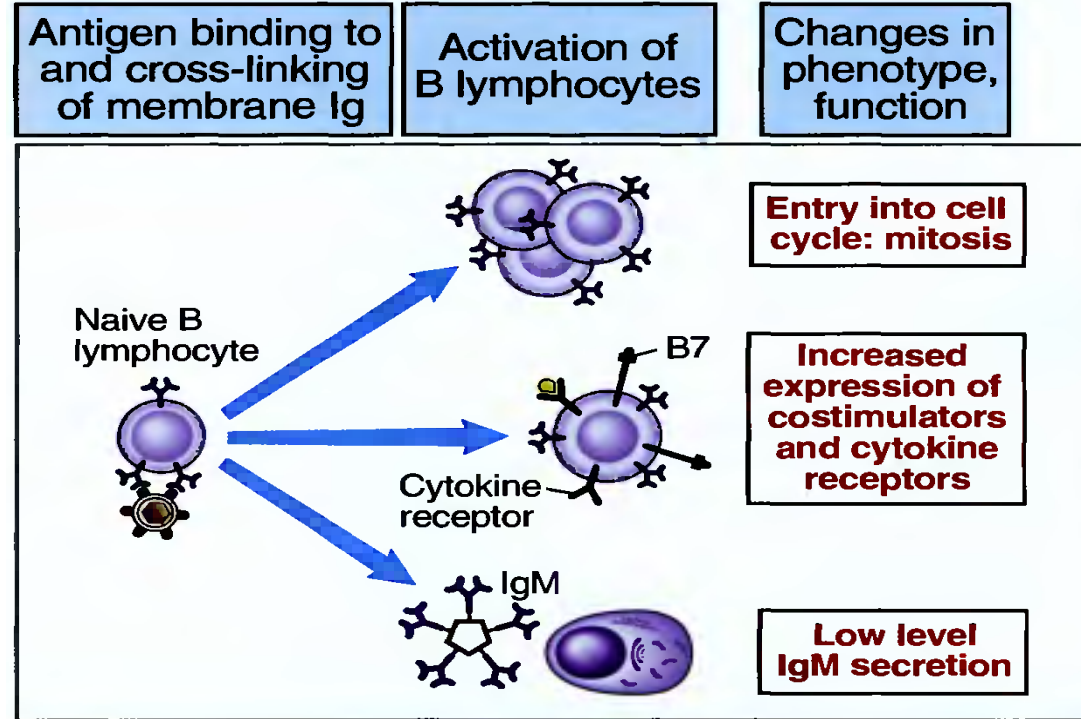


B lenfosit aktivasyonu ve Antikor Üretimi (II)

Doç. Dr. Emrah Şefik Abamor

Antijen-aracılı B hücre aktivasyonunun işlevleri

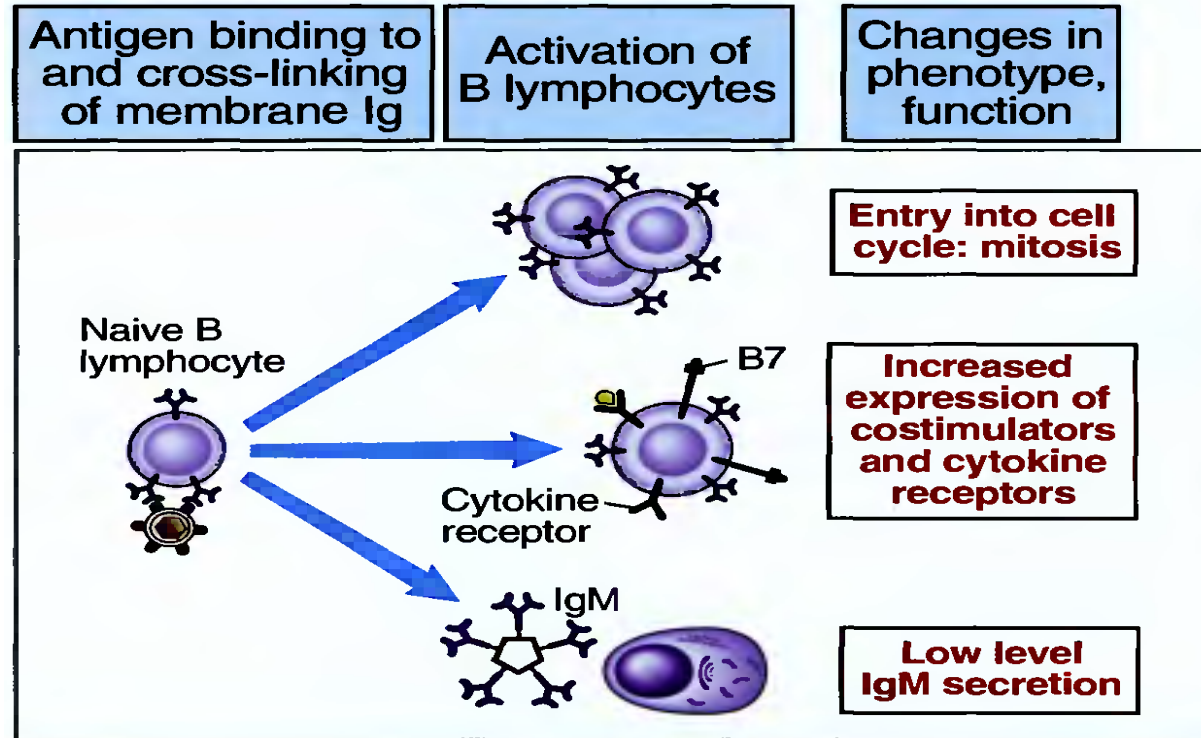
• B lenfositlerin antijen ve ikinci sinyal aracılığıyla aktive olması sonucunda yardımcı T lenfositleriyle etkileşimi gerçekleşerek bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma aşamaları başlar.



B cell response to antigen	Significance
Entry into cell cycle, mitosis	Clonal expansion
Increased expression of B7 costimulators	Ability to activate helper T cells
Increased expression of cytokine receptors	Ability to respond to cytokines produced by helper T cells
Migration out of lymphoid follicles	Interaction with helper T cells
Secretion of low levels of IgM	Early phase of humoral immune response

Antijen-aracılı B hücre aktivasyonunun işlevleri

- Aktive B lenfositler hücre döngüsüne girer ve antijene özgül klonların artışı ile sonuçlanan B lenfosit çoğalması gerçekleşir.



B cell response to antigen	Significance
Entry into cell cycle, mitosis	Clonal expansion
Increased expression of B7 costimulators	Ability to activate helper T cells
Increased expression of cytokine receptors	Ability to respond to cytokines produced by helper T cells
Migration out of lymphoid follicles	Interaction with helper T cells
Secretion of low levels of IgM	Early phase of humoral immune response

Antijen uyarısı B lenfositlerde en az üç değişikliğe yol açar ve böylece B hücrelerinin yardımcı T hücreler ile etkileşme yeteneği çoğalır.

- B hücre aktivasyonu;
- T hücre aktivasyonu için ikinci sinyali oluşturan B7 eş-uyaran ekspresyonu
- Yardımcı T hücre fonksiyonlarının yürütülmesinde rol oynayan mediatörler olan sitokinler için reseptör ekspresyonu

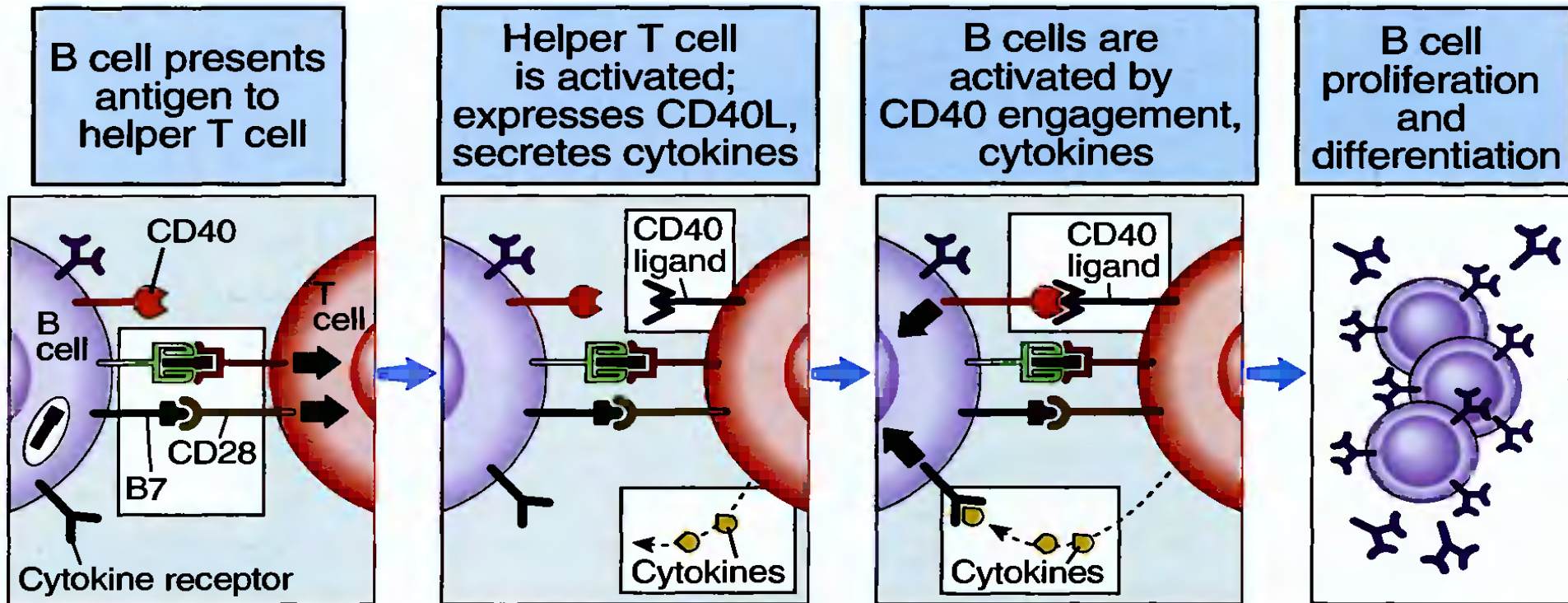
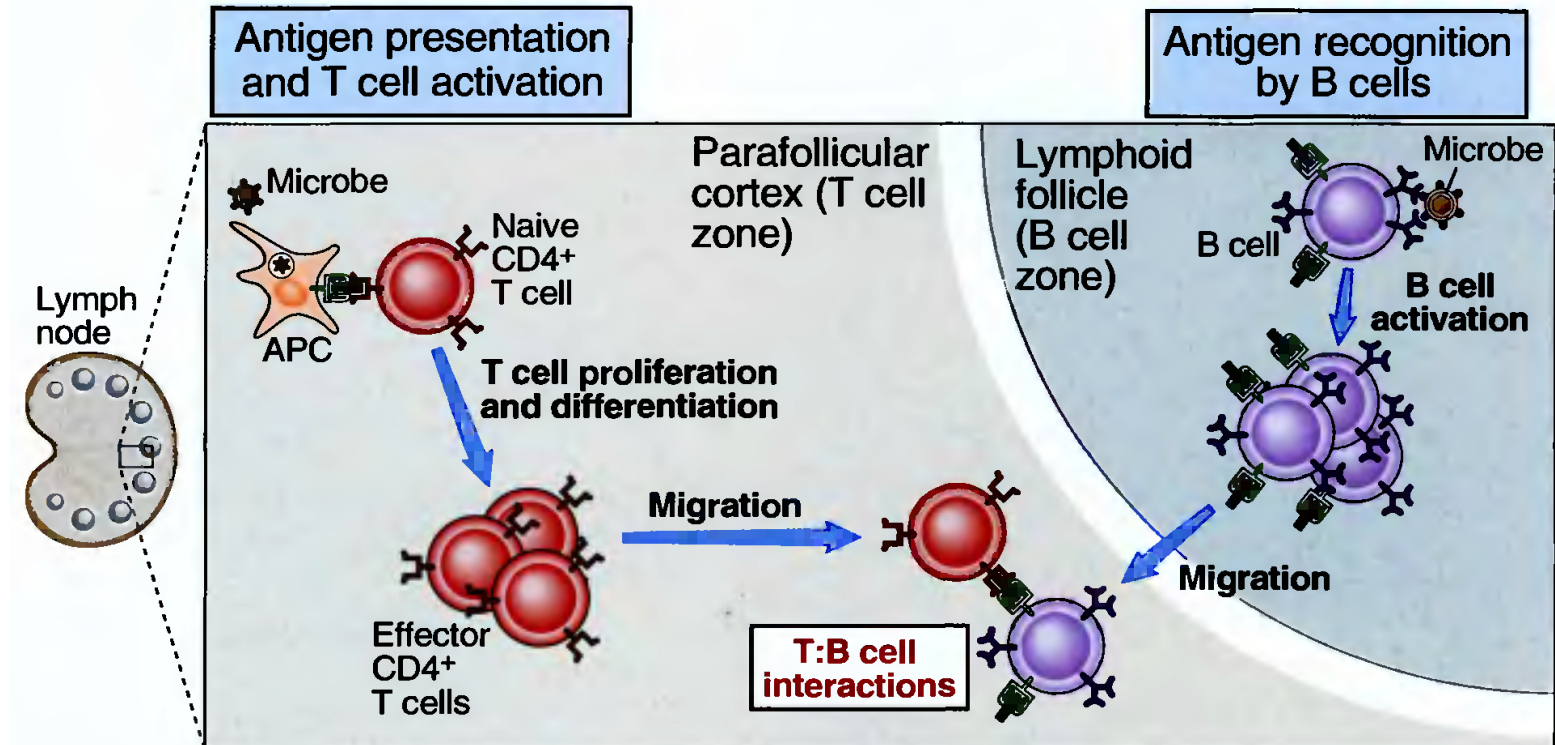


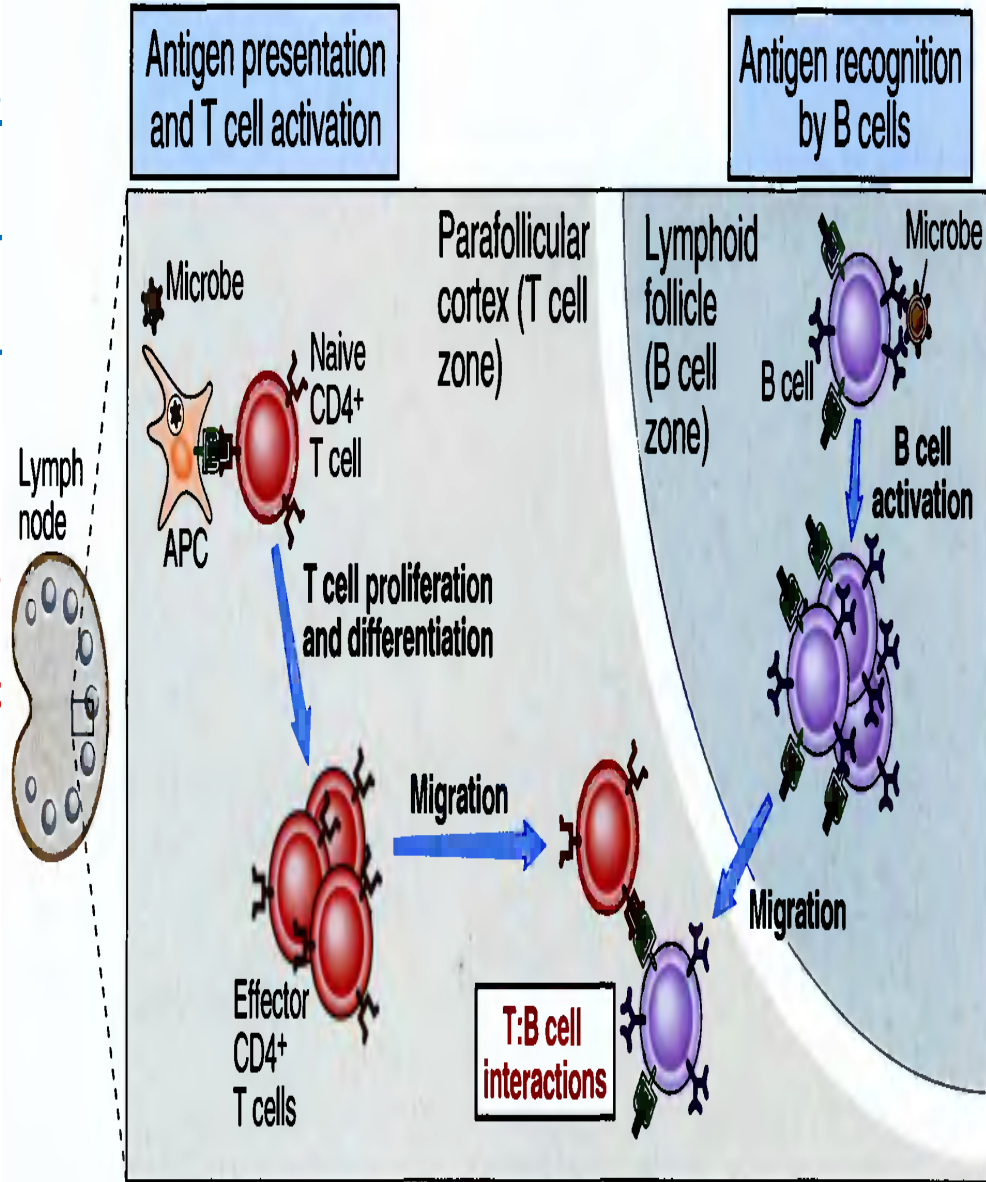
Figure 7-8 Mechanisms of helper T cell-mediated activation of B lymphocytes. Helper T cells recognize peptide antigens presented by B cells and costimulators (e.g., B7 molecules) on the B cells. The helper T cells are activated to express CD40L and secrete cytokines, both of which bind to their receptors on the same B cells and activate the B cells.

Protein Antijenlere verilen h moral imm n yanıtta yardımcı T lenfositlerin rol 

- Protein yapılı bir antijenin antikor yanıtını uyarabilmesi için, o antijene  zg l B lenfositler ve yardımcı T lenfositler lenfoid organlarda bir araya gelmeli ve B hücre  o alması ve farklılaşmasını uyaracak şekilde etkileşmelidir.

