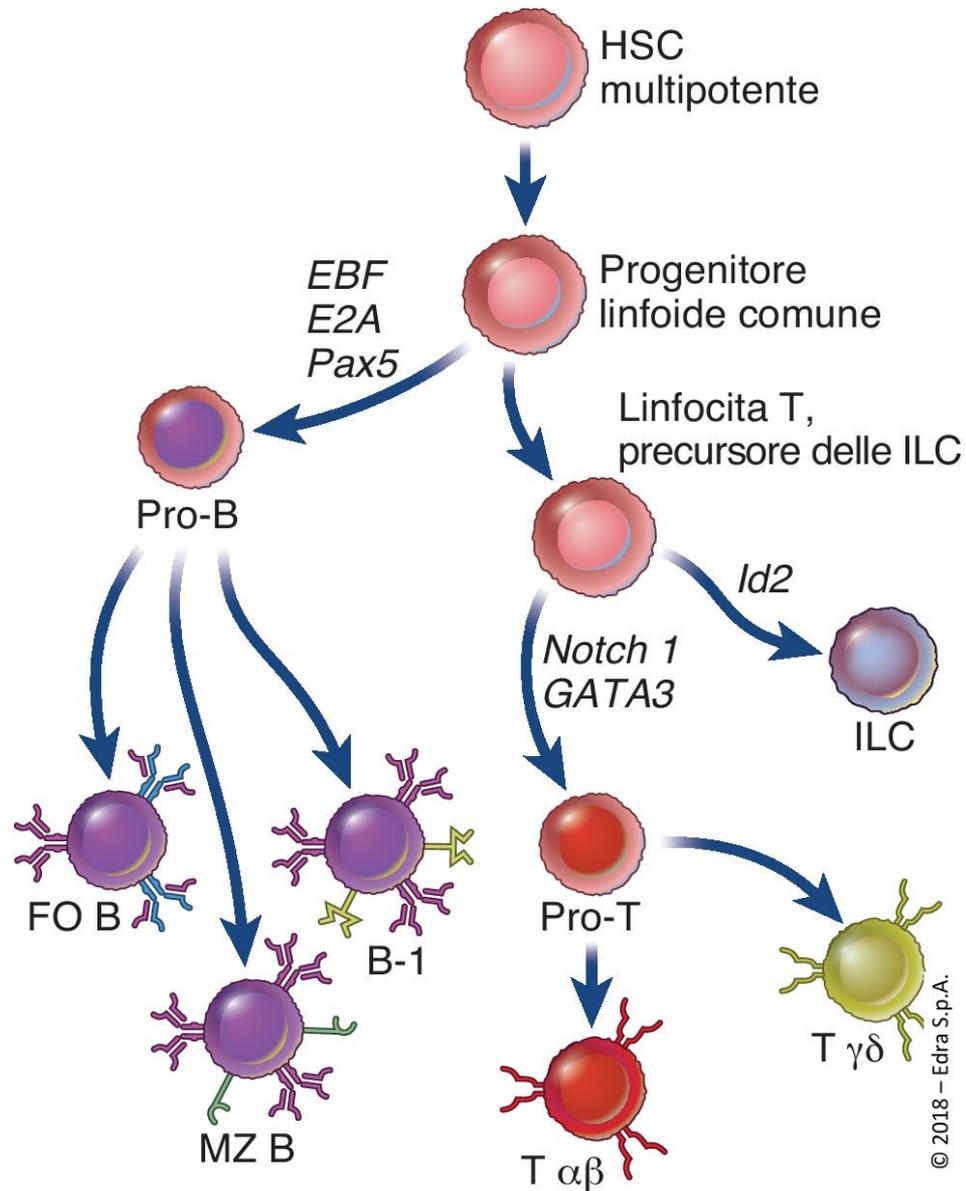
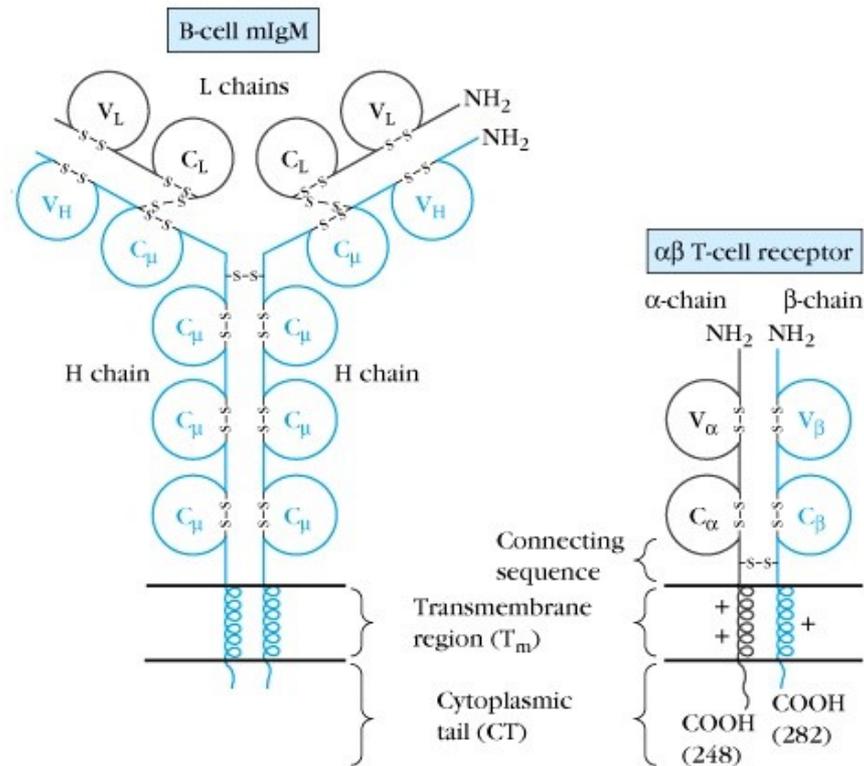


