) B hücre gelişiminin erken dönemlerinde görülen bir göstergedir. B lenfositlerin yüzeyinde, TH lenfositler tarafından matur B lenfositlerin aktivasyonu için gerekli pekçok reseptörler bulunmaktadır. İmmatur B hücreleri bir kaç gün içinde matür B lenfositleri haline dönüşerek IgM ve IgD reseptörleri kazanırlar.

B lenfosit gelişimi, bir Ig molekülünün H ve L zincir genlerinin yeniden düzenlenmesine dayanır. Ig genleri, her yeniden düzenlendiğinde out-of-frame (sıralanamama) tabanı oluşturma şansı yaklaşık 2/3 dür. B hücre gelişimi için hem H hemde L zincir geninin üretgen olarak yeniden düzenlenmesi gerektiğinden, bir çok hücre H zincirini düzenlerken özellikle farklılaşmanın erken döneminde fonksiyonel Ig protein sentezi yetmezliğine bağlı olarak kaybolmaktadır. L zincir genleri, hem sayıları hemde organizasyonu nedeniyle, üretgen olmayan gen yeniden düzenlenmesinden sonra hücrelerin hayatta kalmasını sağlar. Ig H zincir gen düzenlenmesi, erken pro-B hücre fazında iken D segmentlerinin J segmentlerine katılımıyla başlar (Şekil 2). Bu düzenleme geç pro-B hücre safhasından önce

diploid setin her iki kromozumunda da gerçekleşir. Bu, VH gen segmentinin DJH kompleksine katılımıyla sonuçlanan bir sonraki basamağa öncülük eder. VH-DJH birleşmesi, önce yalnız bir kromozomda olur. Pre-B olarak sınıflandırılan tam zincir oluşan hücrelerde, doğru bir translayon ile gen düzenlenmesinin VH ekzonu oluşturma ihtimali yaklaşık 1/3'dür. Eğer ilk VH-DJH birleşmesinde sıralanma doğru değilse yeni gen düzenlenmesi diğer kromozomda doğru sıralanmaya kadar devam eder ve pre-B hücrenin de değişimi sürer. Bununla birlikte, her iki gen düzenlenmesinde doğru sıralanamama durumu var ise geç pro-B hücreleri olgunlaşamaz veya D elementleri yer değiştirerek VH geni DJH genine bağlanamaz ve hücreler asla matur B lenfosit haline gelemez. Bazı pro-B hücre tümörlerinde, bir VH gen segmenti pro-B hücrelerini kurtarmaktadır. Produktif H zincir gen düzenlenmesi bir kez gerçekleştiğinde, L zincir gen düzenlenmesinin başlayacağı pre-B safhasından önce hücreler birkaç kez bölünmektedir. Bu da sentezlenen antikör moleküllerininin farklılaşmasını artırmaktadır. İlk hafif zincir gen yeniden düzenlenmesi hafif zincirini kodlayan iki kromozomdan birinde oluşur. Yeniden gen düzenlenmesi ile tam IgM (ve) molekülleri tamamlanır. lokusunda bir C eksonuna karşı bu eksonun yanında çok sayıda V ve 4 J gen segmenti bulunduğundan, her bir kromozomda birden fazla yeniden gen düzenlenmesi gerçekleşebilir. Eğer zincir gen yeniden düzenlenmesi ile tam IgM molekülü oluşmazsa, hafif zincir lokusu aynı şekilde yeniden düzenlenir. Ig L zincir gen yeniden düzenlenmesi ile bütün pre-B hücrelerinin tam IgM reseptörlü immatur B lenfosit şekline dönüşümü tamamlanmaktadır. Bu gelişim, matur B hücrelerinin %95'inde gerçekleşir. Çok az B hücrede H zincir genleri yeniden düzenlenmeden L zincir genleri yeniden düzenlenmekte veya hafif zincir genleri hafif zincir genlerinden önce yeniden düzenlenmektedir (1-4).