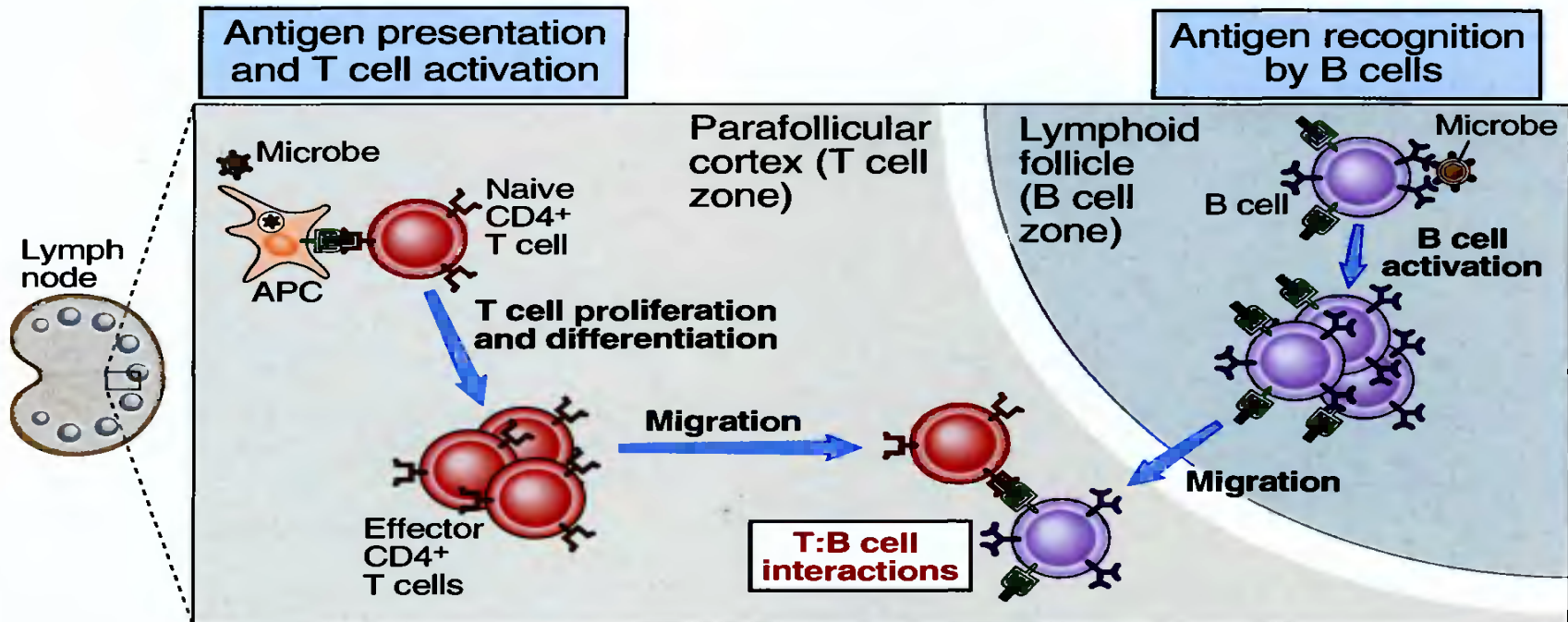


- **Aktive B hücreler,** lenfoid foliküllerde üretilen ve görevi B hücrelerini bu foliküllerde tutmak olan kemokinlerin reseptör ekspresyonlarını azaltır.
- **Bunun sonucunda, aktive B hücreler folikül dışına göç ederek, yardımcı T hücrelerinin yoğun olarak bulunduğu anatomik bölümde toplanırlar.**



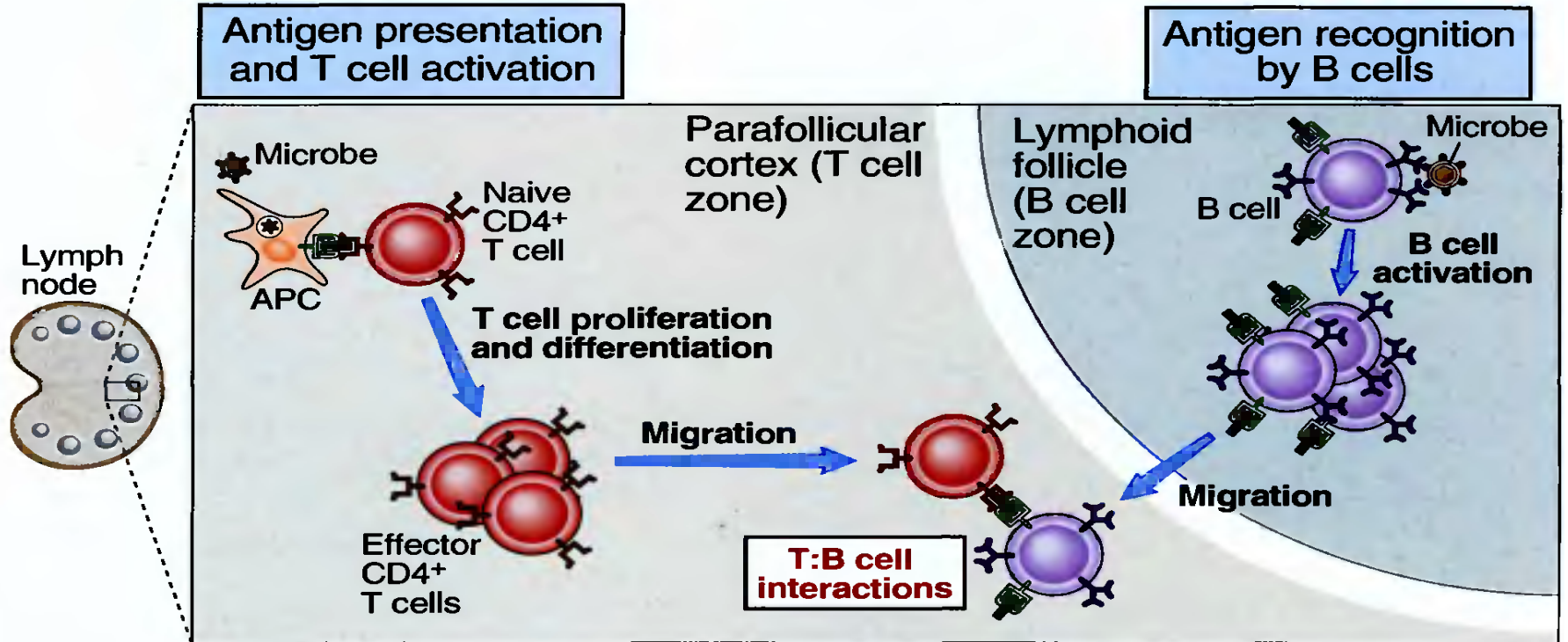
Yardımcı T hücrelerin aktivasyonu ve göçü

- Efektör hücrelere farklılaşmak üzere aktive olan yardımcı T hücreler antijenle uyarılmış **B lenfositlerle periferik lenfoid organlardaki lenfoid foliküllerin kenarlarında etkileşirler.**



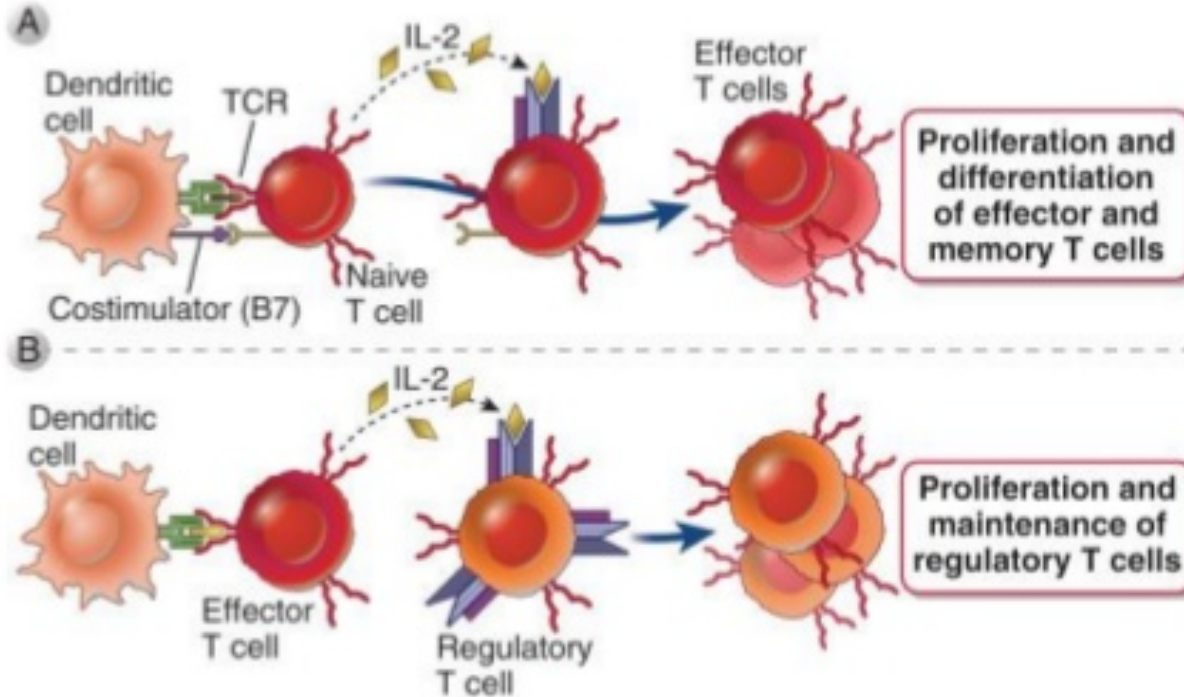
Yardımcı T hücrelerin aktivasyonu ve göçü

- **Naif CD4+ yardımcı T hücreler**, lenfoid organlarda profesyonel antijen sunan hücrelerin (ASH) antijeni tanıması ve sunmasının bir sonucu olarak, sitokin üreten efektör hücrelere farklılaşmak ve çoğalmak üzere uyarılırlar.



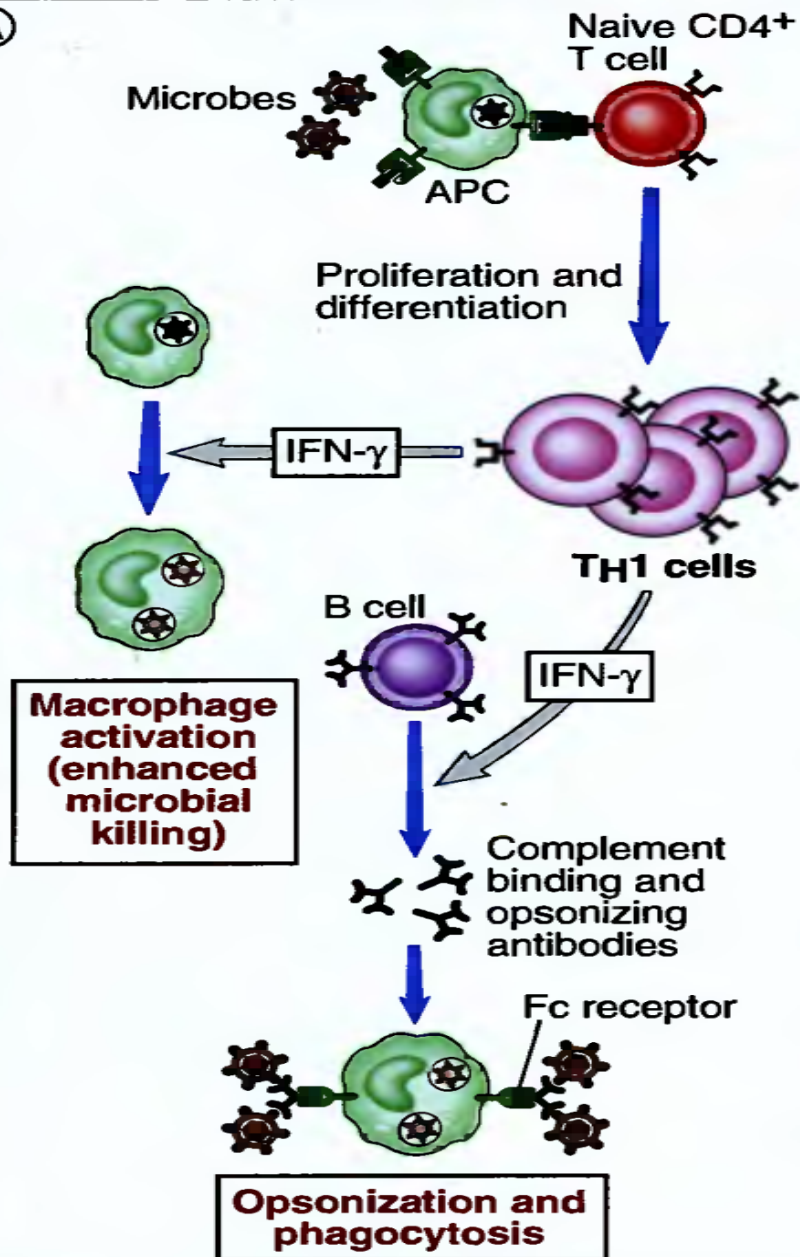
Yardımcı T hücrelerin aktivasyonu ve göçü