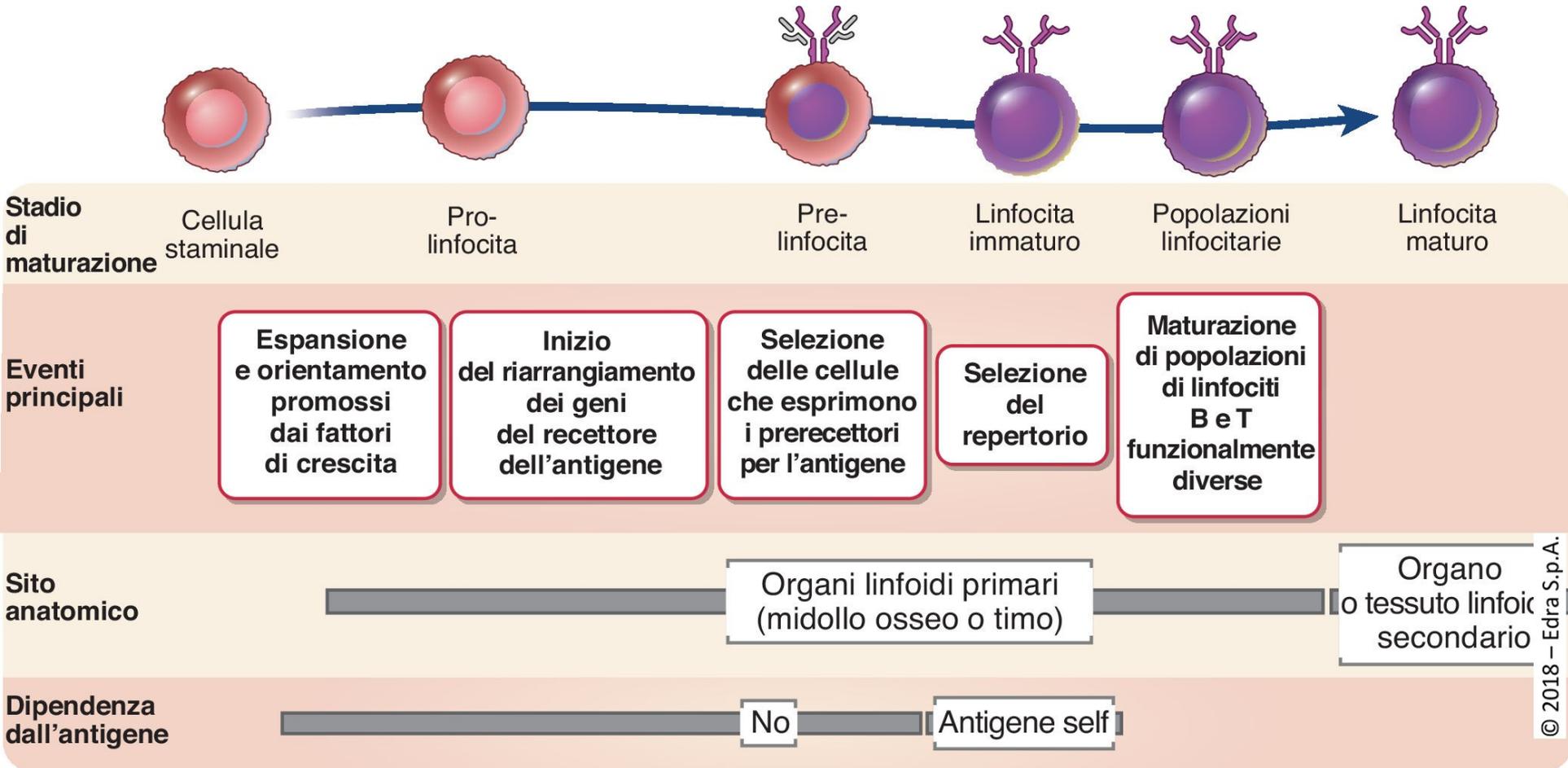
Maturazione dei linfociti



I linfociti esprimono recettori per l'antigene estremamente diversificati per riconoscere un'ampia varietà di antigeni.