İmmüoglobulin gen yeniden düzenlenmesini etkileyen enzimlerin ortaya çıkışı programlıdır (2,3). RAG-1 ve RAG-2 (Recombination activator genes), Ig gen yeniden düzenlenmesi için gereken

proteinleri kodlayan genler olup erken B hücrelerinde aktiftir, ancak gen yeniden düzenlenmesinin sona erdiği matür B hücrelerde kaybolur. Aynı şekilde N-nükleotid eklenmesini sağlayan terminal deoksinükleotidil transferazın (Tdt) oluşumu, H zincir gen yeniden düzenlenmesinin olduğu, L zincir gen düzenlenmesinin olmadığı pre-B basamağında sona erer. Bu durum, Ig H zincir genlerinin V-D ve D-J bağlantılarında N-nükleotidlerin varlığı ve Ig L zincir genlerinin V-J bağlantılarında bunların yokluğu ile ilgilidir. B hücre gelişiminde 5 ve VpreB proteinleride rol almaktadır (Tablo I). B hücrelerde gen yeniden düzenlenmesi, kromatini düzenleyen bu proteinler tarafından kontrol edilmektedir. V(D)J rekombinasyonu, sadece rekombinasyon hedef sekansları içeren genleri yeniden düzenler. Haptomer ve nonamer sekanslardan oluşan bu rekombinasyonlar, T lenfosit reseptör ve Ig H/L zincir genlerince paylaşılır. Aynı enzimler tüm bu reseptör genlerin yeniden düzenlenmesine aracılık etmektedir (4).

İmmünoglobulin genlerinin yeniden düzenlenmesi, Ig promoter'lerinin aktivitelerini değiştirmektedir (3). Promoter'ler, yeniden düzenlenmiş Ig gen segmentlerindeki transkripsiyonel aktiviteyi artırmaktadır. Tohum DNA veya non-lenfoid hücrelerde Ig geni içeren kromatin-DNA kapalıdır. Erken pro-B hücrelerinde bulunan özgül proteinler, Ig enhancer (artırıcı) moleküllerine H zincirdeki J-C intronunda ve 3' C ekzonunda bağlanarak kromatin-DNA'yı açar. Yeniden düzenleme gerçekleştiğinde V gen segmentinin promoter akışı J-C intronundaki ve C ekzonunun 3' ucundaki enhancer'lere yaklaşmaktadır. Böylece, D segmentinin ters tarafına yerleşmiş promoterden düşük düzeyde transkripsiyon başlar ve açılmış olan DNA yeniden düzenlenir. Promoterlerin Ig gen enhancer'lerinden uzak olması nedeniyle, VH gen segmentlerinde transkripsiyon yavaş olmaktadır. Bir V gen segmentinin yeniden düzenlenmesini (V-DJ) takiben H zincir enhancer'inin etkisiyle promoterini yaklaştırır. Bu, D transkripsiyonundan daha ziyade pre-B ve immatür B hücrelerinde bulunan mRNA'nın sentezi için gereklidir. Ağır zincir

tetikleyici bölge (S), enhancer ve Ig C gen segmentleri arasında yer almaktadır. Takibeden rekombinasyonlarda izotip Ig yapımı için uyarım, promoter ile enhancer'in bağlanmasını etkilemez. Gen yeniden düzenlenmesi, reseptör değişikliğini sağlamak için olduğu kadar, gen ekspresyonunun regülasyonu için de gereklidir. Omurgalılarda gen ekspresyonunu regüle etmek için gen yeniden düzenlenmesinin kullanıldığı bilinen yalnız Ig ve T hücre reseptör genleridir.