Biologic actions of IL-2

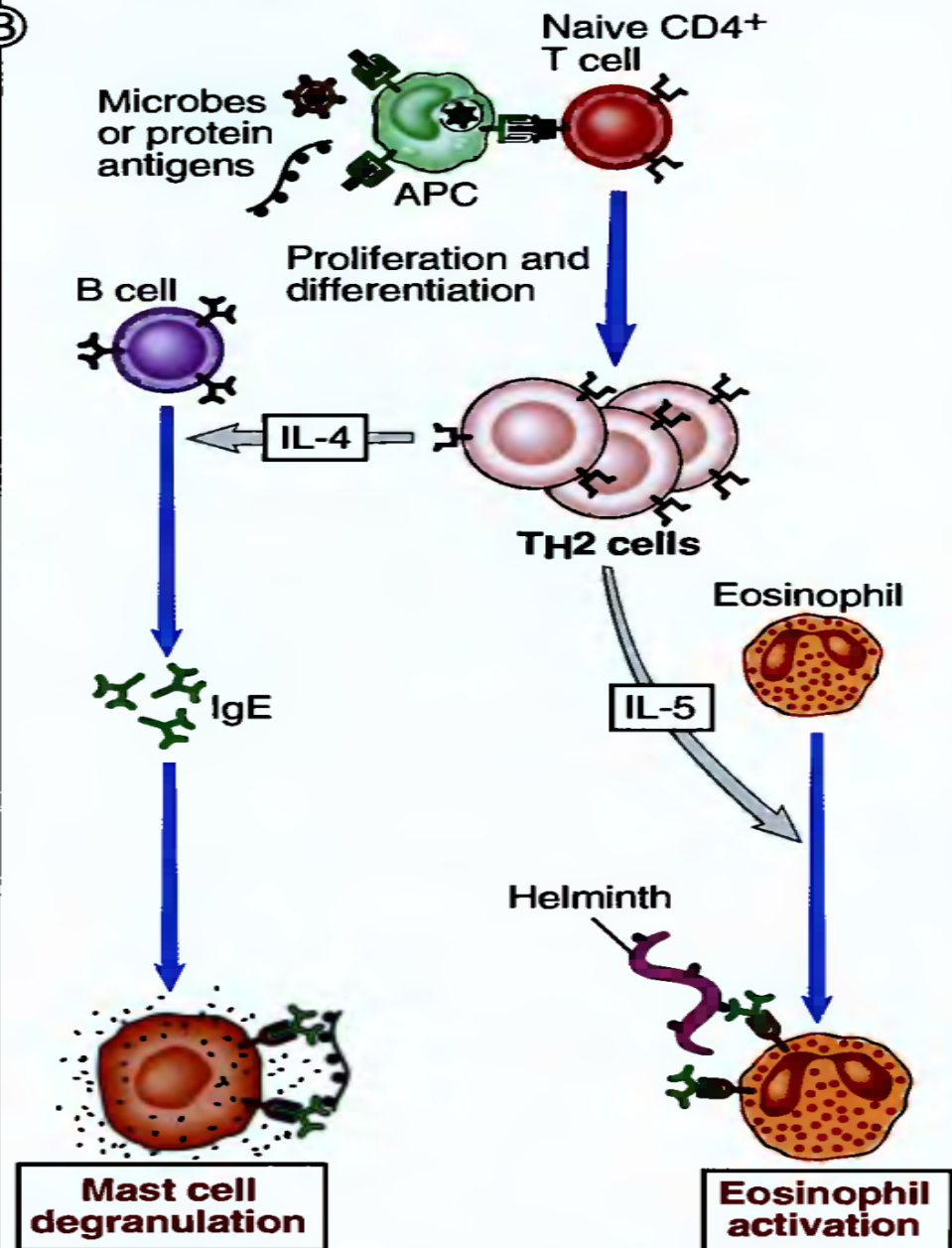


Yardımcı T hücrelerin aktivasyonu ve göçü

A



B

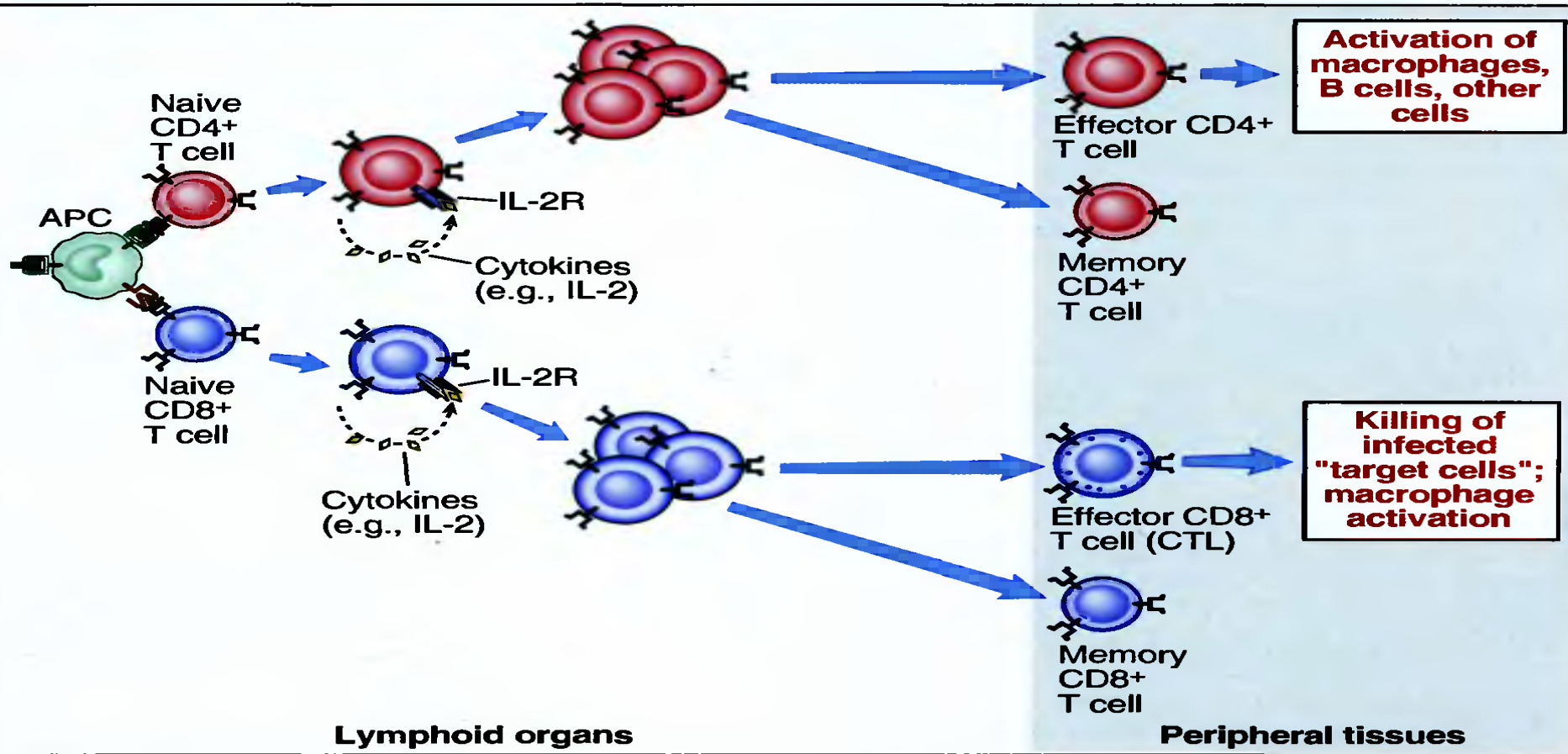


Antigen
recognition

Activation

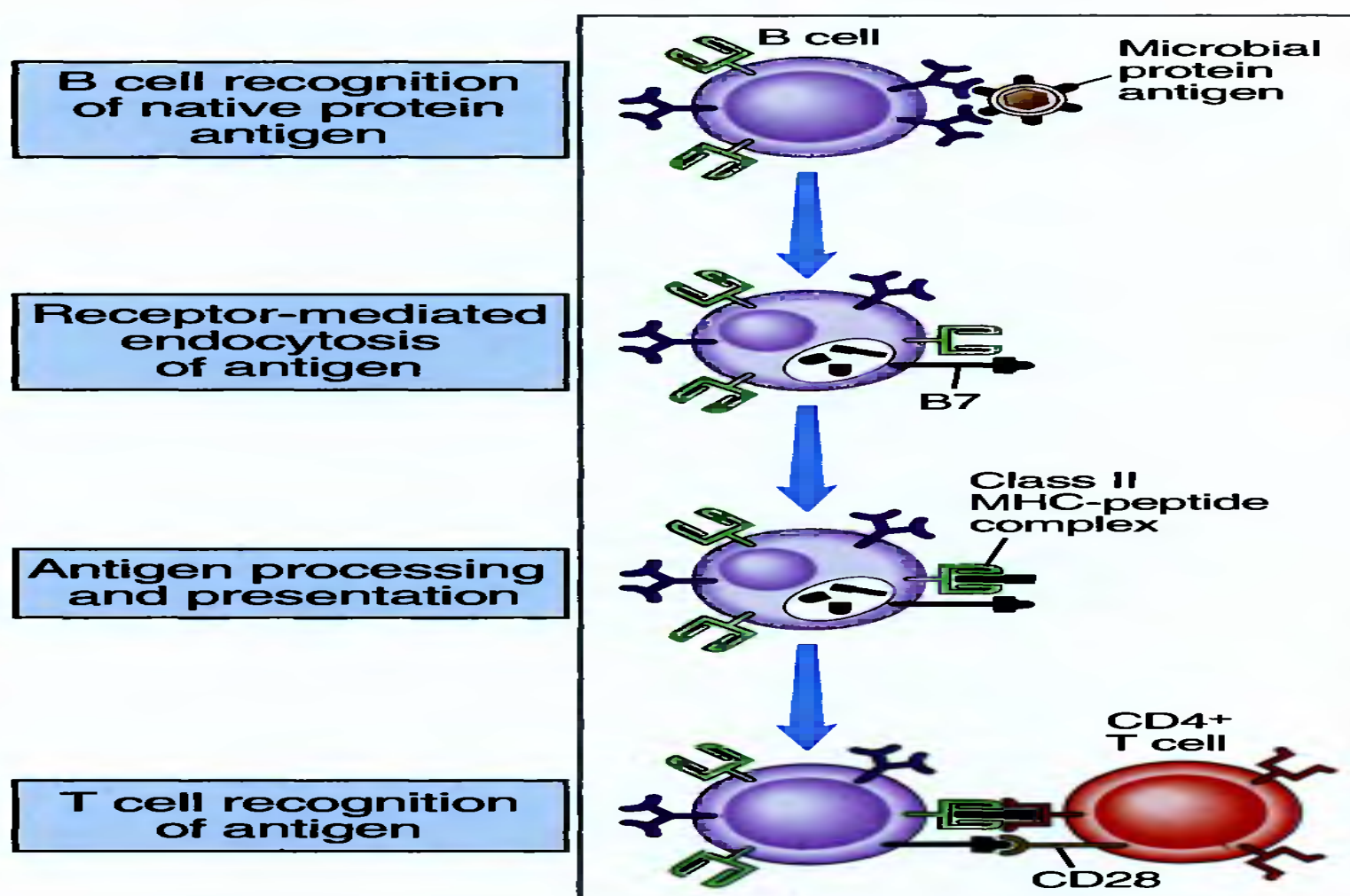
Clonal
expansion

Differentiation

Effector
functions

- Farklılaşmış efektör T hücreler normal konaklama yerlerinin dışına göç ederler. Bu T lenfositlerinin bazıları dolaşıma geçer, uzak bölgelerde mikrobiyal antijenleri bulur ve hücre aracılı immünite yolu ile bu mikroorganizmaları ortadan kaldırır.

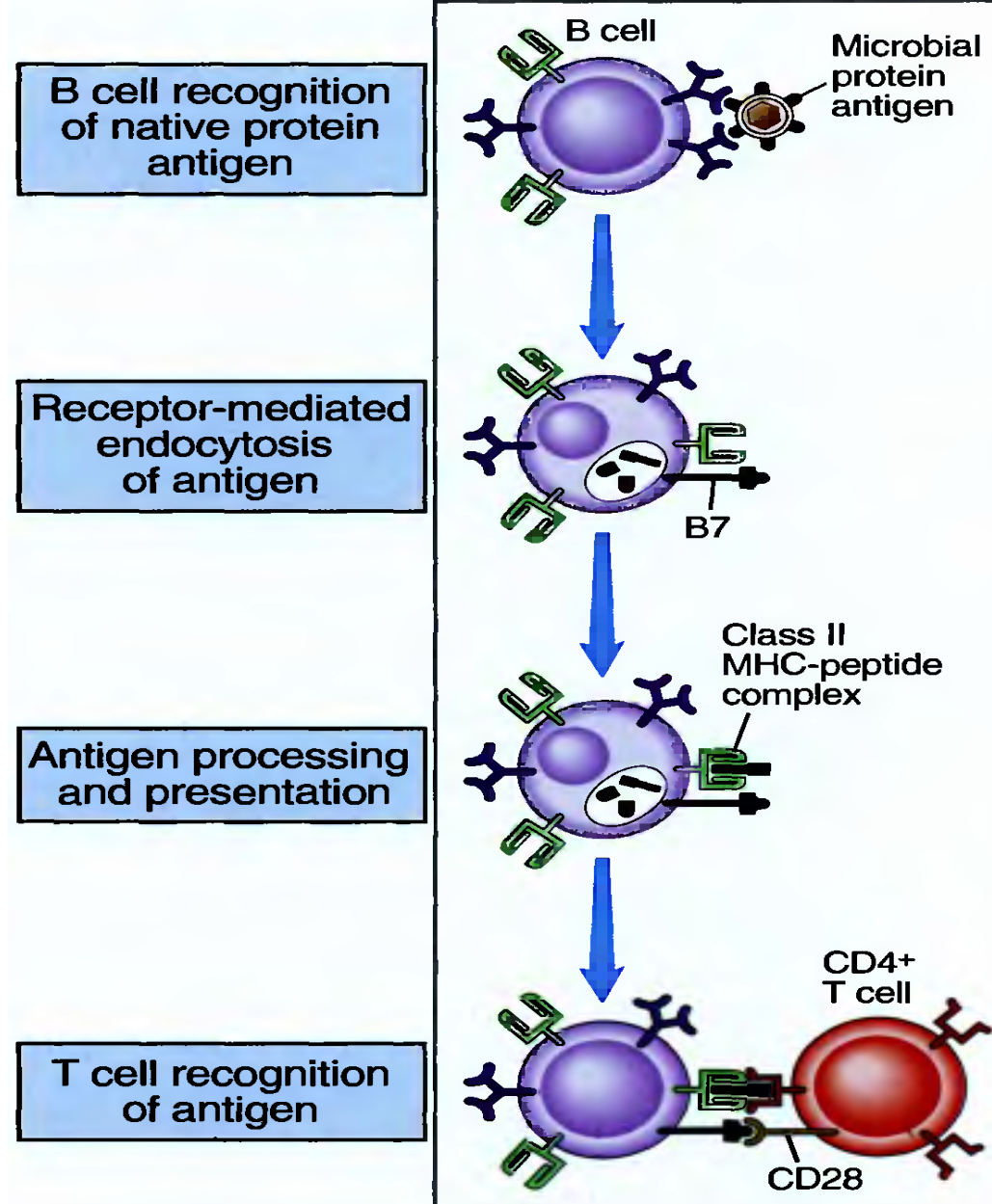
Antijenlerin B lenfositleri tarafından yardımcı T hücrelerine sunulması



Antijenlerin B lenfositleri tarafından yardımcı T hücrelerine sunulması

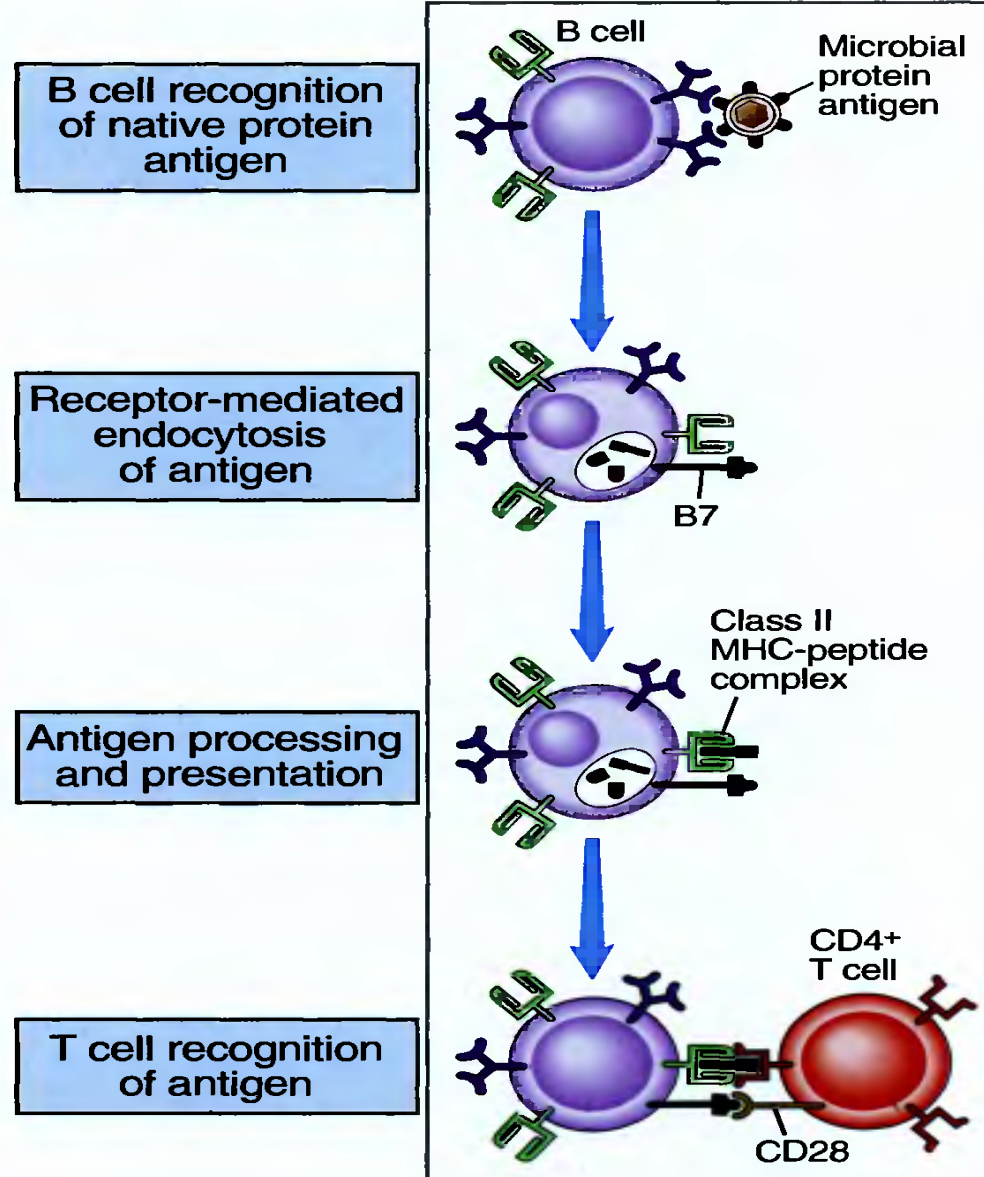
- B hücreler, özgül olarak tanıdıkları antijenler için çok etkin ASH'lerdir.

- Herhangi bir B hücresi, protein yapılı bir antijenin bir epitopuna bağlanır, içine alıp işler ve T hücresinin tanınması için bu proteine ait çeşitli peptidleri yüzeyinde eksprese eder.



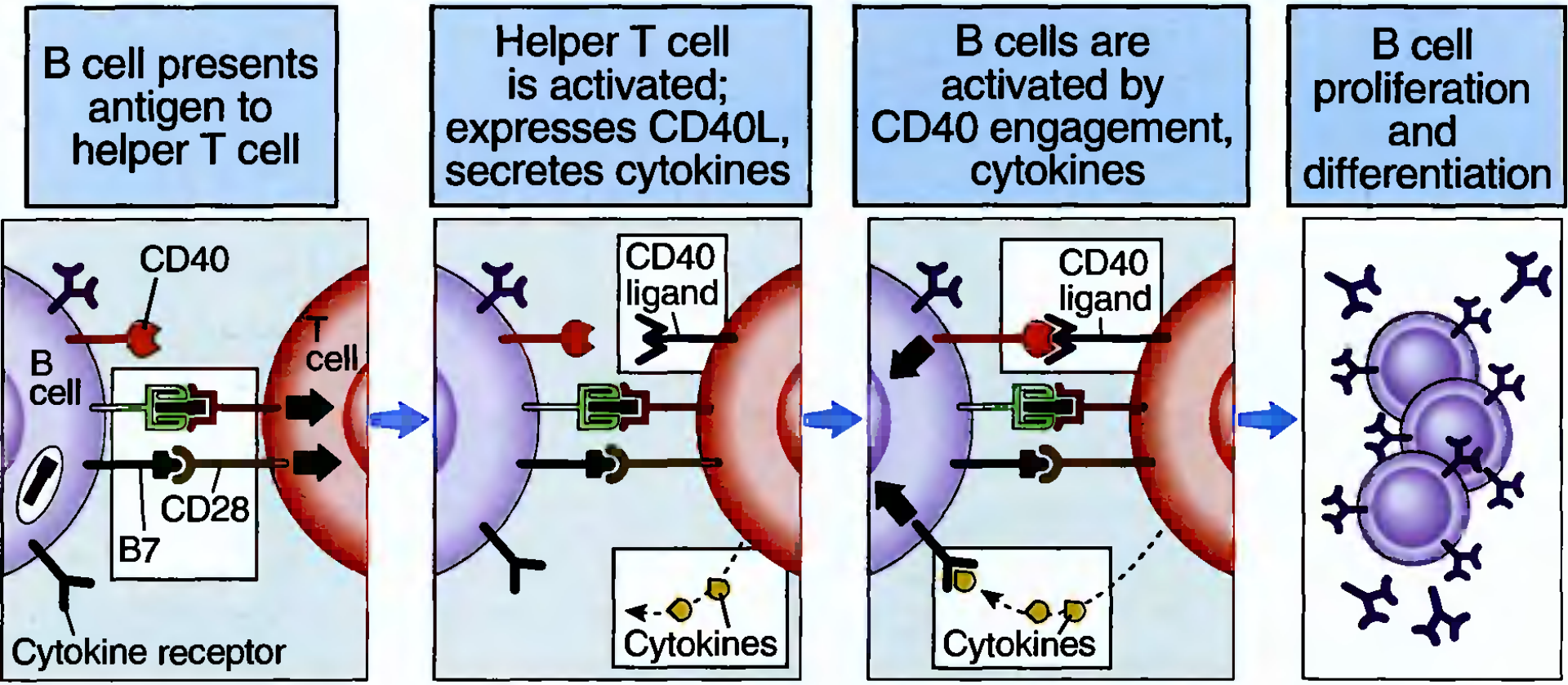
Antijenlerin B lenfositleri tarafından yardımcı T hücrelerine sunulması

- Antijenin aktive ettiği B lenfositler B7 molekülleri gibi eş uyarıcılar eksprese ederek,
- B hücrelerin eksprese ettiği antijeni tanıyan yardımcı T hücrelerini uyarır.



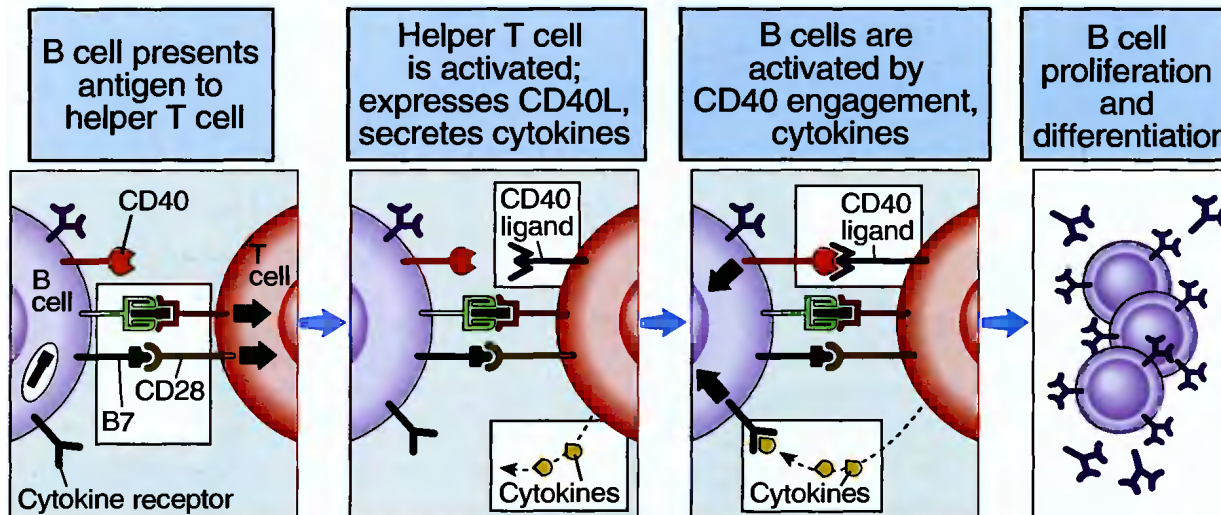
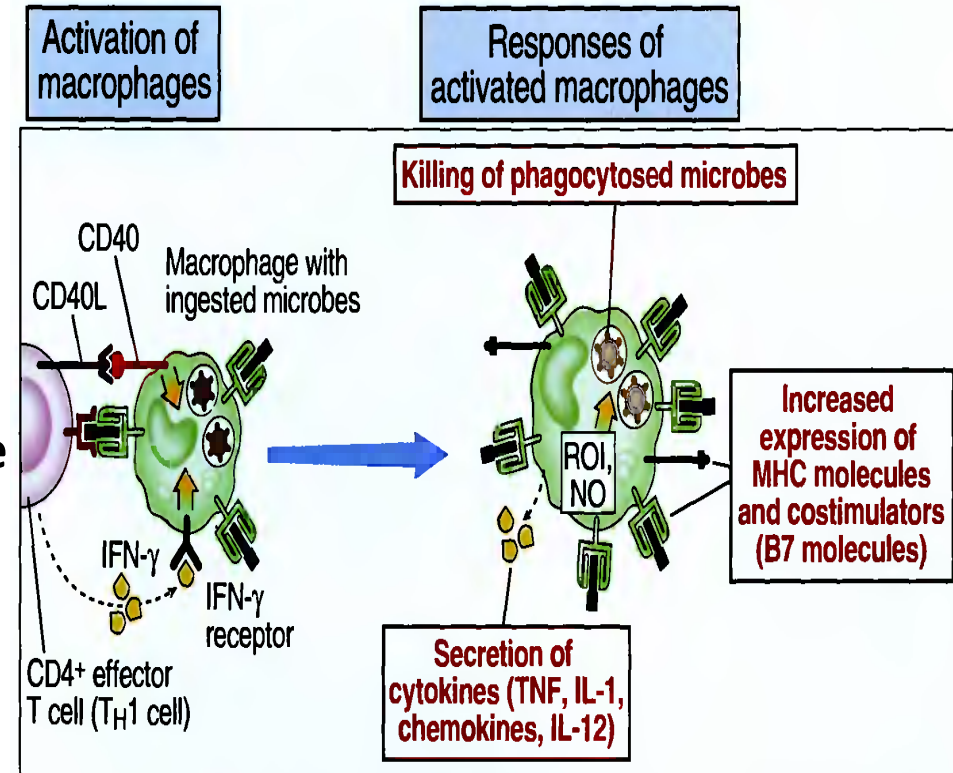
Yardımcı T hücreler Aracılığıyla B hücrelerin aktivasyon mekanizmaları

- B hücrelerinin sunduğu antijeni tanıyan yardımcı T hücreleri, yüzeylerinde **CD40 ligand (CD40L)** eksprese ederek ve sitokin salgılayarak B hücrelerini aktive ederler.