Fasi della maturazione dei linfociti T e B



10¹¹ specificità Ab diverse

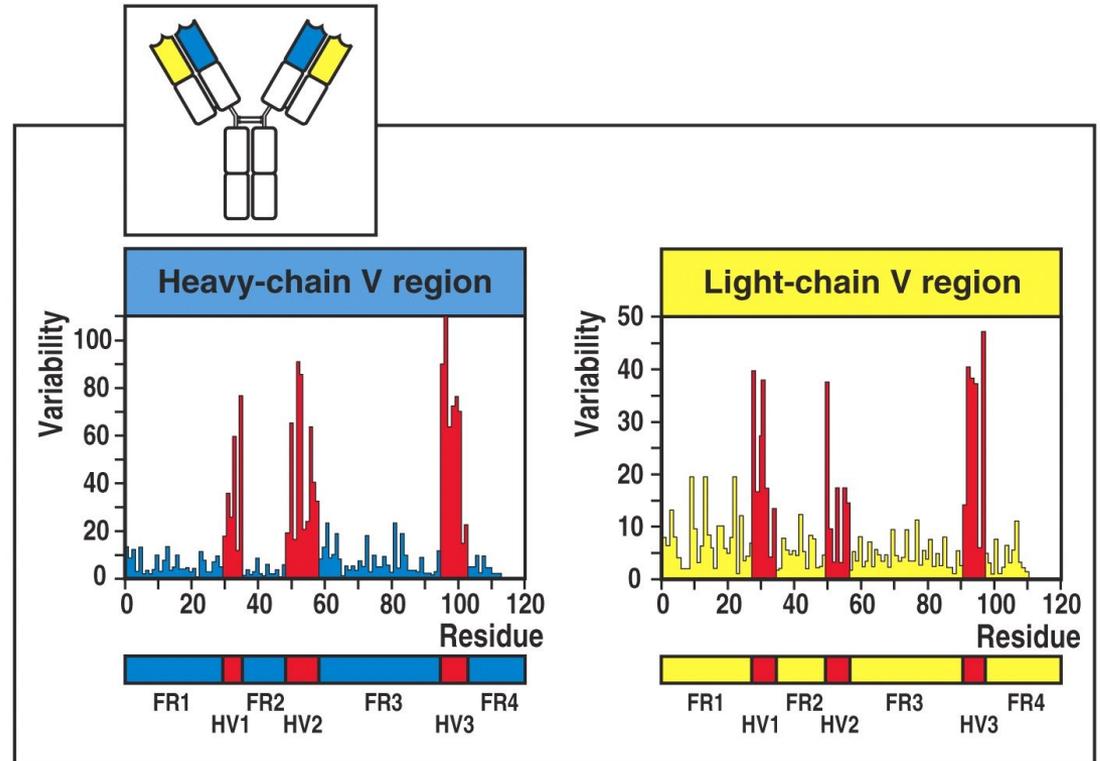
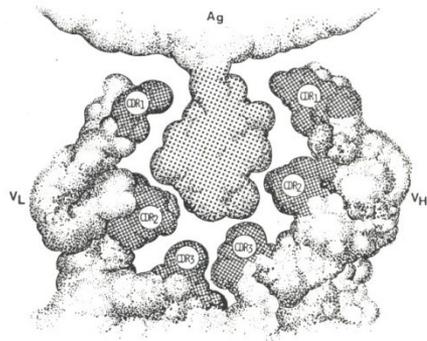
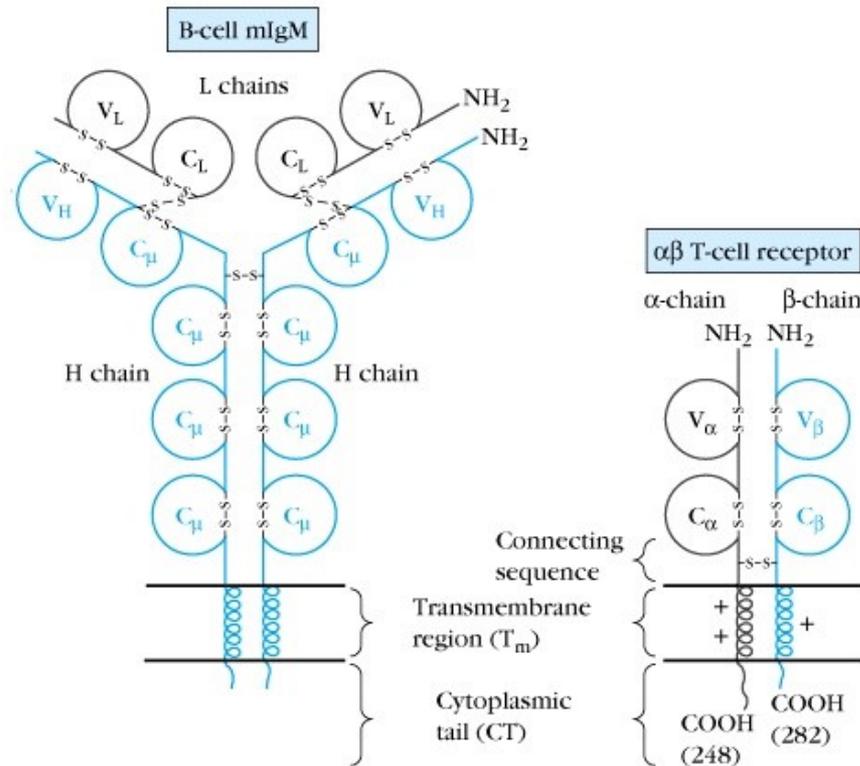


Figure 3-6 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

L'analisi delle sequenze aa delle Ig dimostrano che le catene polipeptidiche degli Ab dello stesso isotipo condividono le sequenze presenti all'estremità C-terminale ma differiscono nelle regioni N-terminali

Nello stesso recettore per l'antigene noi distinguiamo una parte variabile ed una parte costante.



1976 S. Tonegawa (premio Nobel 1987), N. Hozumi:

Tonegawa e Hozumi (1976)

Susumu Tonegawa: Premio Nobel 1987 per la scoperta del meccanismo genetico alla base della diversità anticorpale

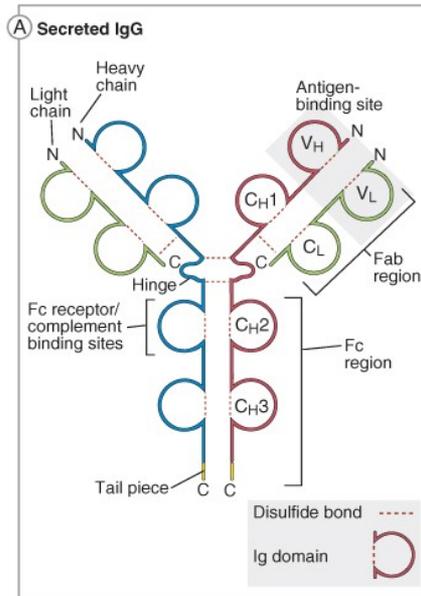
Il Riarrangiamento genico o ricombinazione somatica

Processo attraverso il quale vengono prodotti i *geni funzionali* per i recettori degli antigeni

Responsabile della generazione della variabilità dei recettori per l'antigene BCR e del TCR

Famiglia multigenica dei geni delle immunoglobuline

Esistono 3 loci genici separati dove sono presenti i geni o segmenti genici della catena pesante e delle catene leggere