Ağır zincir gen yeniden düzenlenmesi, yeniden düzenlenen gen ürünlerinin hücre yüzeyindeki ekspresyonuna bağlıdır (5). ağır zincirleri hücre yüzeyinde kendi kendilerine ekprese olamayacağından özel bir mekanizma gereklidir. Bunun için pre-B hücreleri L zinciri saran 2 adet Ig benzeri protein üretmektedir. Bunlardan biri C kangalına benzeyen 5, diğeri ise V kangalına benzeyen fakat ekstra bir N-terminal protein sekansı içeren VpreB olarak adlandırılmaktadır. Bunlar, pre-B poliferasyonunu, ağır zincir ve daha sonra hafif zincir gen yeniden düzenlenmesini başlatan sinyal proteinleridir. 5:VpreB kompleksi pre-B hücre reseptörü gibi görev yapmakta ve L zincir gen yeniden düzenlenmesinden önce pre-B hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemektedir. Pre-B hücresinde -ağır zincir gen düzenlenmesi tamamlandıktan sonra, 5:VpreB, ağır zincirin ileri gen yeniden düzenlenmesini inhibe ederek, hafif zincir gen yeniden düzenlenmesini tetikleyecek bir sinyal molekülü rolü oynar. Bu iki polipeptid, ağır zinciri ve onun devamı olan Ig ve Ig zincirleri ile bir hücre yüzeyi kompleksi oluşturarak, hücre yüzey reseptörü olan IgM'yi tamamlamaktadır. 5:VpreB sinyalinin kaybolması durumunda hafif zincir gen yeniden düzenlenmesi olmaz. Son olarak, matür B lenfositlerinde ve ağır zincirlerin sabit bölgelerinin transkripsiyonu ile hücre yüzeyinde IgM ve IgD reseptörler oluşmaktadır (Şekil 2). Farelerde transmembran molekülü üretmeyen mutant zincir geni olduğundan H zincir gen yeniden düzenlenmesinden sonra B hücre gelişimi durmaktadır. Beş yokluğunda da bazı B hücreleri gelişebilir.

Genellikle Pro-B hücreler D yapmazlar ve VH-DJ gen düzenlenmesi devam eder. Nadiren, bazı pro-B hücreleri D proteinini eksprese ederek matür B hücresi oluşturamazlar. Pre-B hücre yüzeyine eksprese olan D:5:VpreB kompleksi kaybolunca H zincir gen yeniden düzenlenmesi baskılanır ve B hücre matürasyonunun tamamlanması için gerekli olan V-DJH bağlantısı engellenir (5,6). Hafif zincir geni başarıyla yeniden düzenlendiği zaman, ağır zinciri çevreleyen :5:VpreB kompleksi hafif zincirlere geçerek onu sarmaktadır. B hücre yüzeyinde oluşan :5:VpreB kompleksinin sinyalleri ileri hafif zincir gen yeniden düzenlenmesini sonlandırmakta ve sonunda tam IgM reseptörü oluşmaktadır (5). Ig genlerinin yeniden düzenlenmesindeki her bir basamak, bir önceki basamağın ürünleriyle regüle edilmektedir. Bunun sonucunda her B hücresinin sadece bir ağır birde hafif zincir eksprese ettiği düşünülmektedir.

İmmünoglobulin gen yeniden düzenlenmesi programı B hücre reseptörlerinin monospesifitesini sağlar (3). B hücrelerin monospesifitesi, aktive olan B hücreler tarafından antijene özgül antikor sentezi için gereklidir. Tam bir Ig oluştuğunda immatur monospesifik B hücresi, çevredeki antijenlerce seleksiyona uğratılır. Kendi antijenlerini tanıyan immatur B hücreleri, kemik iliğinden antikor yapımı için stimüle olacakları periferik lenfoid dokuya

ulaşmadan önce, self toleransı sağlamak için uzaklaştırılmakta veya inaktive edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chen J and Alt FW. Gene rearrangement and B cell development. *Curr Opin Immunol* 1993, 5:194-200.
2. Osmond DG. The turnover of B-cell populations. *Immunol Today* 1993, 14:34-37.
3. Janeway CA Jr and Paul Travers P. Positive and negative selection of T cells. In: Janeway CA Jr and Paul Travers P (eds), *Immuno Biology-The Immune System in Health and Disease*. Current Biology Ltd, London 1994, pp 5.1-14.
4. Hsieh, CL, McCloskey RP and Lieber MR. V(D)J recombination in minichromosomes is not affected by transcription. *J Biol Chem* 1992, 267:15613-15619.
5. Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Muller W, Melchers F and Rajewsky K. A critical role of 5 protein in B-cell development. *Cell* 1992, 69:823-831.
6. Kincaid PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi SI and Gimble JM. Cells and molecules that regulate lymphopoiesis in bone marrow. *Ann Rev Immunol* 1993, 7:111-143.