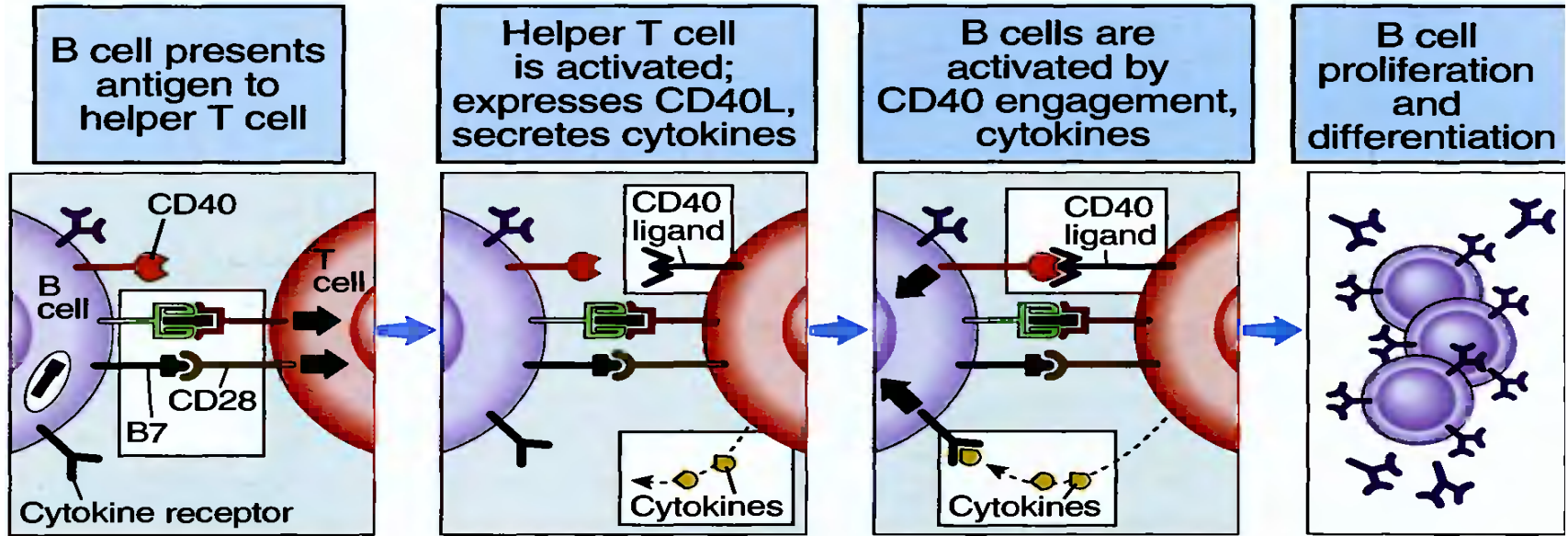


Yardımcı T hücreler Aracılığıyla B hücrelerin aktivasyon mekanizmaları

- Yardımcı T hücre aracılı B lenfosit aktivasyonu
- T hücre aracılı makrofaj aktivasyonu ile benzerlik gösterir.



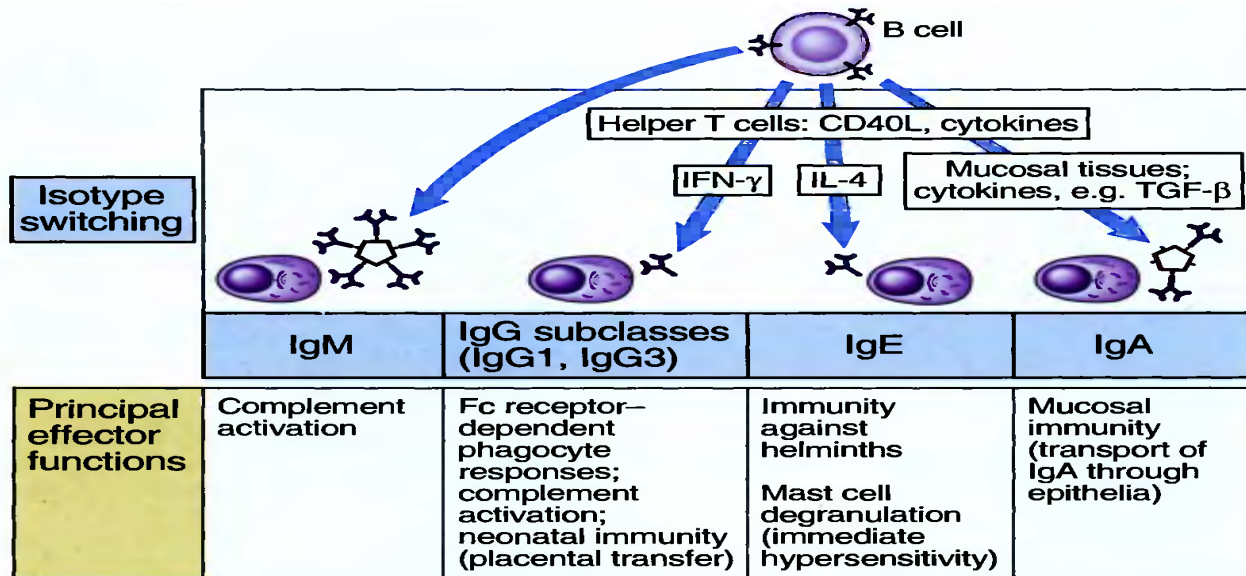
Yardımcı T hücreler Aracılığıyla B hücrelerin aktivasyon mekanizmaları



- Aynı esnada, yardımcı T hücrelerinin ürettiği sitokinler B lenfositleri üzerindeki sitokin reseptörlerine bağlanarak daha fazla B hücre çoğalmasını ve antikor üretimini uyarır. CD40L- CD40 etkileşimi T ve B lenfositlerin yalnızca fiziksel temas yolu ile antikor üretebilecek aşamaya gelebileceklerini gösterir.

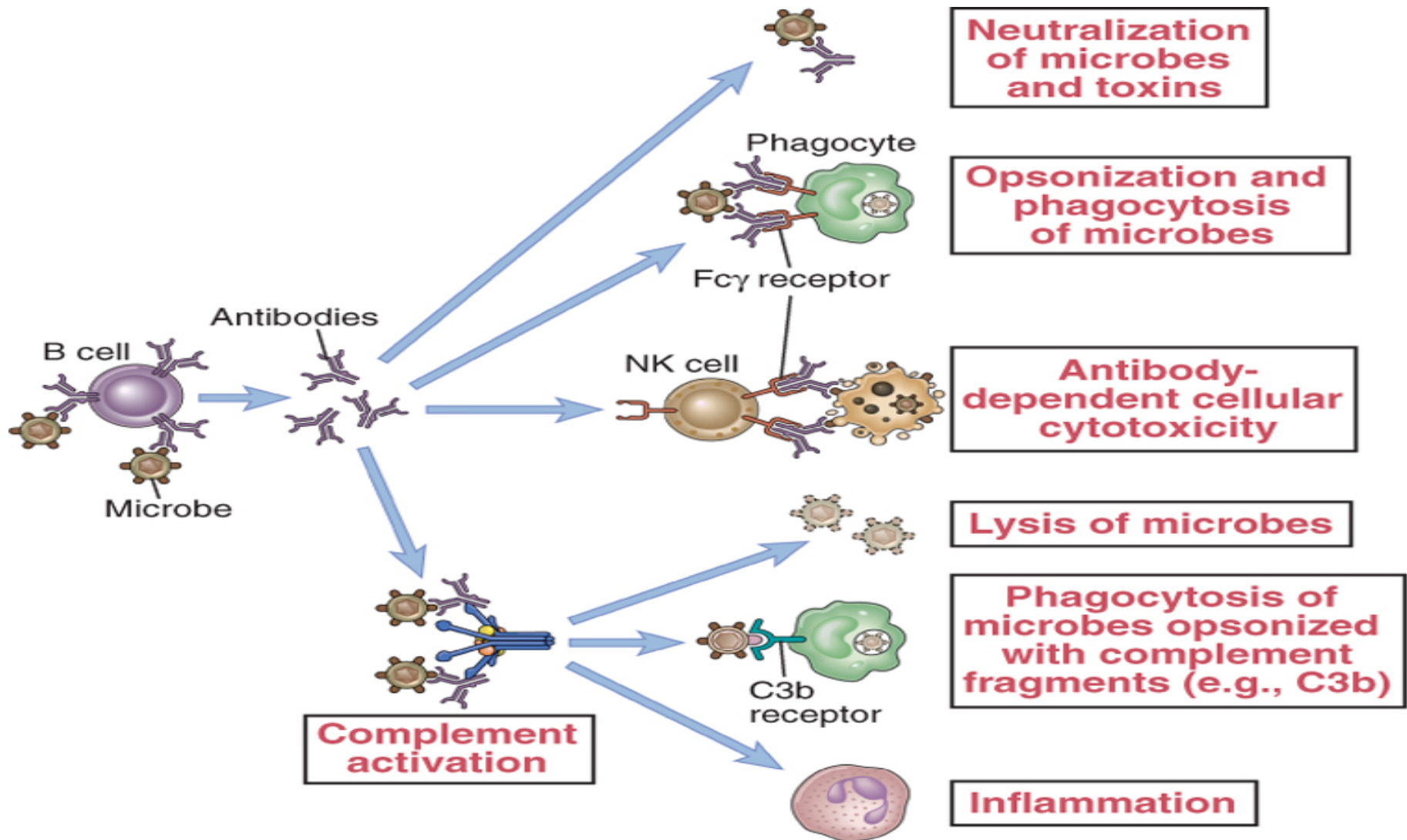
Ağır zincir sınıf (izotip) dönüşümü

- **Yardımcı T hücreleri** farklı ağır zincir sınıflarından (izotipler) antikorlar üretecek olan **IgM+IgD eksprese eden B lenfositlerini uyarırlar.**



- İzotip dönüşümünün önemi; hümmoral immün yanıtların değişik mikroorganizmalarla en elverişli şekilde mücadele etmeye uygun hale gelmesini sağlamasıdır.

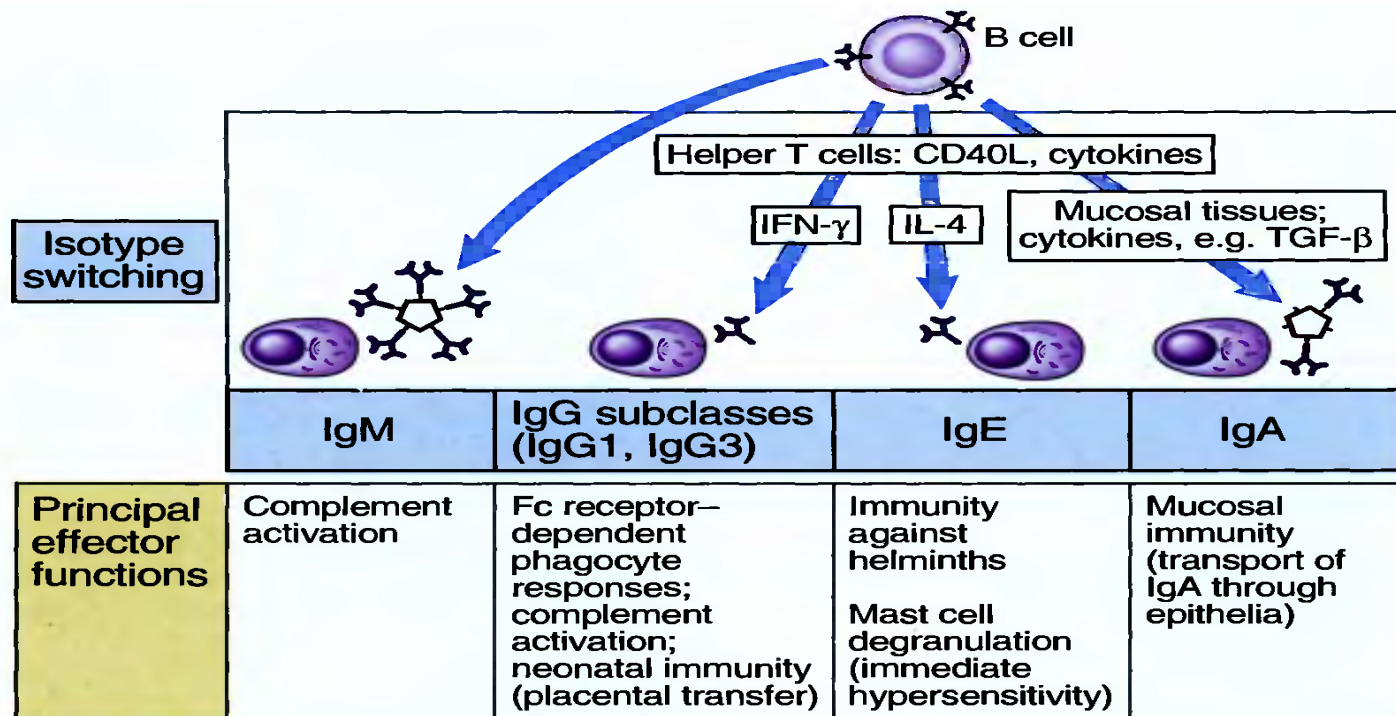
Ağır zincir sınıf (izotip) dönüşümü



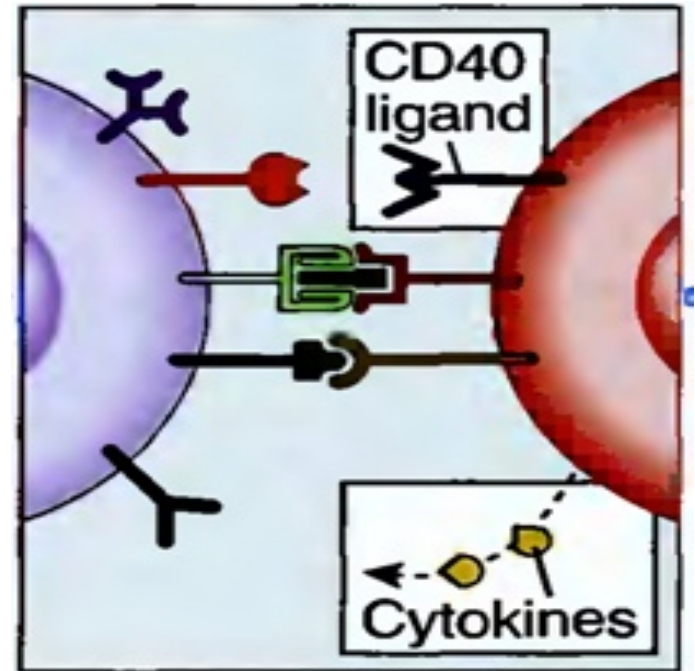
Ağır zincir sınıf (izotip) dönüşümü

- Ağır zincir izotip dönüşümü CD40- aracılı sinyallerle başlatılır ve farklı Ig izotiplerine dönüşümü değişik sitokinlerle uyarılır.

CD40L ve sitokinlerin aracılık ettiği sinyaller aktive B hücrelerini etkileyerek izotip dönüşümünü tetikler.



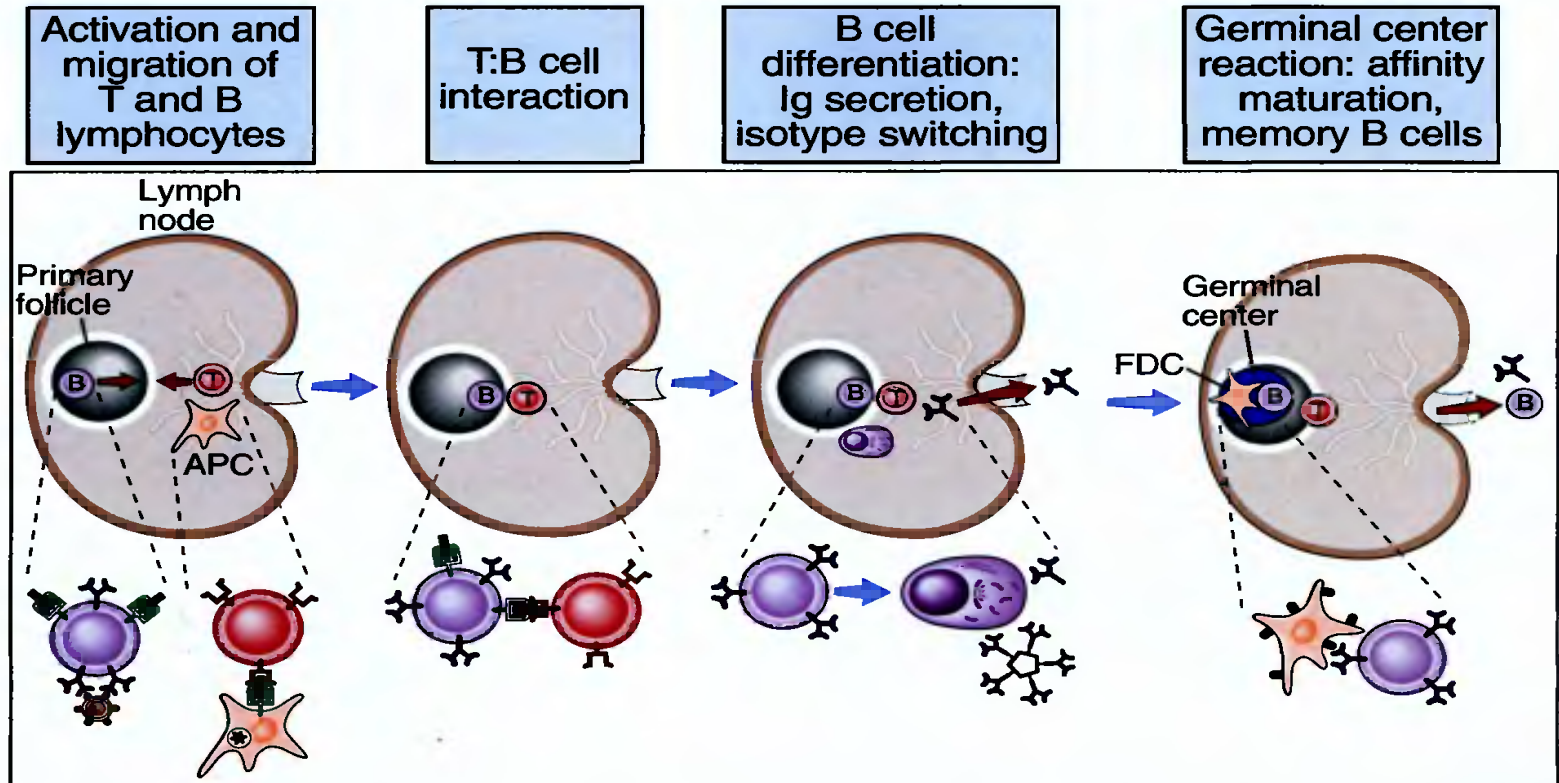
- CD40 veya CD40L yokluğunda, B hücrelerinin yalnızca IgM salgılaması ve diğer izotiplere dönüşüm yapamaması, izotip dönüşümünde de reseptör-ligand çiftinin ne denli gerekli olduğunu göstermektedir.