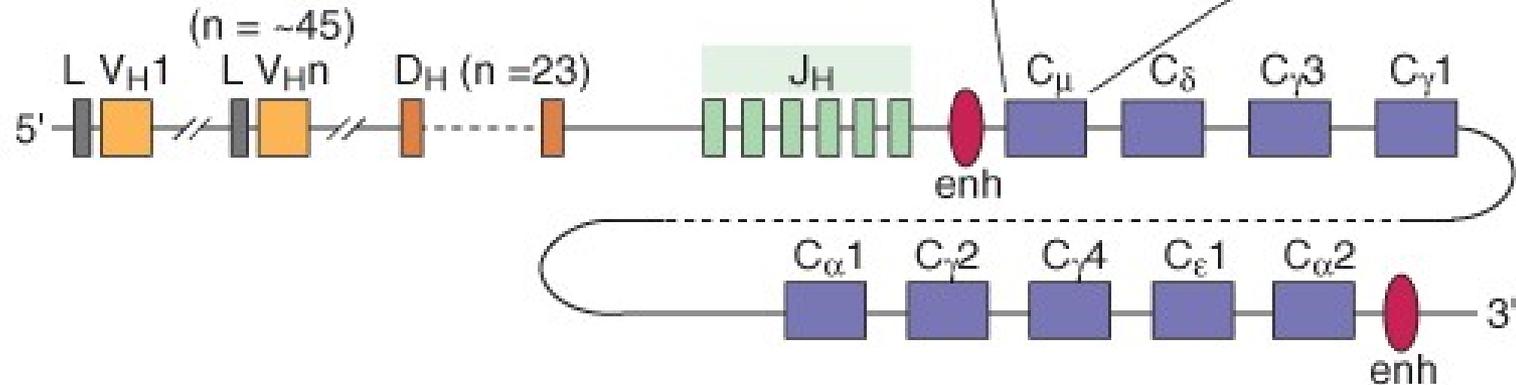


© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

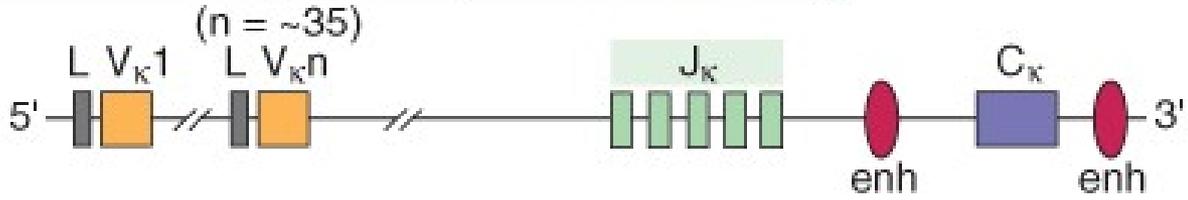
cromosoma	
Famiglia di geni	Uomo
λ	22
K	2
H	14

Le catene leggere e pesanti sono codificate da famiglie multigeniche distinte localizzate su cromosomi differenti

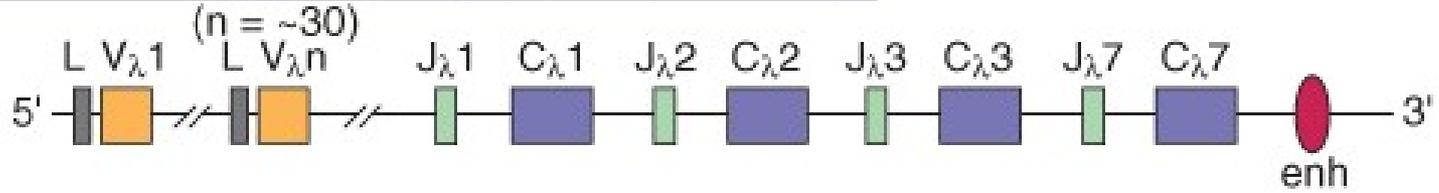
H chain locus (1250 kb; chromosome 14)



κ chain locus (1820 kb; chromosome 2)