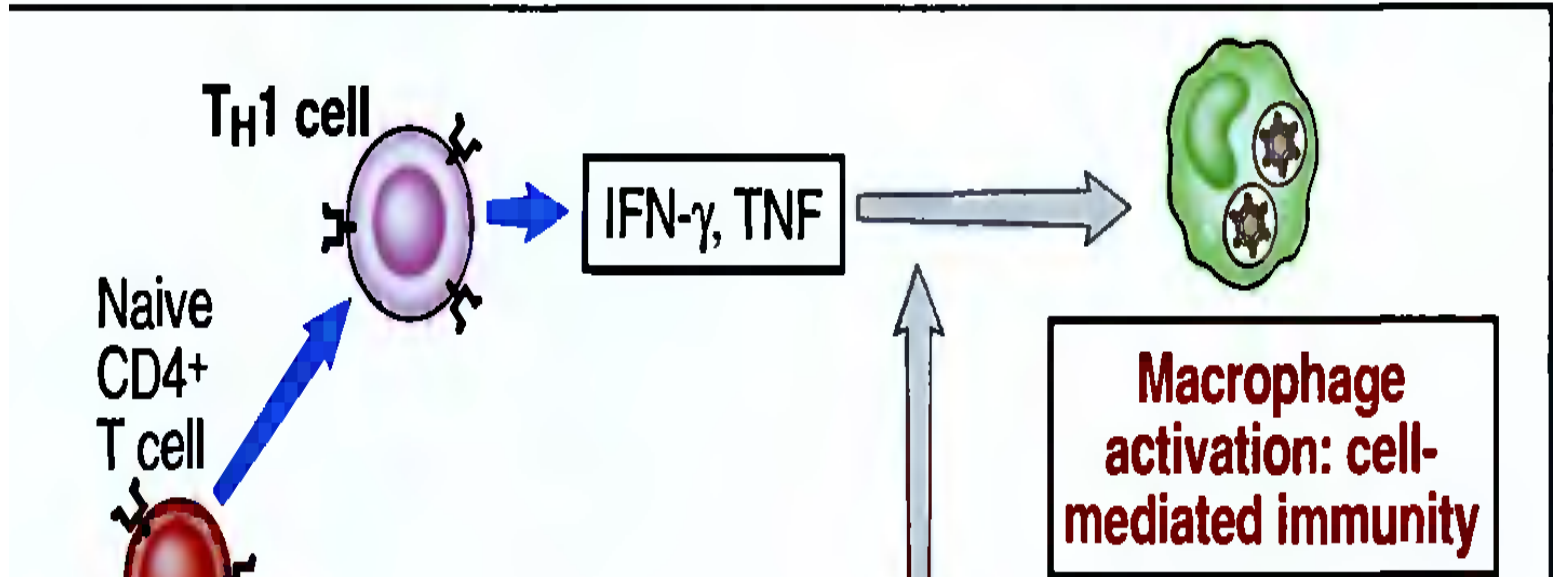


X'e bağılı hiper IgM sendromu

- X kromozomunda yer alan CD40L geninde inaktivasyona yol açan mutasyonların neden olduğu hastalığa **X'e bağılı hiper IgM sendromu** adı verilmektedir.
- Bu hastalıkta ağır zincir dönüşümü yapılamadığından, serum antikorlarının çoğu IgM yapısındadır.

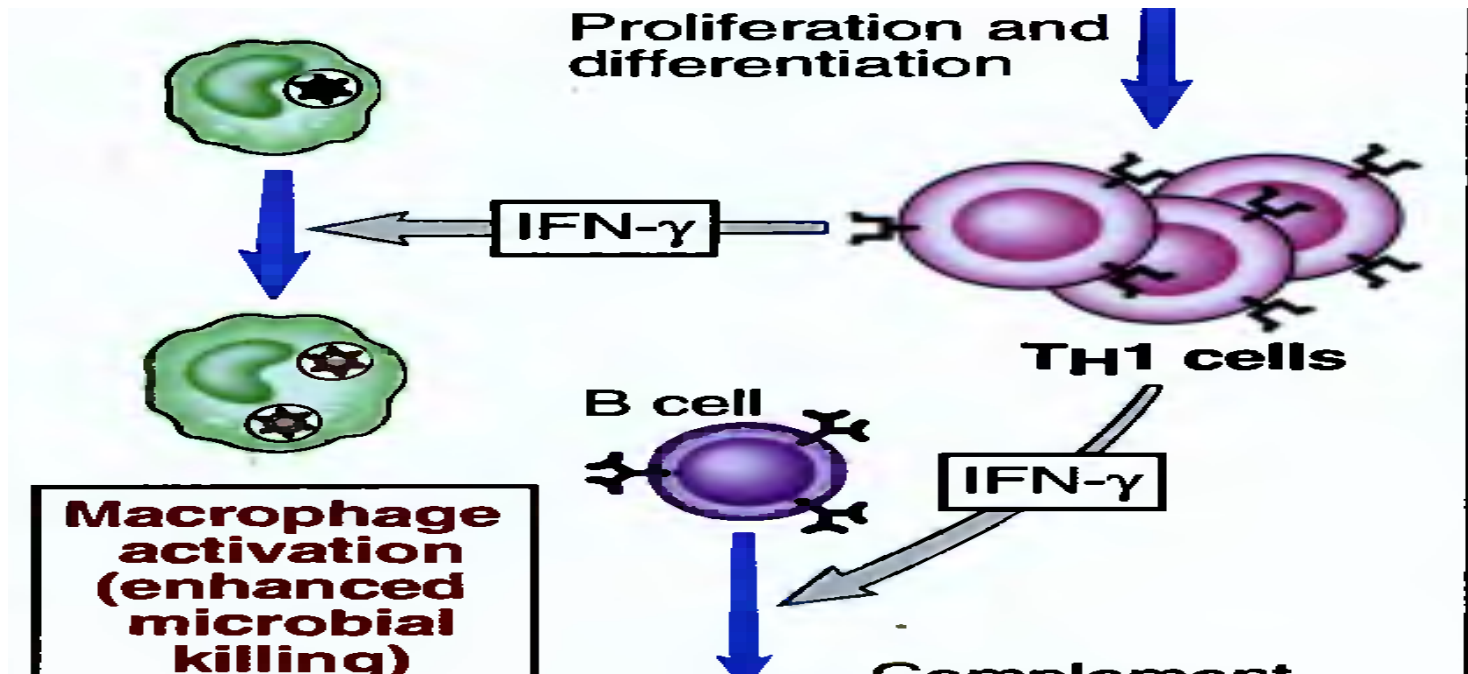
- CD40L, T hücre aracılı immünyetede önemli rol oynadığından hastaların hücre içi mikroorganizmalara verdiği hücresel immün yanıt da bozuktur. Bir B hücrelerinden hangi ağır zincir izotipine dönüşüm yapılacağını sitokinler belirler.



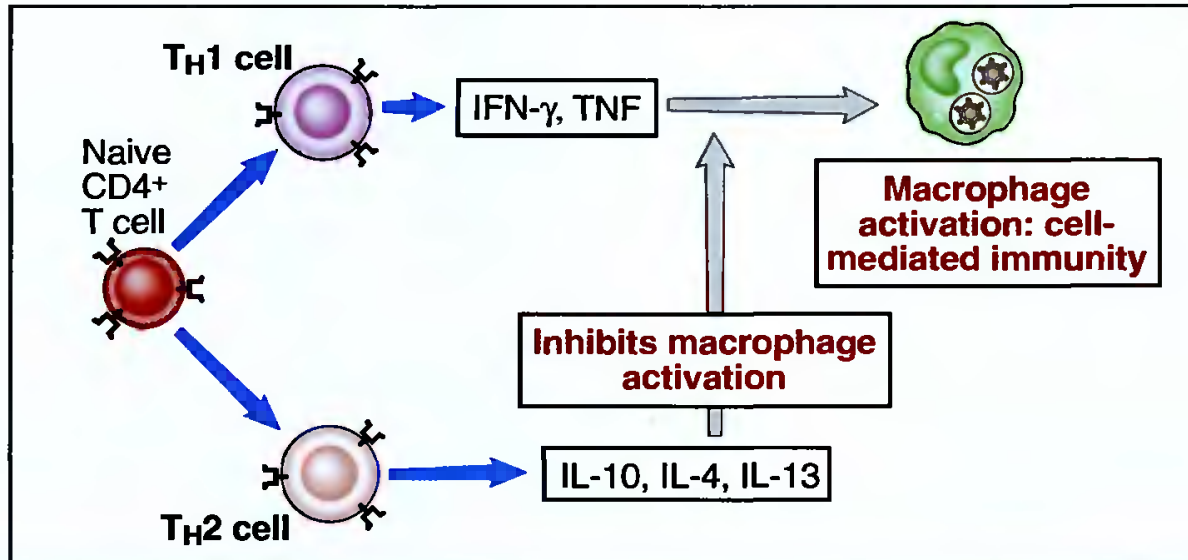


- Örneğin fagosit FC reseptörüne bağlanan opsonin yapısındaki antikorların üretimi Th1 hücrelerin anahtar sitokini olan interferon-γ (IFN-γ) tarafından uyarılır.

- Opsonin özelliği taşıyan antikorlar fagositozu destekler. IFN- γ aynı zamanda fagositer hücreleri aktive eden sitokindir ve fagositlerin mikrobisidal fonksiyonlarını uyarır. . IFN- γ , hem B hücreleri hem de fagositer hücreler üzerinde etkinliği olan bir sitokindir.

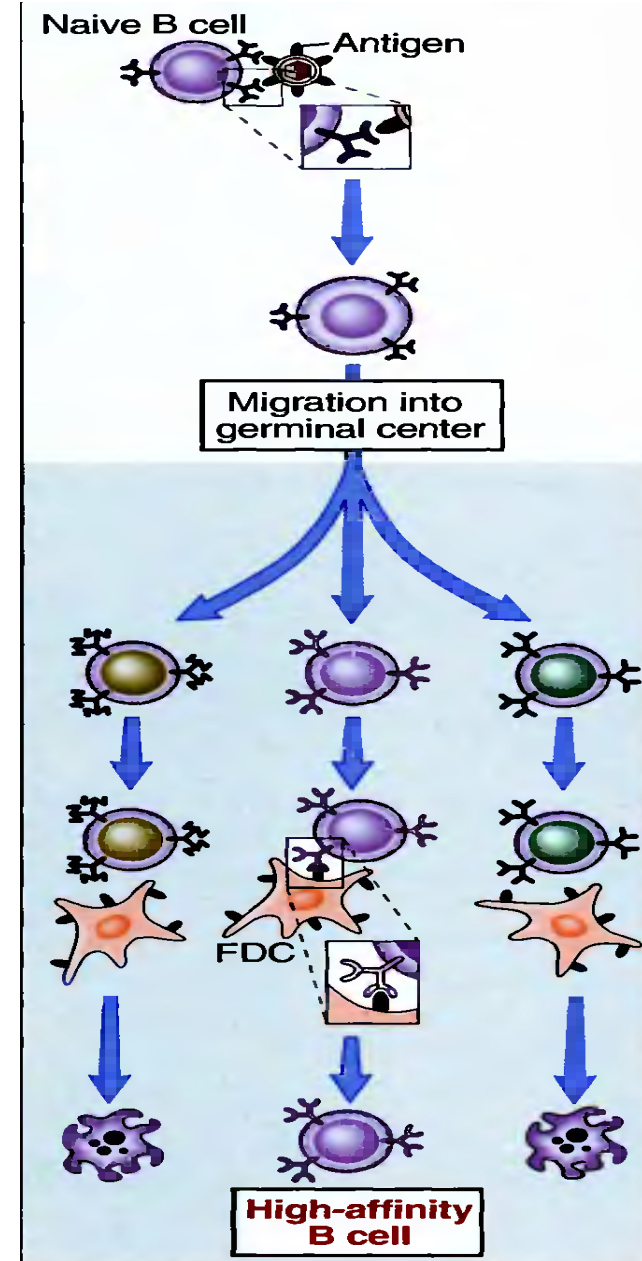


- **Bakteri ve virüs** yapısındaki mikroorganizmaların çoğu, kendilerini en iyi şekilde elimine eden efektör mekanizma olan **Th1** yanıtlarını aktive ederler.
- **IgE izotipine dönüşüm ise Th2 hücrelerin anahtar sitokini olan interlökin IL-4 tarafından uyarılır.**



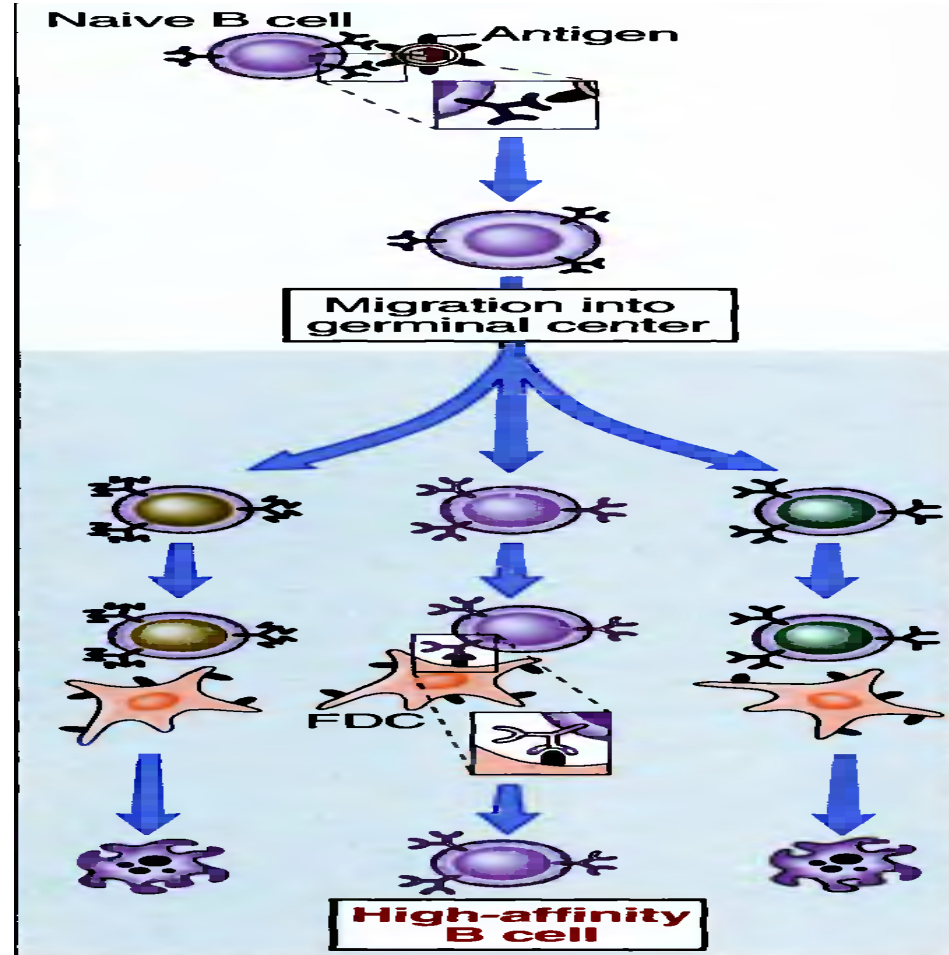
Afinite olgunlaşması

- Afinite olgunlaşması protein yapısındaki bir antijene karşı üretilen antikorların afinitelerinin, o antijenle uzamış veya tekrarlayan karşılaşmalar ile artması sürecidir.
- Afinite olgunlaşması sebebiyle antikorların bir mikroorganizmaya veya mikrobiyal antijene bağlanma yeteneği enfeksiyon inatçı veya tekrarlayıcı ise artar

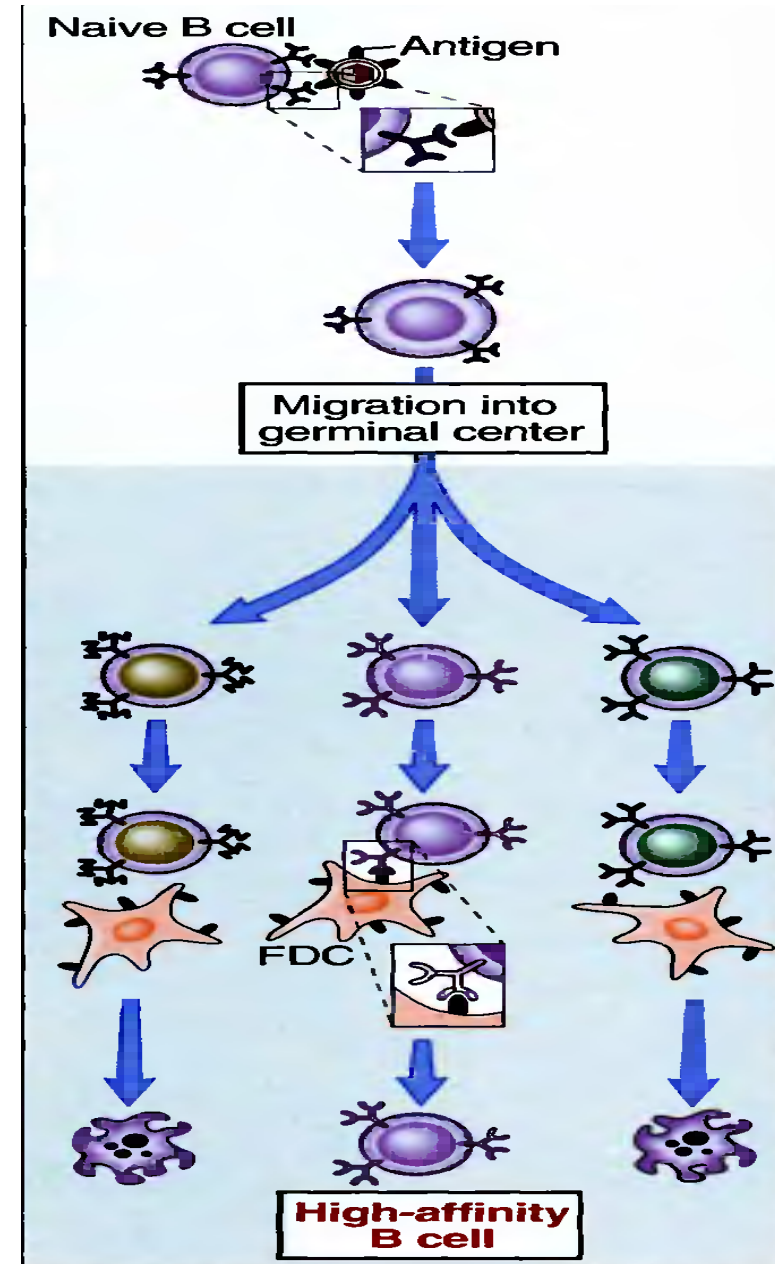


Afinite olgunlaşması

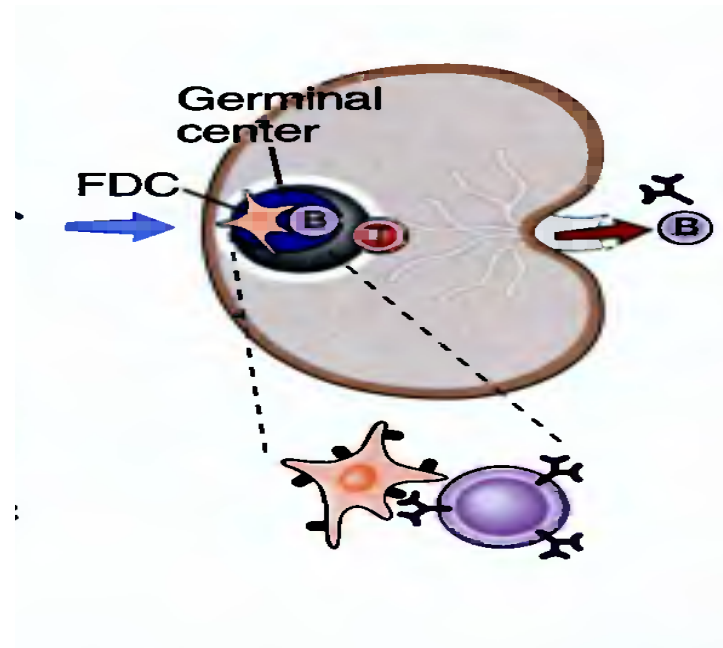
- Afinite olgunlaşması yalnızca protein yapısındaki antijenler aracılığıyla ve **yardımcı T hücre-bağımlı** olarak gelişen immün yanıtta görülür.