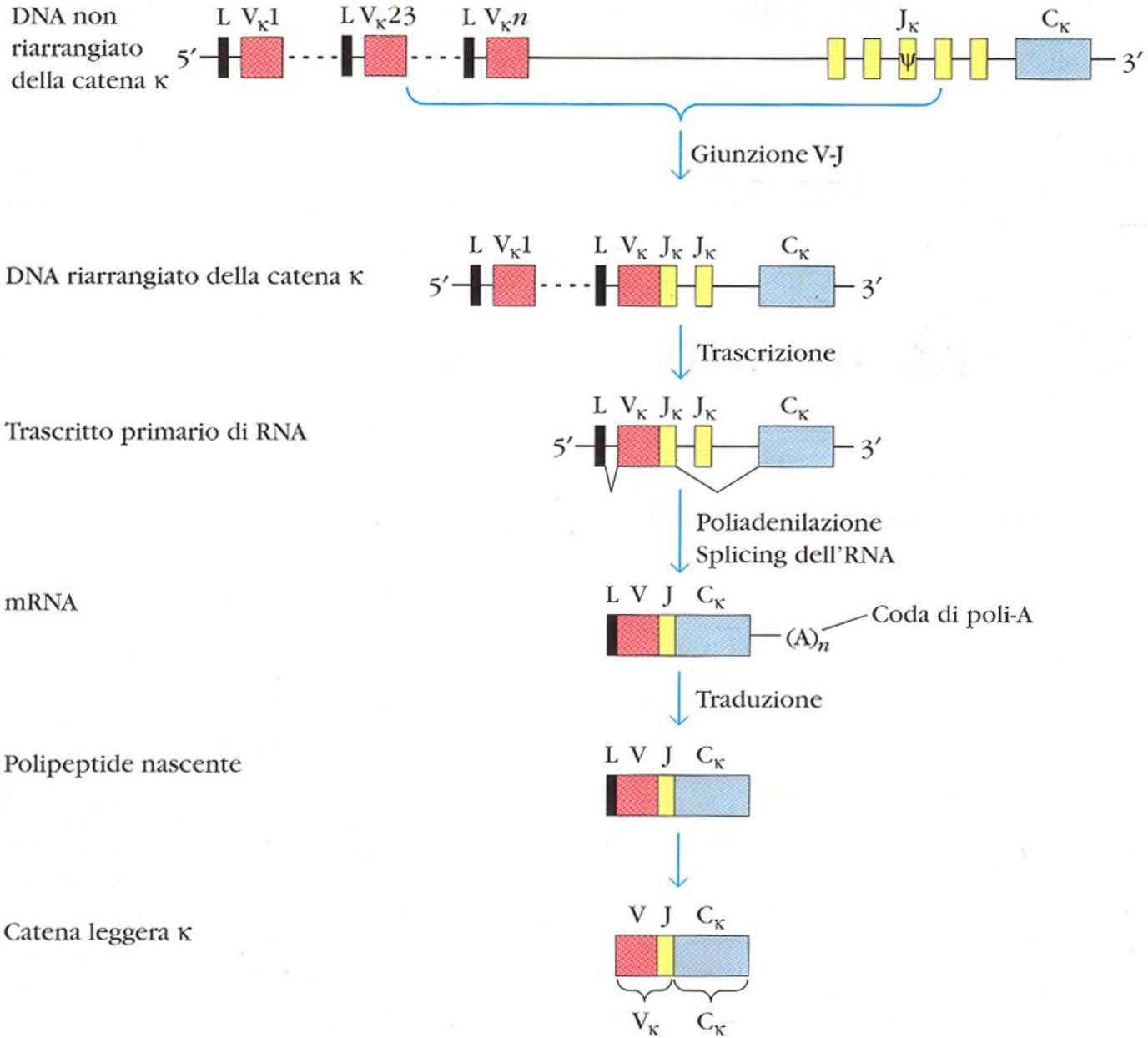


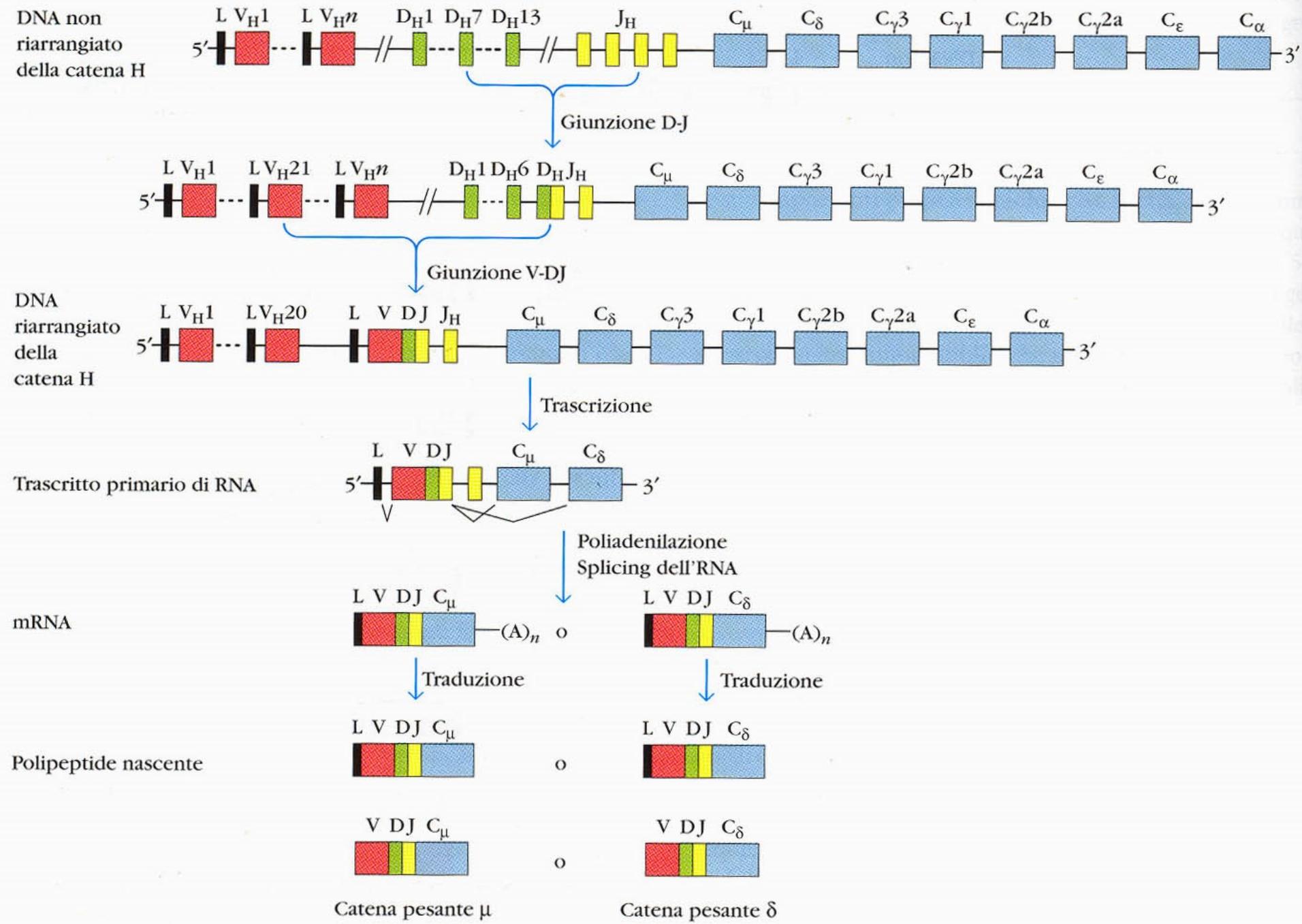
λ chain locus (1050 kb; chromosome 22)



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

Esistono 3 loci genici separati dove sono presenti i geni o segmenti genici della catena pesante e delle catene leggere





Gli enzimi che mediano il riarrangiamento genico

Il riarrangiamento dei geni per le Ig e per il TCR è mediato dall'attività di molti enzimi molti dei quali si trovano unicamente nei linfociti in fase di maturazione mentre altri sono ubiquitari e svolgono un ruolo nel processo di riparazione della doppia elica del DNA

RICOMBINASI V (D) J (RAG-1 e RAG-2)

1990

David Schatz,
Marjorie
Oettinger,
David Baltimore



*Geni attivanti la
ricombinazione*
(cromosoma 11)

Codificano proteine (*RAG-1 e RAG-2*)

**che agiscono sinergicamente nel mediare la
giunzione VDJ**

Riconoscono le RSS con formazione di una sinapsi che
porta vicini i geni che devono essere ricombinati

**Topi
Knockout**



Incapaci di
effettuare il
processo di
ricombinazione

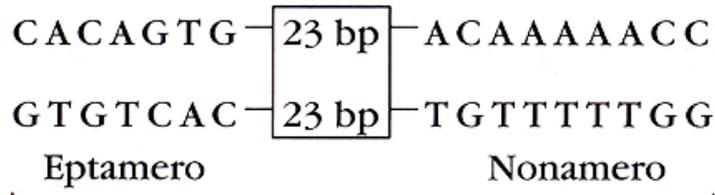


**SCID immunodeficienza
grave combinata
(assenza di B e T maturi)**

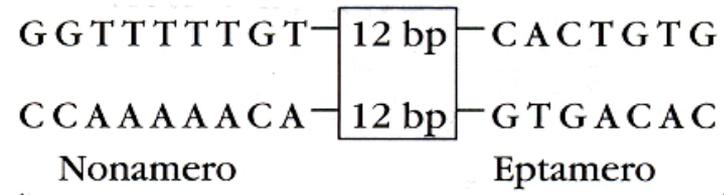
Mutazioni nei geni che codificano per RAG1 e RAG2 sono responsabili della gran parte delle forme di SCID autosomiche recessive

Sequenze segnale di ricombinazione (RSS)

(a) Sequenza nucleotidica di RSS

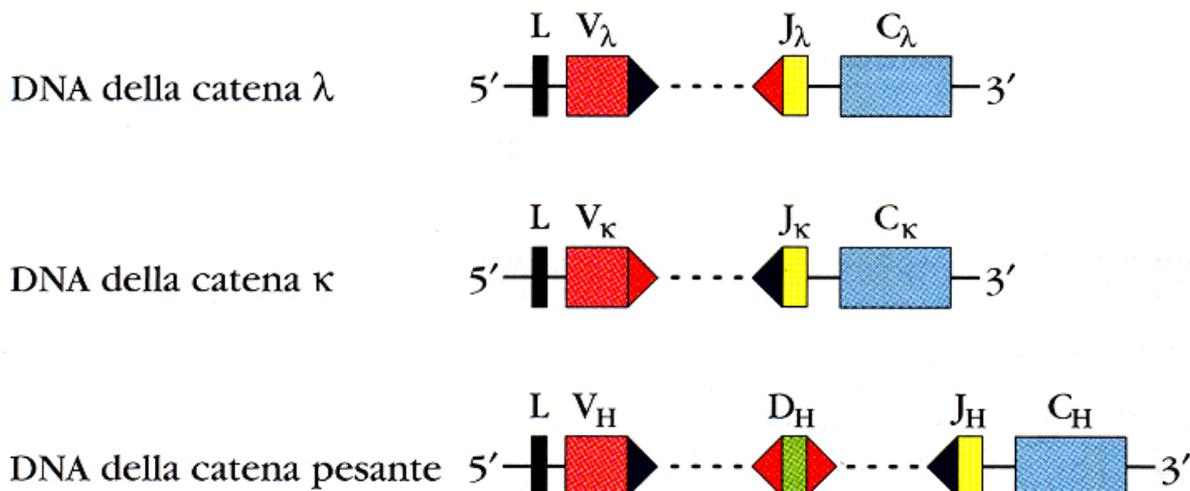


RSS a due giri



RSS a un giro

(b) Localizzazione di RSS nel DNA non riarrangiato delle Ig



B Addition of P and N nucleotides at junctions

RAG-mediated cleavage of heptamer adjacent to V segment

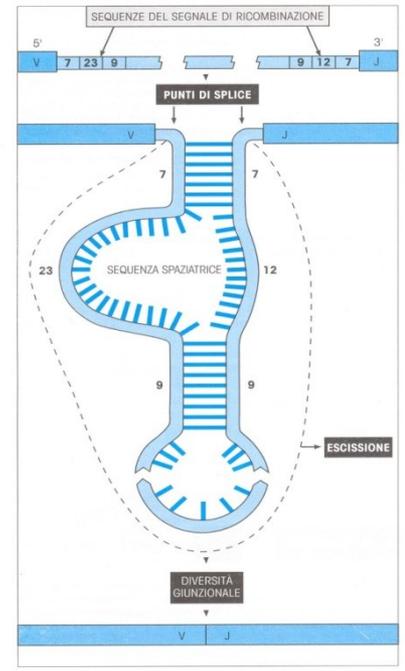
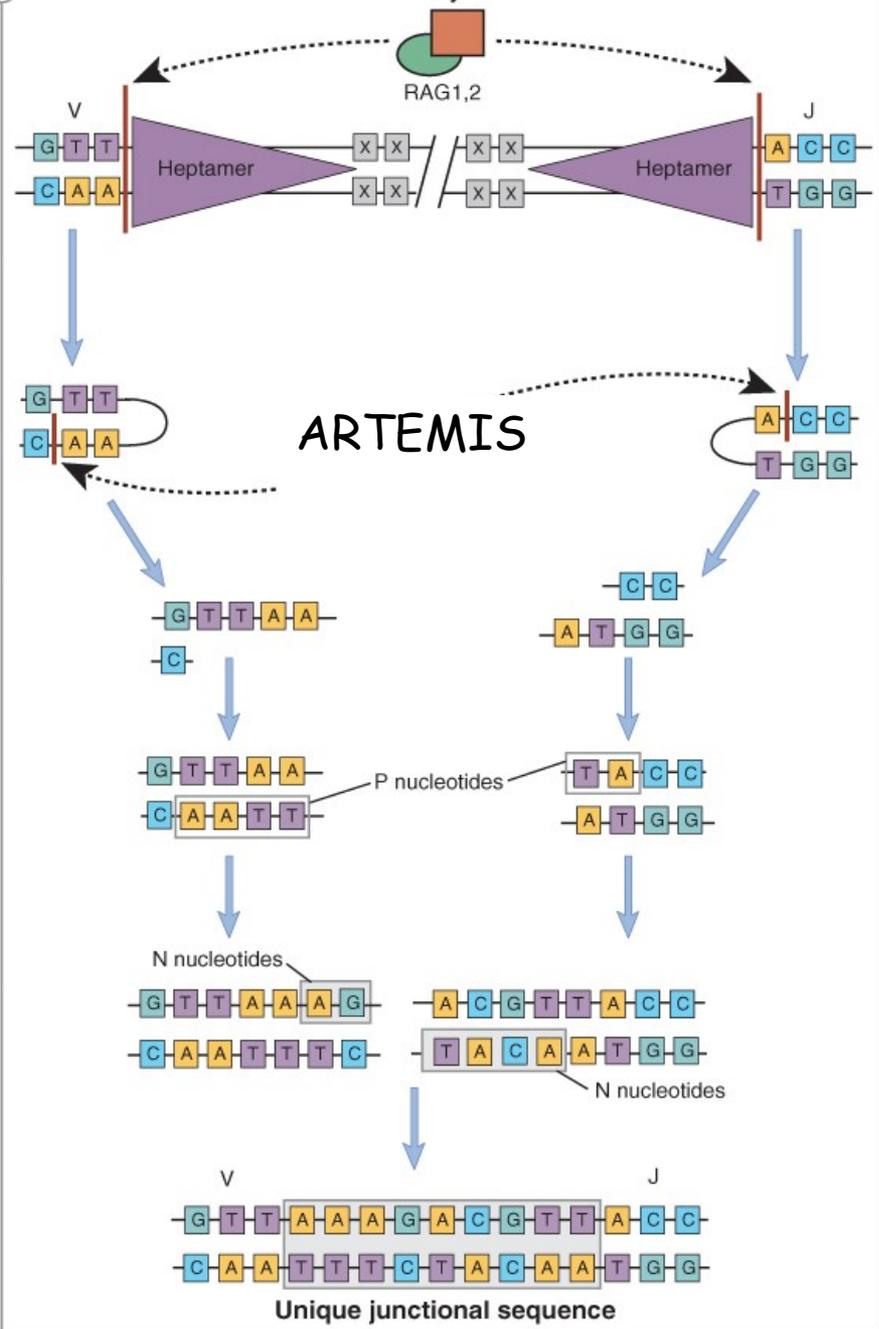
Creation of hairpin loop