- Afinite olgunlaşması lenfoid foliküllerin germinal merkezlerinde meydana gelir. Foliküler dendritik hücrelerin sunduğu antijen tarafından seçilen yüksek afiniteli B hücrelerinde Ig genlerinin somatik hipermutasyonu sonucu gerçekleşir.

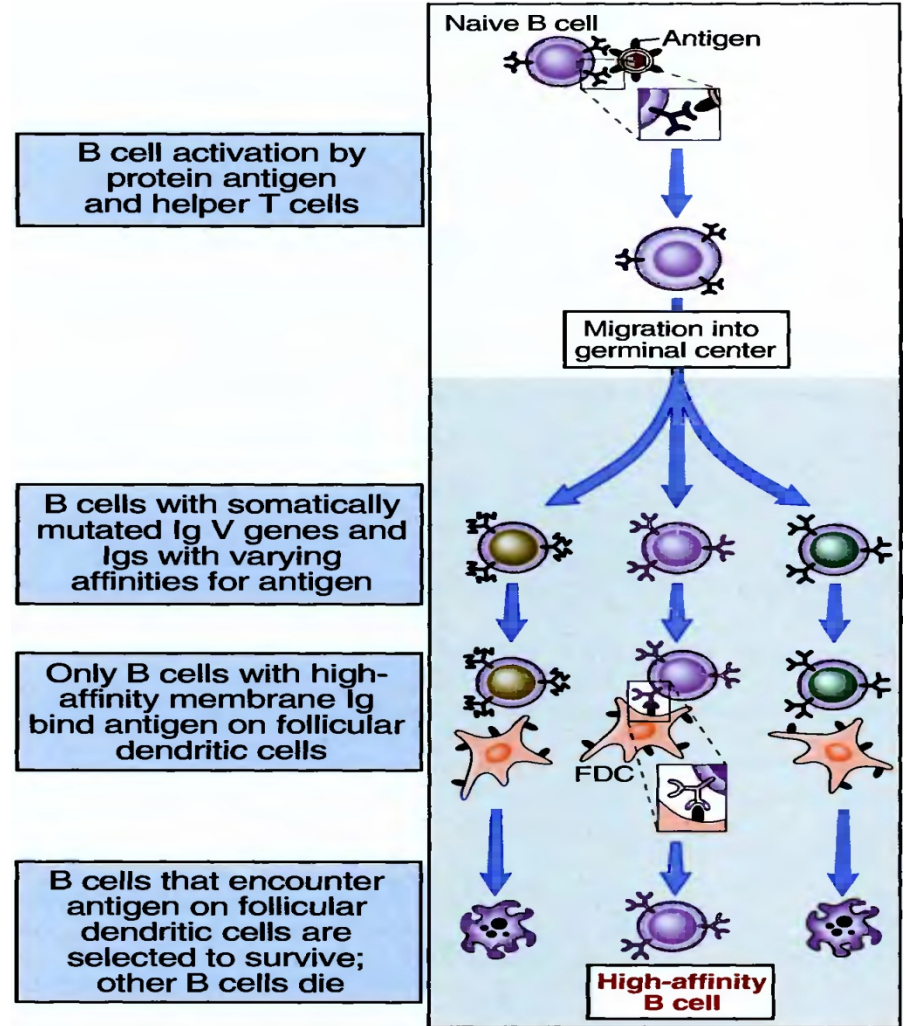


- Böylece, somatik hipermutasyona yönelen B hücreleri foliküler dendritik hücreler üzerindeki antijene bağlanma fırsatı bularak ölümden kurtulurlar.



- İmmün yanıt geliştikçe ya da aynı antijenle tekrarlanan karşılaşmalar (tekrarlanan bağışıklama) sonucunda üretilen antikor miktarı artar.

- **B hücrelerinin ürettikleri antikorlar periferik kana geçer.** Antikor salgılayan **plazma hücrelerinin bazıları** ise kemik iliğine göç eder, burada aylarca yıllarca yaşayabilir ve antijen ortadan kaldırıldıktan sonra bile antikor üretmeye devam ederler.

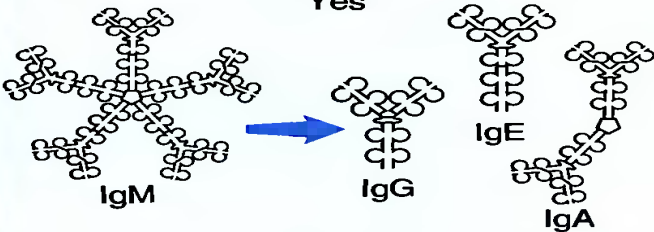
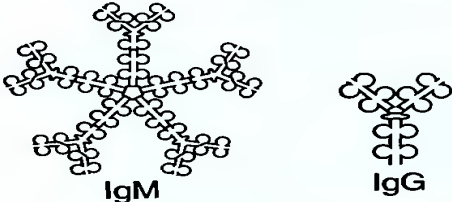


Bellek B hücreleri

- Bellek B hücreleri antikor salgılamazlar, antijenle ilk karşılaşma olmadıkça dolaşımda kalıp, aylarca-yıllarca yaşarlar. Antijenle tekrar karşılaşıldığında hızla yanıt vermeye hazırdırlar.

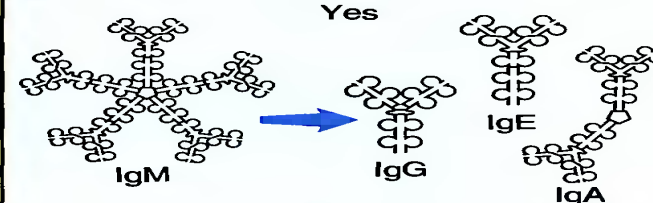
T bağımsız antijenlere antikor yanıtları

- Polisakkarid, lipid ve diğer protein olmayan antijenler yardımcı T hücrelerinin katılımı olmaksızın antikor yanıtları oluştururlar.

	Thymus-dependent antigen	Thymus-independent antigen
Chemical nature	Proteins 	Polymeric antigens, especially polysaccharides; also glycolipids, nucleic acids 
Features of antibody response		
Isotype switching	Yes 	Little or no: may be some IgG 
Affinity maturation	Yes	Little or no
Secondary response (memory B cells)	Yes	Only seen with some antigens

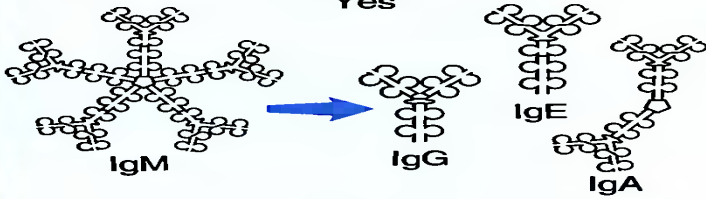
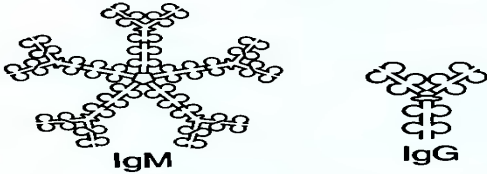
T bağımsız antijenlere antikor yanıtları

- Polisakkarid ve lipid yapıları antijenler sıklıkla aynı epitopun multivalan (çoklu değerli) düzenlerini içermesi sebebiyle bu antijenlerin özgül bir B hücreindeki çoğu antijen reseptörü ile çapraz bağlanabildiği düşünülmektedir.

	Thymus-dependent antigen	Thymus-independent antigen
Chemical nature	Proteins 	Polymeric antigens, especially polysaccharides; also glycolipids, nucleic acids 
Features of antibody response		
Isotype switching	Yes 	Little or no: may be some IgG 
Affinity maturation	Yes	Little or no
Secondary response (memory B cells)	Yes	Only seen with some antigens

T bağımsız antijenlere antikor yanıtları

- Çapraz bağlanma B hücrelerini T hücre yardımına ihtiyaç olmaksızın ve farklılaşma-çoğalma yaratmaya yetecek şekilde aktive edebilir.

	Thymus-dependent antigen	Thymus-independent antigen
Chemical nature	Proteins 	Polymeric antigens, especially polysaccharides; also glycolipids, nucleic acids 
Features of antibody response		
Isotype switching	Yes 	Little or no: may be some IgG 
Affinity maturation	Yes	Little or no
Secondary response (memory B cells)	Yes	Only seen with some antigens

Hümmoral immün yanıtların kontrolü: antikör geribildirimi

- B lenfositlerin bir kısmı antikör salgılayan hücrelere ve bellek hücrelerine farklılaştıktan sonra uzun süre yaşarlar.
- Aktive B hücrelerinin çoğu ise muhtemelen **programlı hücre ölümü** süreciyle yok olur. Aktive B hücrelerinin bu ilerleyen kaybı hümmoral immün yanıtın fizyolojik olarak azalmasını sağlar.

ANTIBODY FEEDBACK: REGULATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSES BY Fc RECEPTORS

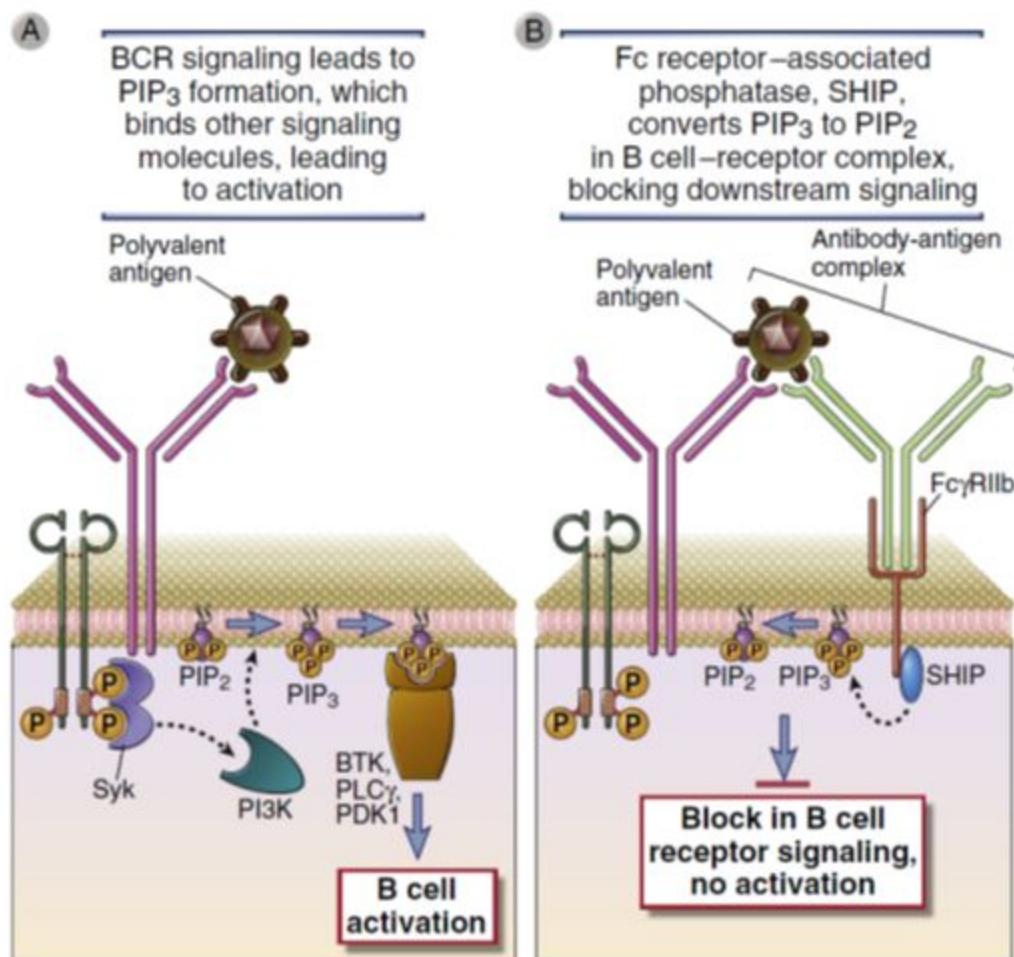
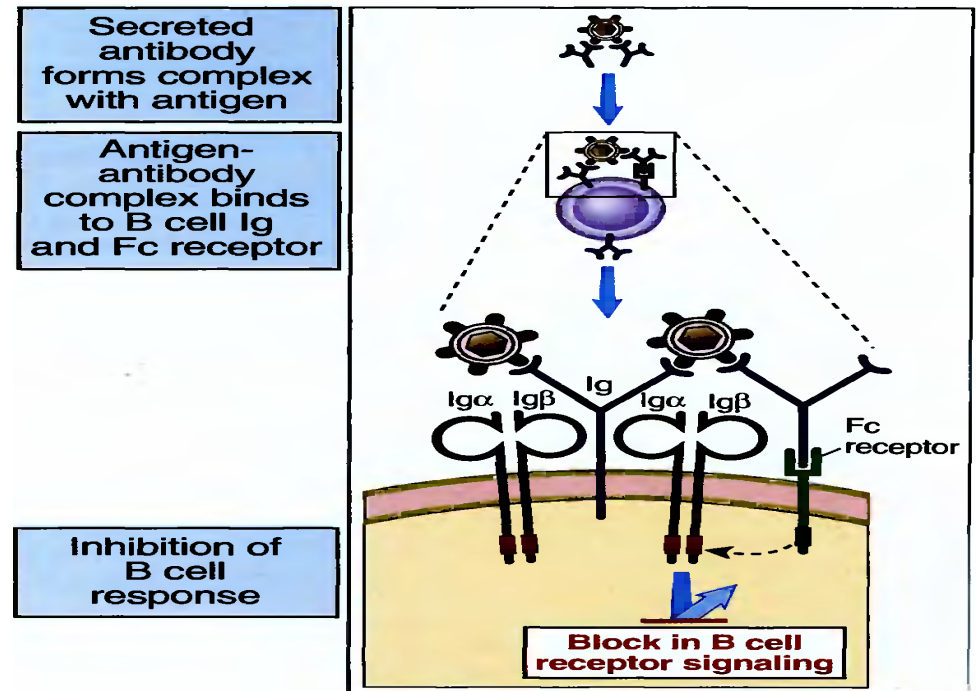
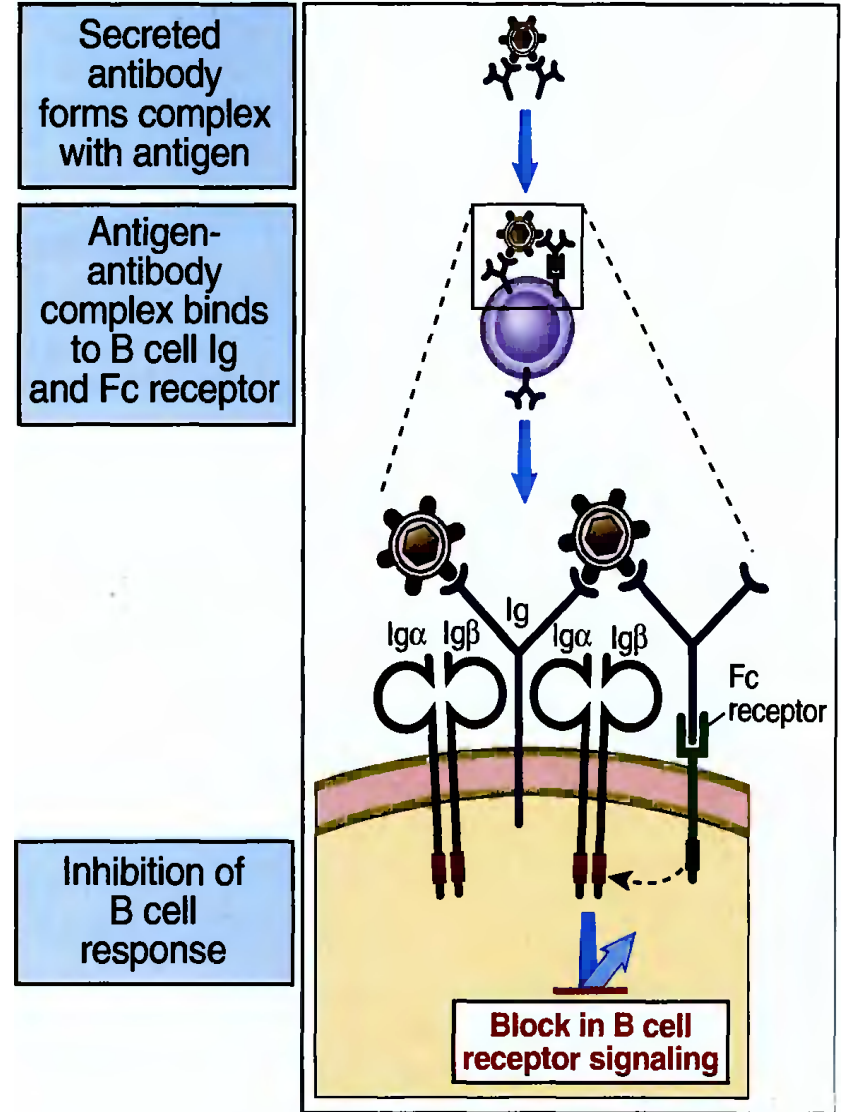


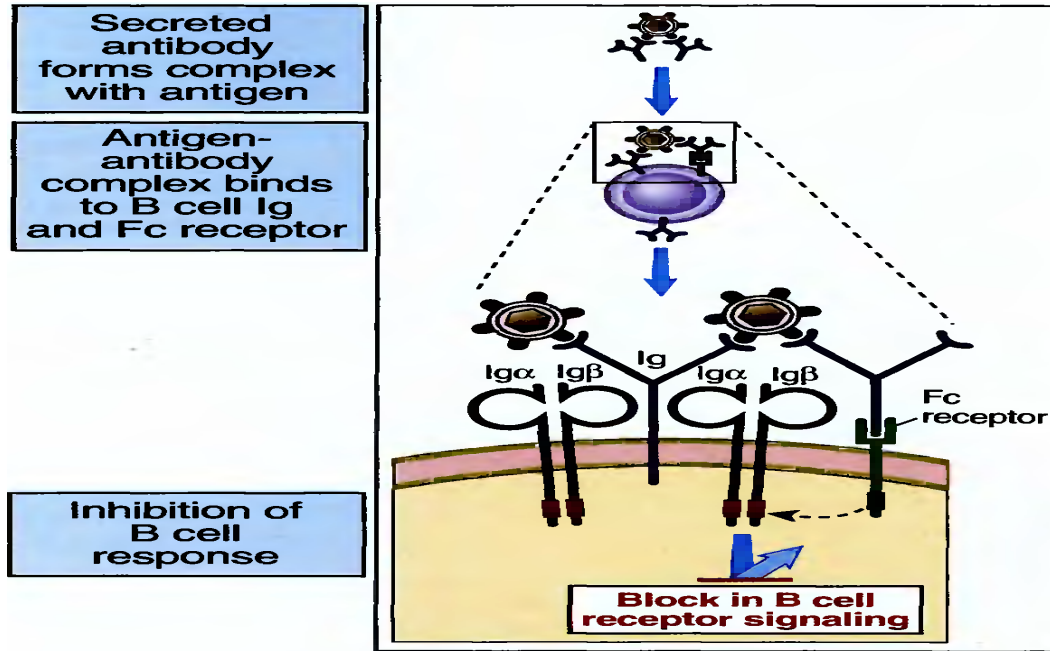
FIGURE 12-21 Regulation of B cell activation by Fc γ RIIb. A, Antigen-antibody complexes can simultaneously bind to membrane Ig (through antigen) and the Fc γ RIIb receptor through the Fc portion of the antibody. B, As a consequence of this simultaneous ligation of receptors, phosphatases associated with the cytoplasmic tail of the Fc γ RIIb inhibit signaling by the BCR complex and block B cell activation.