Asymmetric RAG-mediated cleavage of hairpin loop

DNA polymerase extension of short ends: addition of P nucleotides

TdT-mediated addition of N nucleotides; DNA polymerase extension of short ends

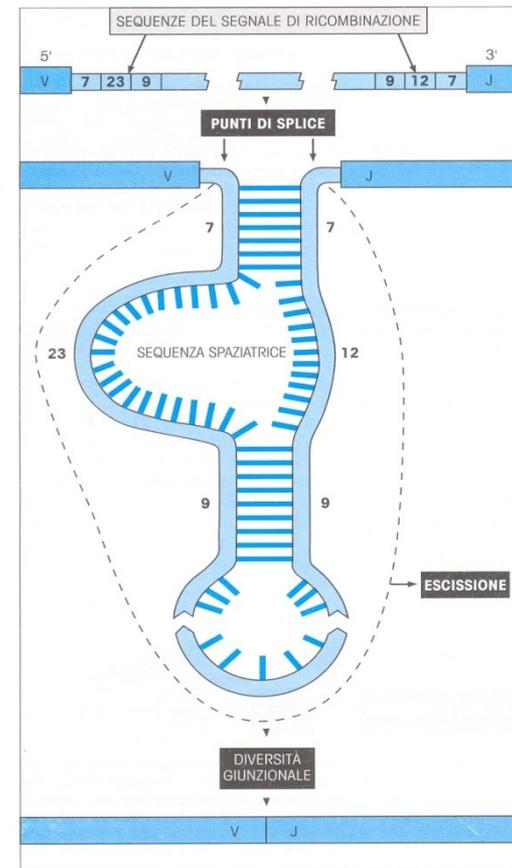
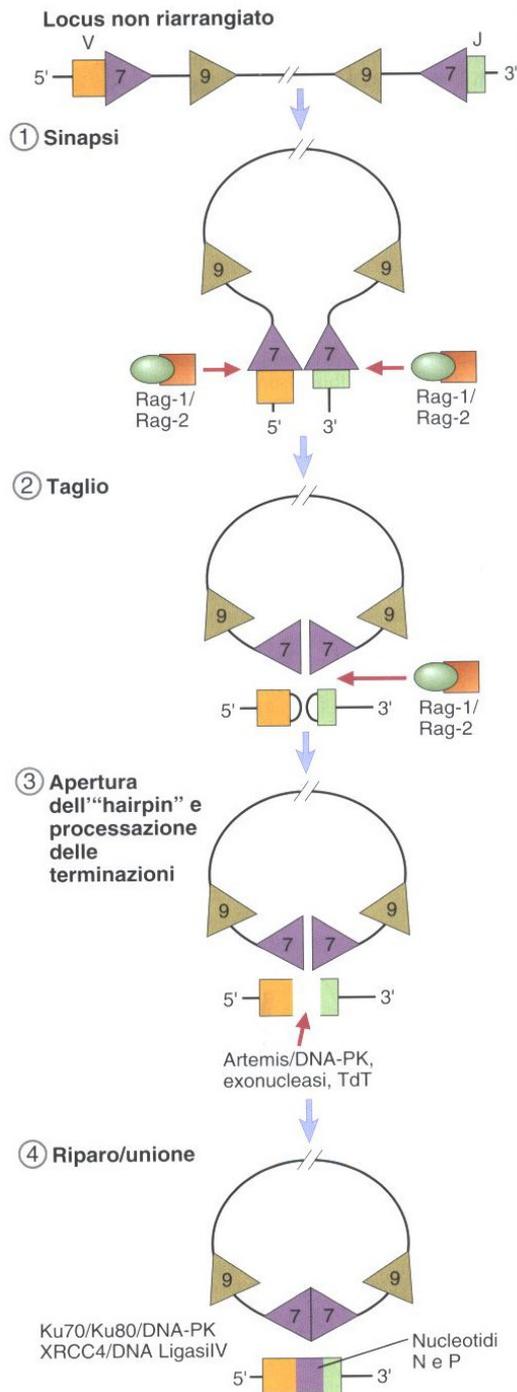
Ligation of V and J segments to form V-J junction with unique nongermline sequences



DNA polimerasi

TdT = transferasi desossiribonucleotidica terminale

Allungamenti asimmetrici del filamento a singola elica del DNA

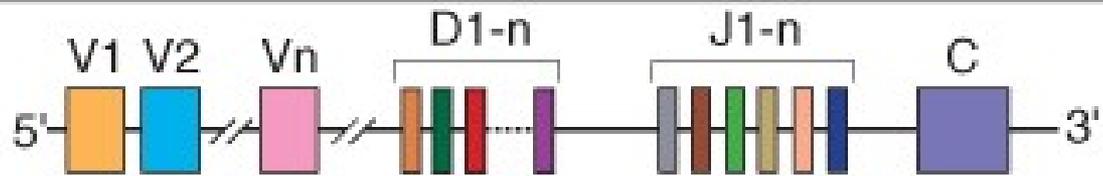


Ku70 e Ku80 ricongiungono le terminazioni di DNA e reclutano la subunità catalitica di DNA-PK

L'enzima **DNA-PK** fosforila e attiva l'enzima **Artemis**, endonucleasi che apre le hairpin alle estremità codificanti.