- B hücreleri antikor üretimini durdurmakta bir mekanizma daha kullanırlar. Üretilen IgG antikorunu bütün vücutta dolaşırken kan ve dokularda hala bulunmakta olan antijene bağlanır ve immün kompleksleri oluşturur. Antijene özgül B hücreleri Ig reseptörleri ile immün kompleksin antijen kısmına bağlanabilir.



- Aynı zamanda, bağlanan IgG antikorun Fc “kuyruğu” B hücreleri üzerinde eksprese edilen Fc reseptörü tarafından tanınır.
- Bu Fc reseptörü antijen reseptörünün uyardığı sinyalleri kapatarak B hücre yanıtını sonlandırır.



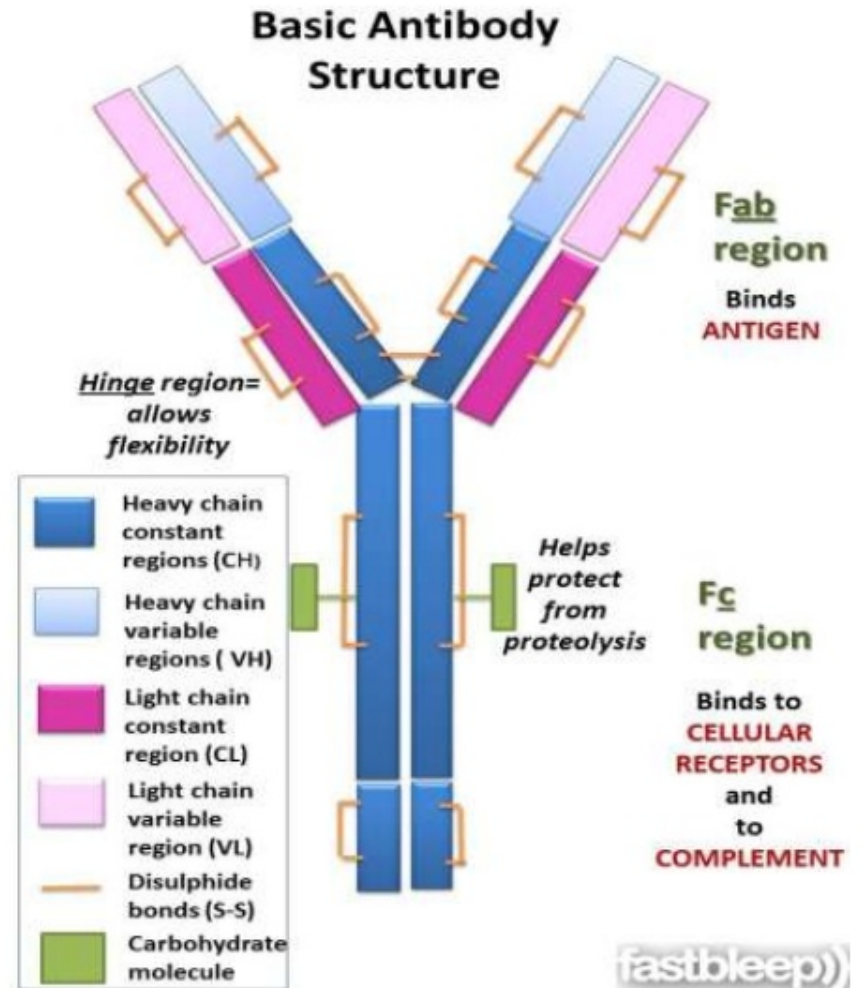


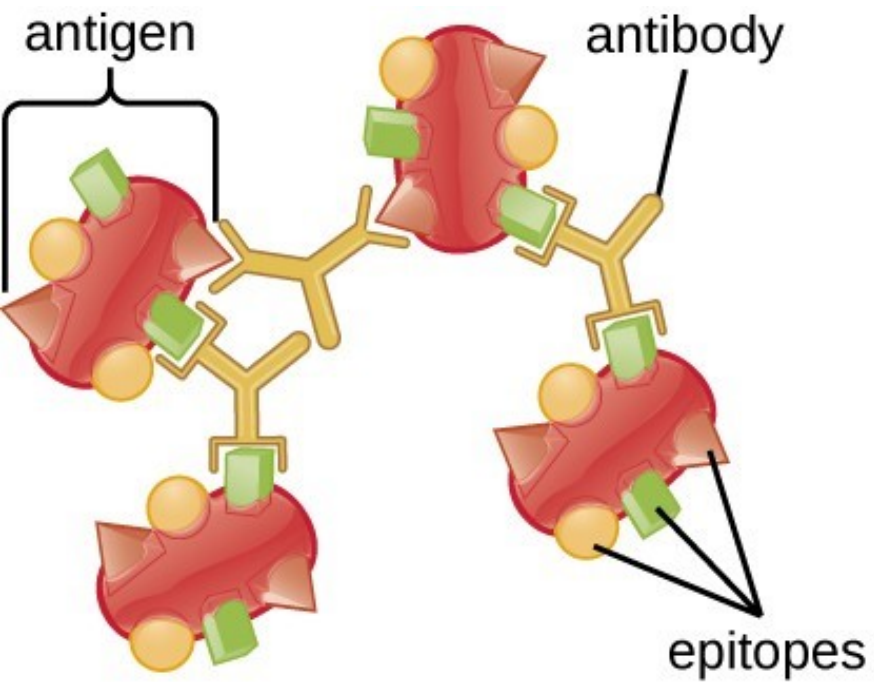
- Antijene bağlanan antikorun yeni antikor üretimini inhibe ettiği bu sürece **antikor geribildirimi** (antibody feedback) denir. Böylece, yeterli IgG antikorları üretilmesini sağlayan hümmoral immün yanıtların sonlandırılması gerçekleşir.

Monoklonal Antikorlar

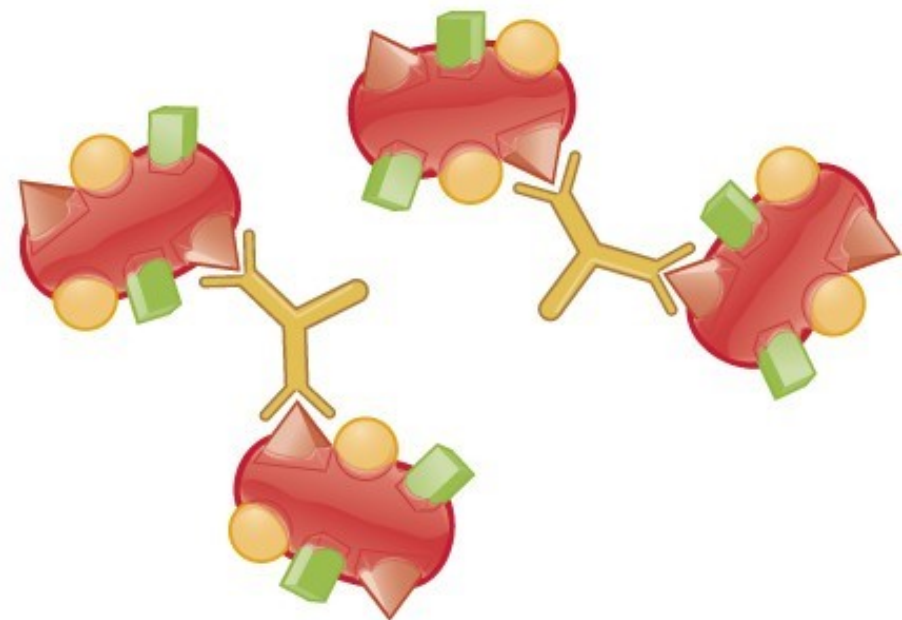
Sadece bir epitopa karşı reaksiyon gösteren antikorlardır.

Sadece bir adet B-Lenfositte dayanan hücre klonundan elde edilirler.





polyclonal antiserum



monoclonal antibodies

Polyclonal Antibody

- Cheap to produce
- Mixed population of antibodies
- May bind to different areas of the target molecule
- Tolerant of small changes in protein structure

Polyclonal antibody

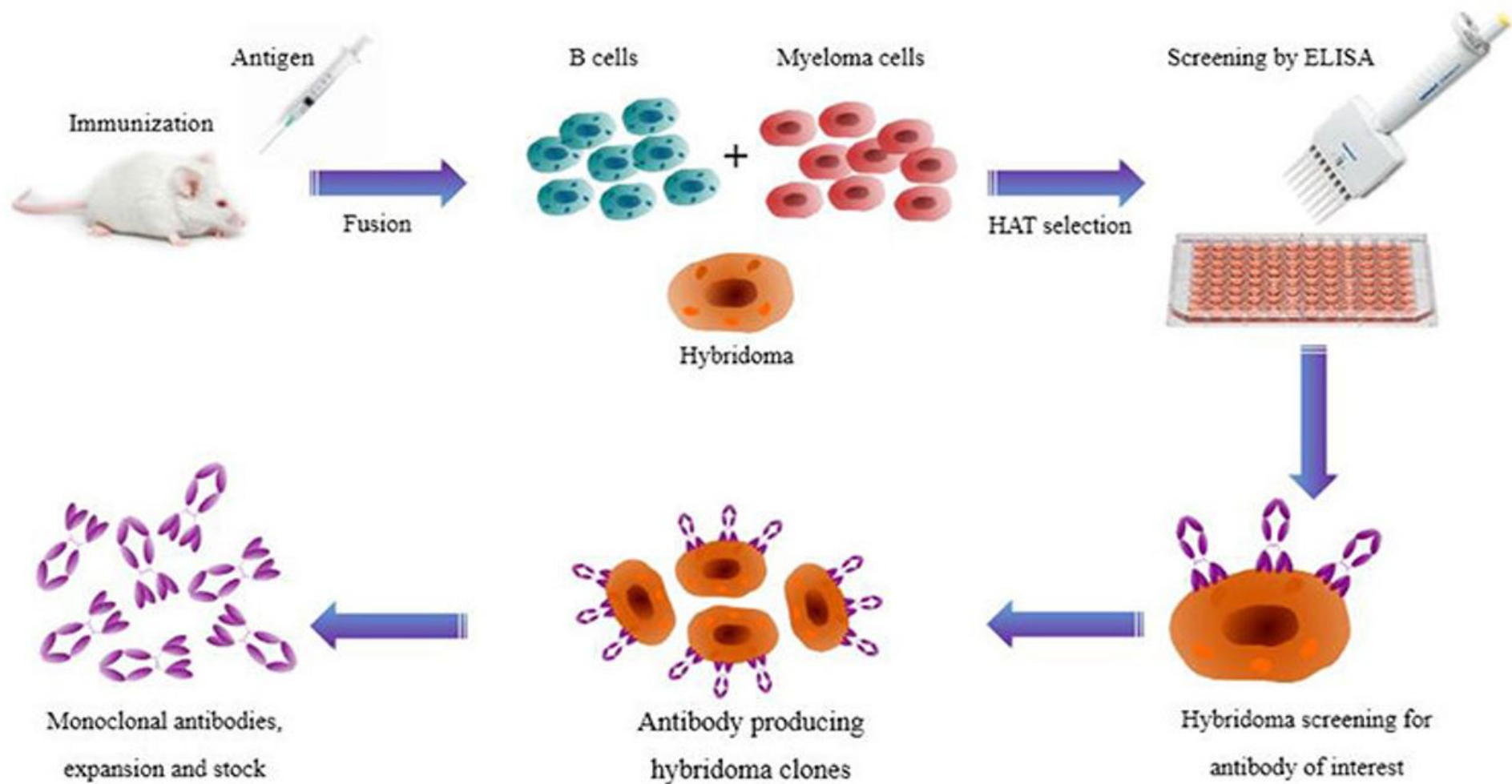


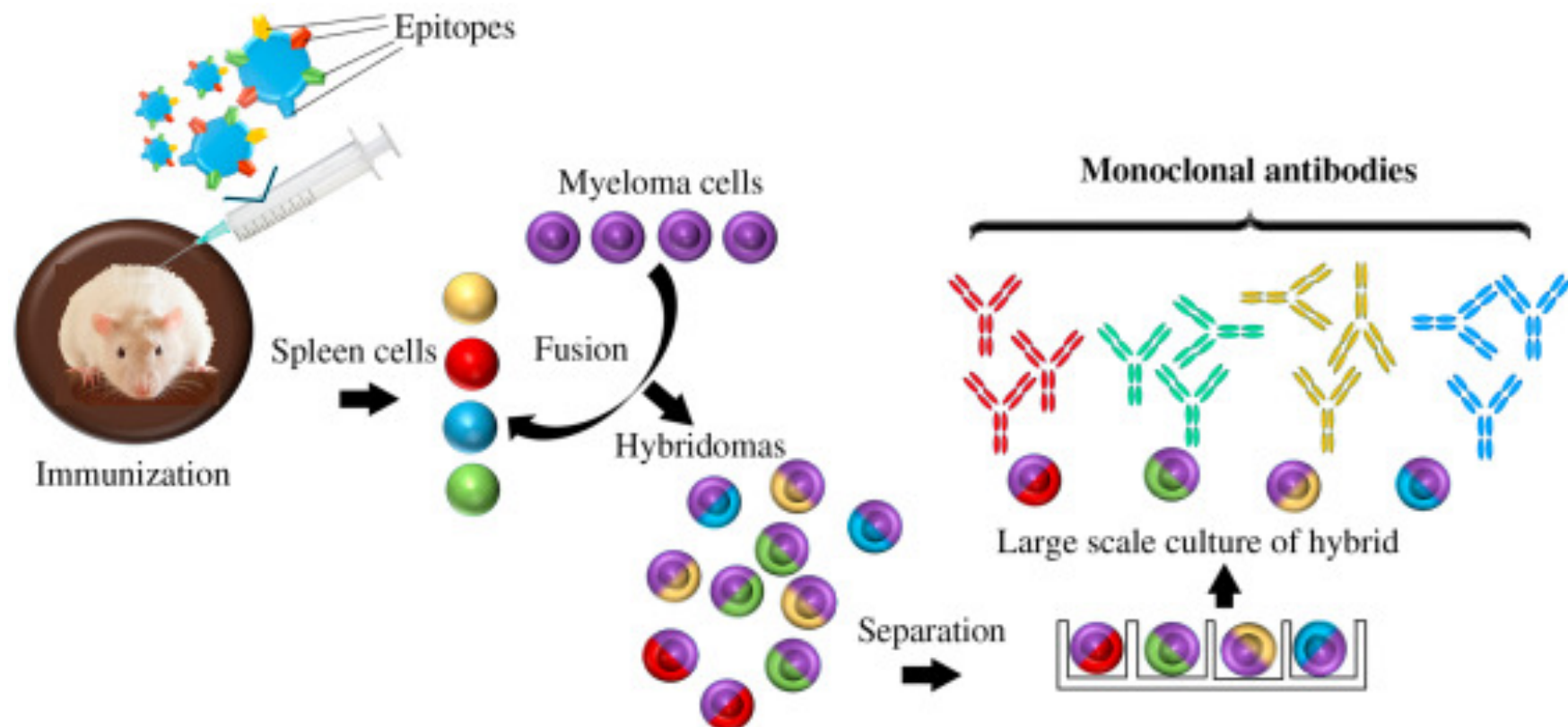
Monoclonal Antibody

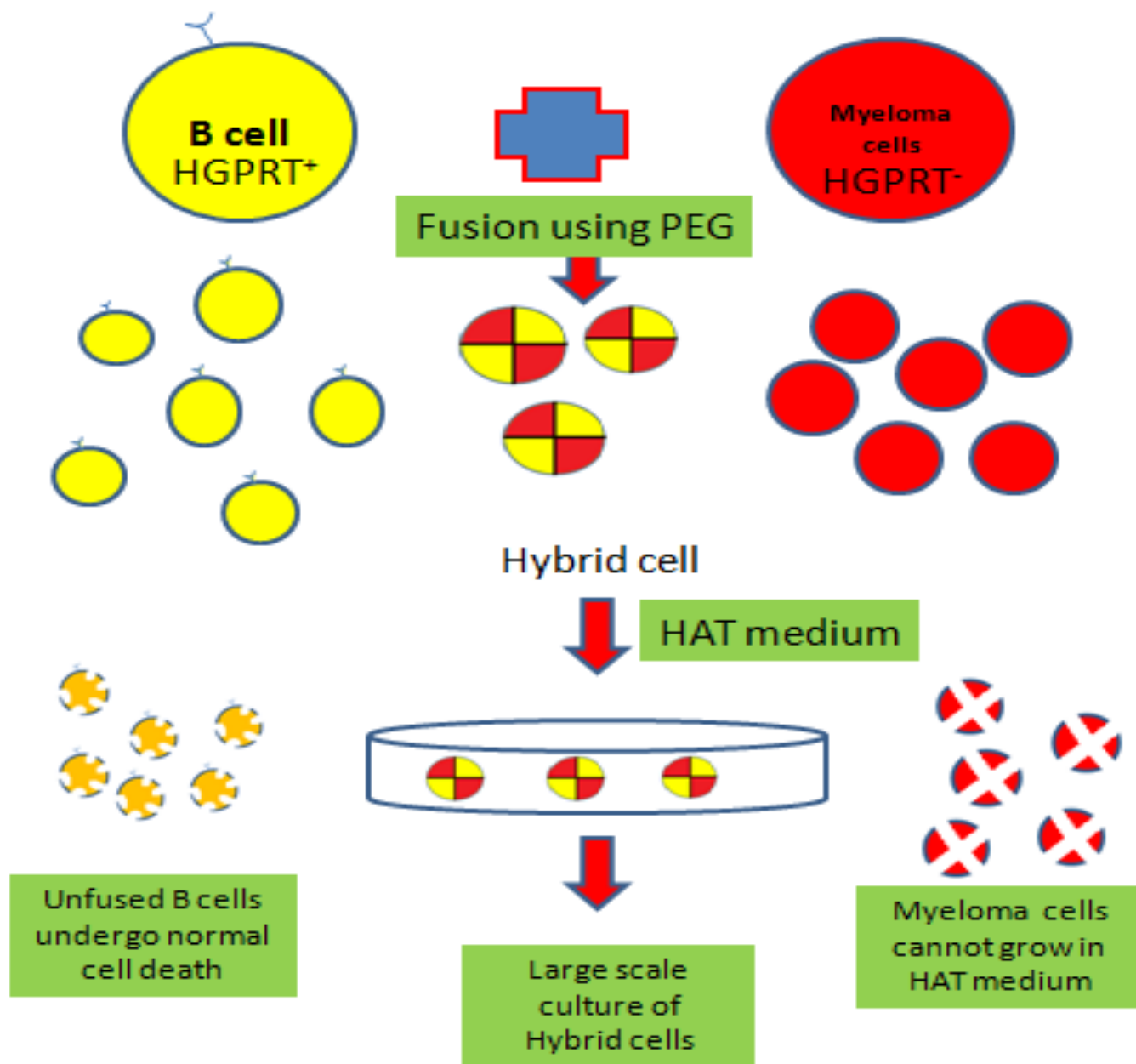
- Expensive to produce
- Single antibody species
- Will only bind single specific site
- May recognise a particular protein form

Monoclonal antibody











Salvage pathway



HAT selection medium principle

Hybridomas

- myeloma cells are selected as HGPRT-
- HGPRT- myeloma cells are fused with B-lymphocytes taken from spleen of antigen-injected mouse

myeloma cells HGPRT-  B-lymphocytes HGPRT+



Plate on **HAT** medium: **h**ypoxanthine, **t**hymidine (salvage pathway)
and **a**minopterin (blocks de novo pathway)



Unfused myeloma cells **die** (HGPRT-): can't use salvage pathway

Unfused B lymphocytes **die** (primary cells with short life span)

Fused hybridomas **grow- each cell producing a colony secreting a unique monoclonal antibody**

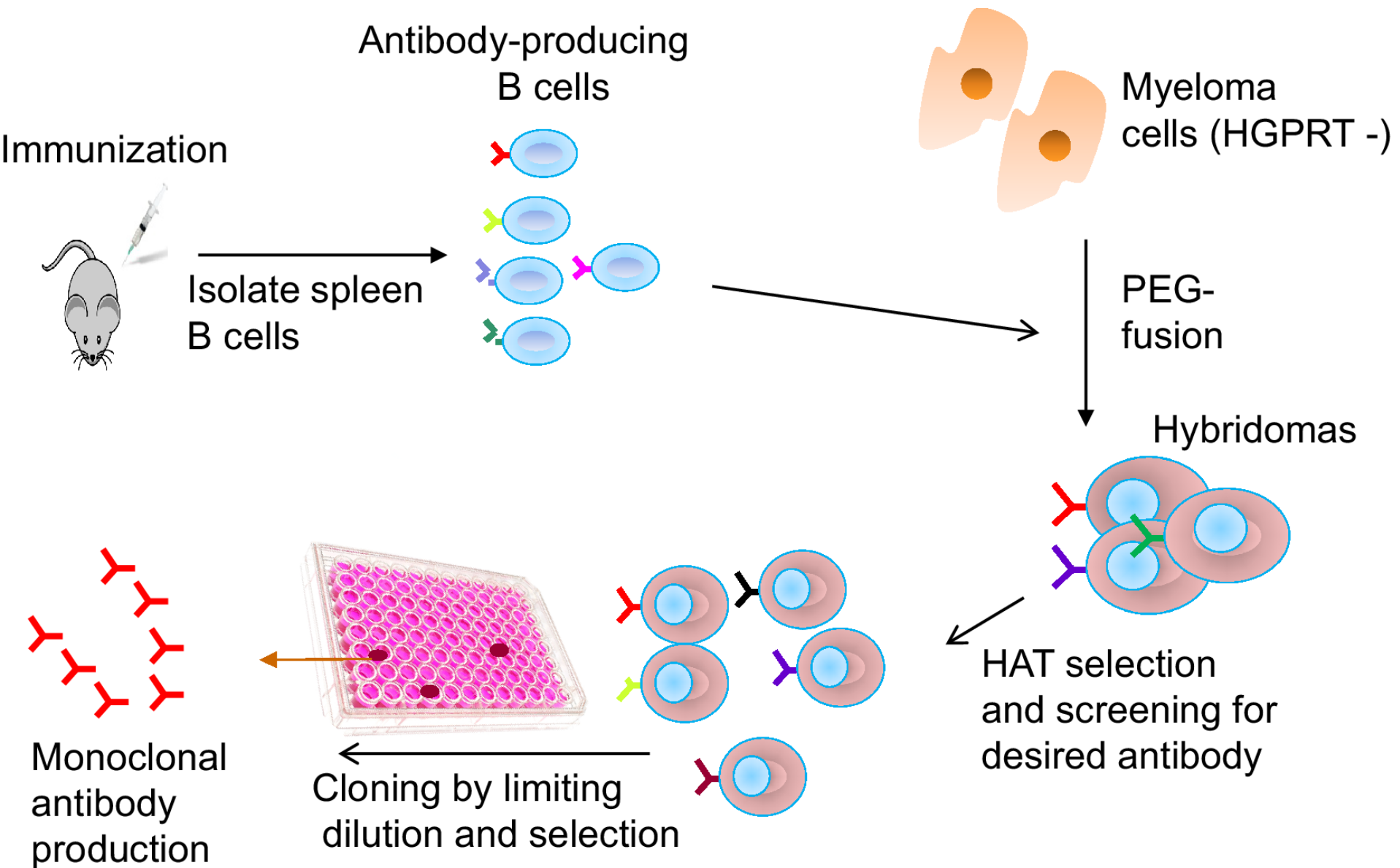
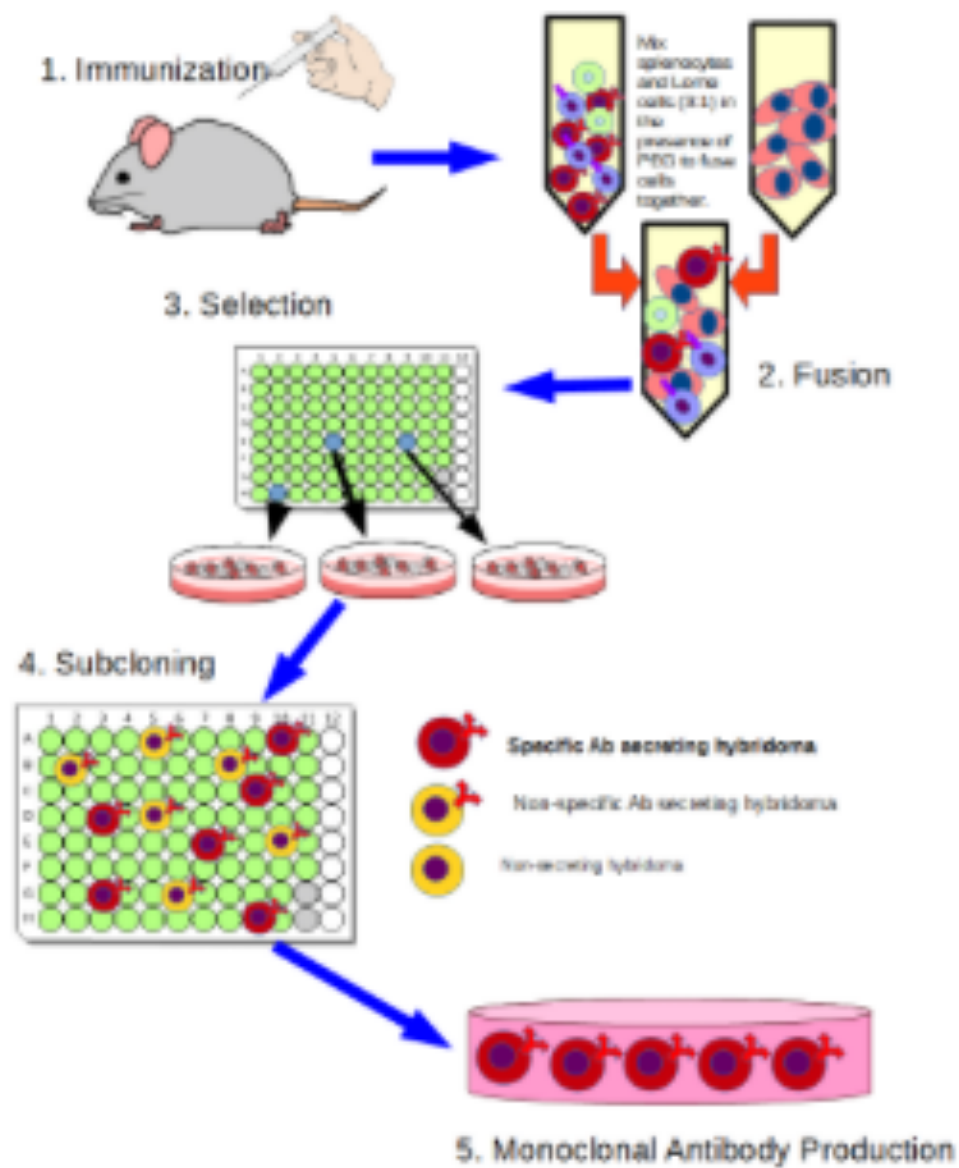
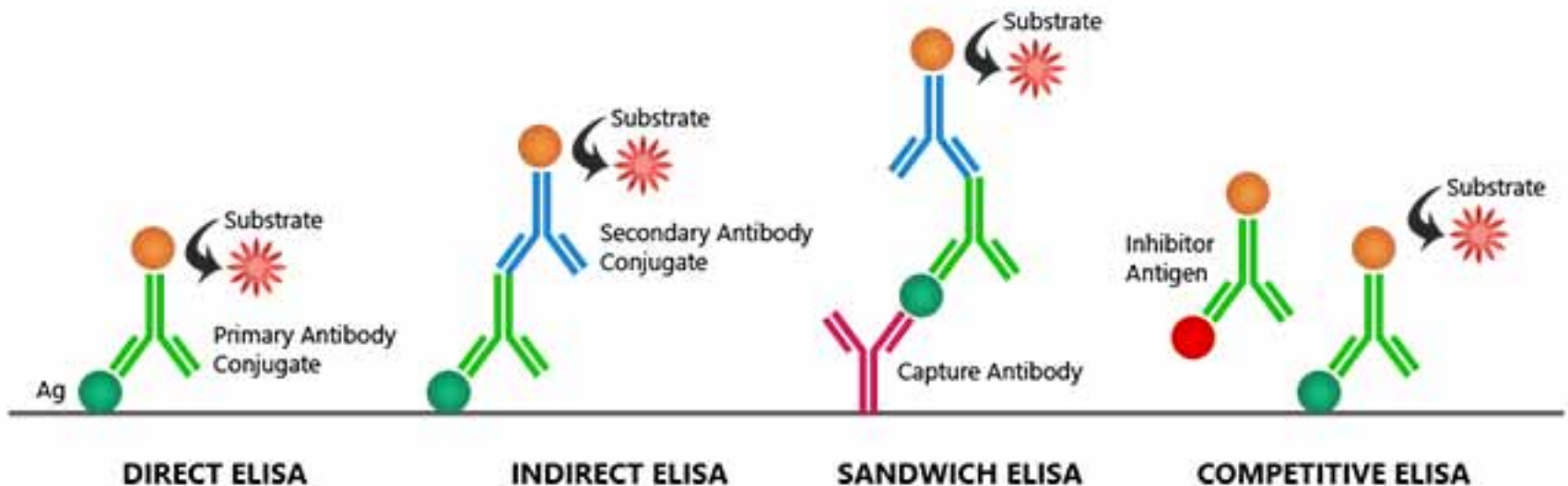


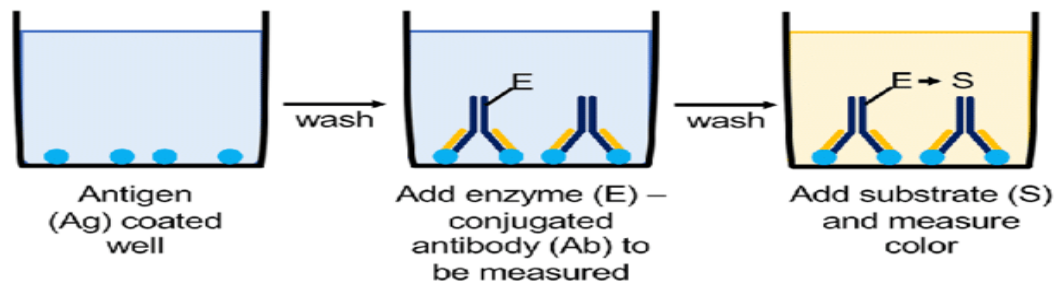
Figure 1: Hybridoma Development



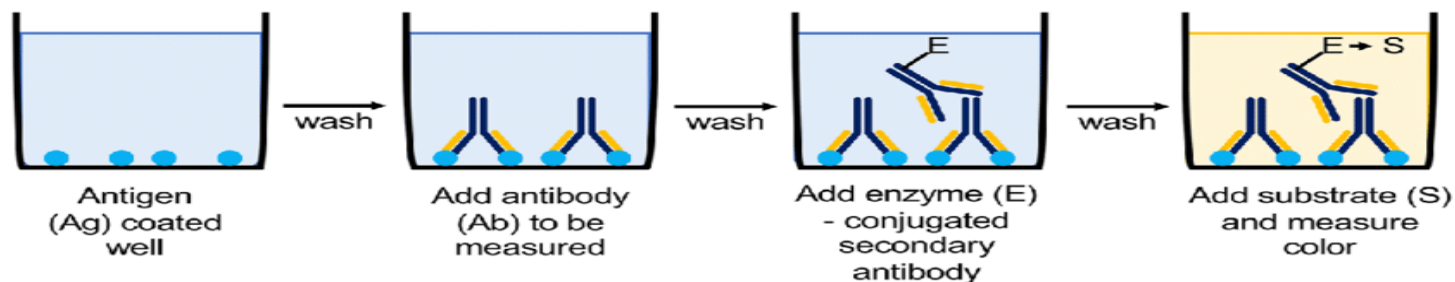
Types of ELISA



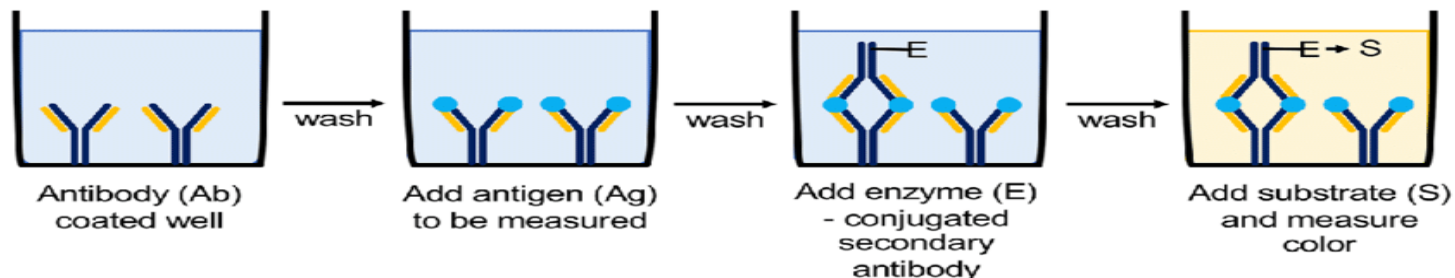
(a) Direct ELISA



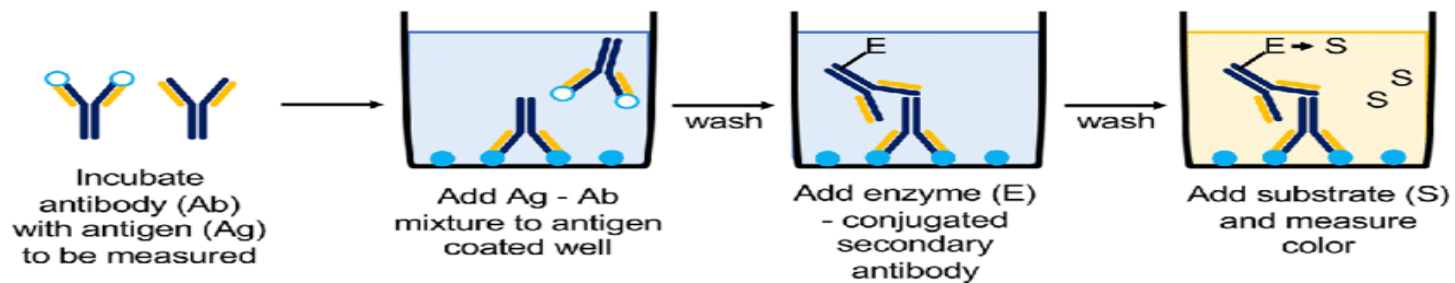
(b) Indirect ELISA



(c) Sandwich ELISA



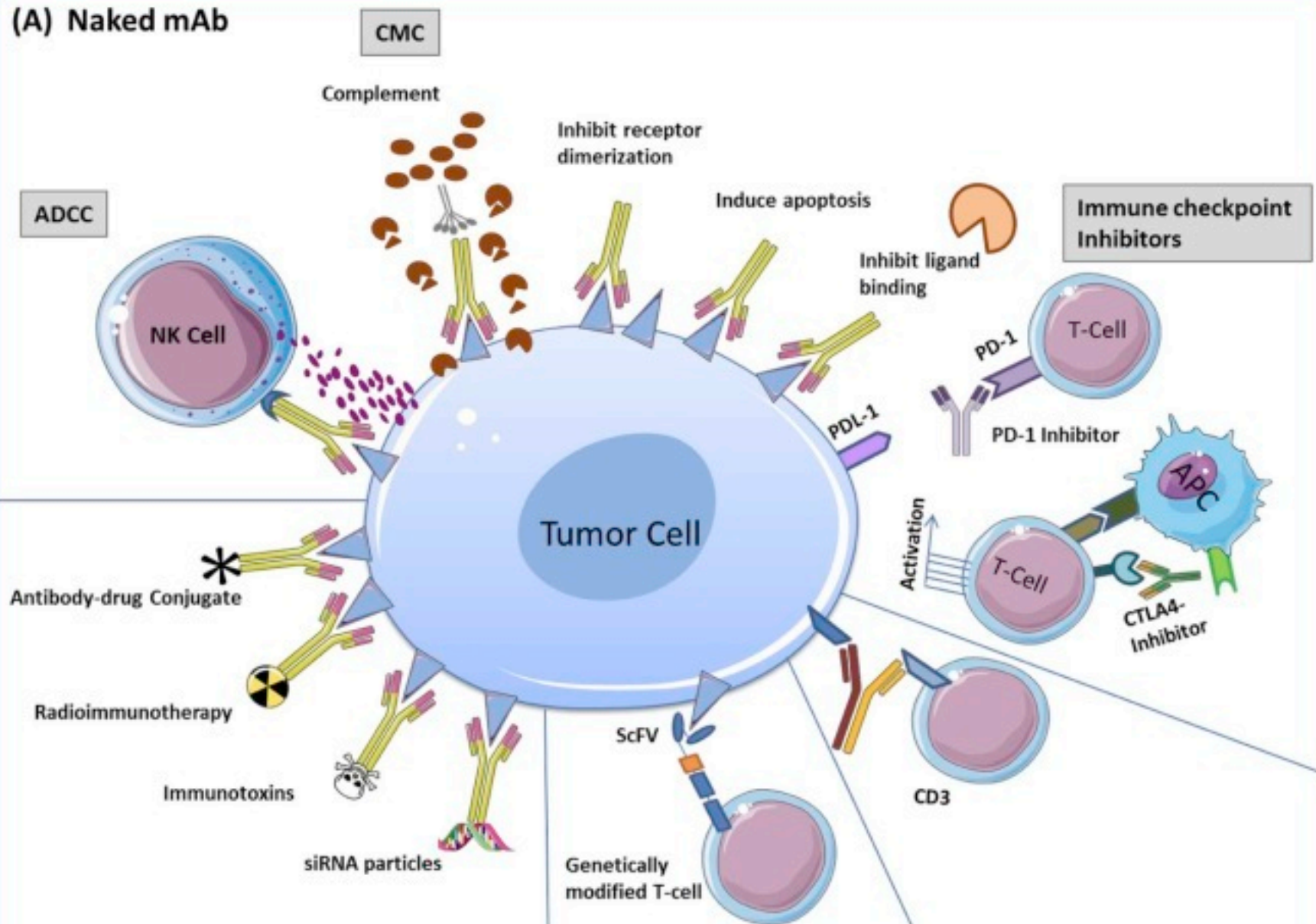
(d) Competitive ELISA



Clinical Uses for Monoclonal Antibodies

- *In vitro* diagnostic agents
- *In vivo* imaging agents
- Therapeutic agents (MAb works like a drug)
- Targeting agents (MAb linked to toxin)

(A) Naked mAb



(B) Conjugated mAb

(C) CAR-T cell

(D) Bispecific mAb