La **DNA ligasi IV** lega le estremità interrotte e processate

Germline DNA



Somatic recombination (V-D-J joining), addition of N and P nucleotides, transcription and RNA processing in three B cell clones

Expressed mRNA in three lymphocyte clones

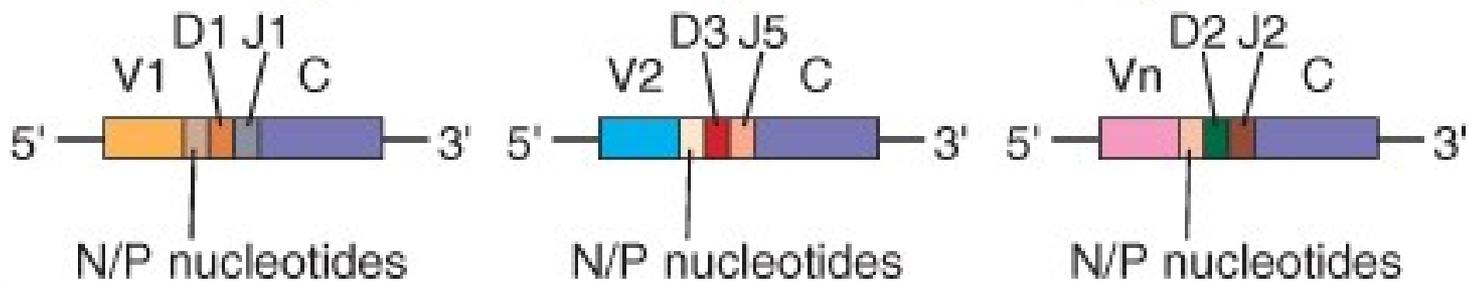


TABELLA 5-2 DIVERSITÀ COMBINATORIA DEGLI ANTICORPI NELL'UOMO E NEL TOPO

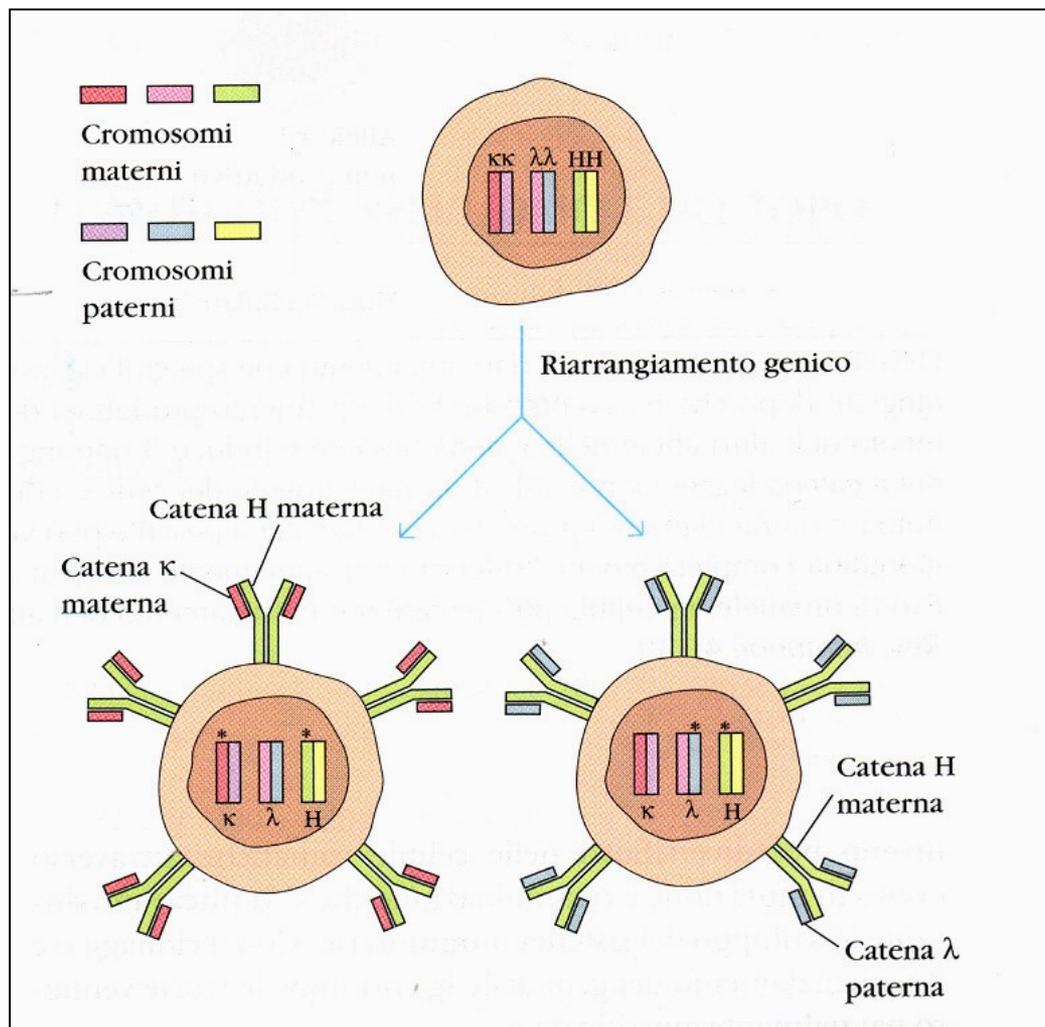
Segmenti genici multipli non riarrangiati	Catena pesante	Catene leggere	
		κ	λ
Numero stimato dei segmenti nell'uomo*			
V	51	40	30
D	27	0	0
J	6	5	4
Giunzione combinatoria V-D-J e V-J (numero di combinazioni possibili)	$51 \times 27 \times 6 = 8262$	$40 \times 5 = 200$	$30 \times 4 = 120$
Associazioni combinatorie possibili delle catene pesanti e leggere†	$8262 \times (200 + 120) = 2,64 \times 10^6$		
Numero stimato dei segmenti nel topo*			
V	134	85	2
D	13	0	0
J	4	4	3
Giunzione combinatoria V-D-J e V-J (numero di combinazioni possibili)	$34 \times 13 \times 4 = 6968$	$85 \times 4 = 340$	$2 \times 3 = 6$
Associazioni combinatorie possibili delle catene pesanti e leggere†	$6968 \times (340 + 6) = 2,41 \times 10^6$		

*Questi numeri sono stati ottenuti da studi su soggetti singoli; si possono osservare differenze minime in individui diversi. Per quanto riguarda l'uomo sono elencati solo i segmenti genici funzionali. Il genoma contiene segmenti aggiuntivi che non sono in grado di riarrangiare e/o che contengono codoni di stop. Per quanto riguarda il topo le cifre contenute nella tabella sono stime approssimative, poiché il locus non è stato completamente sequenziato.

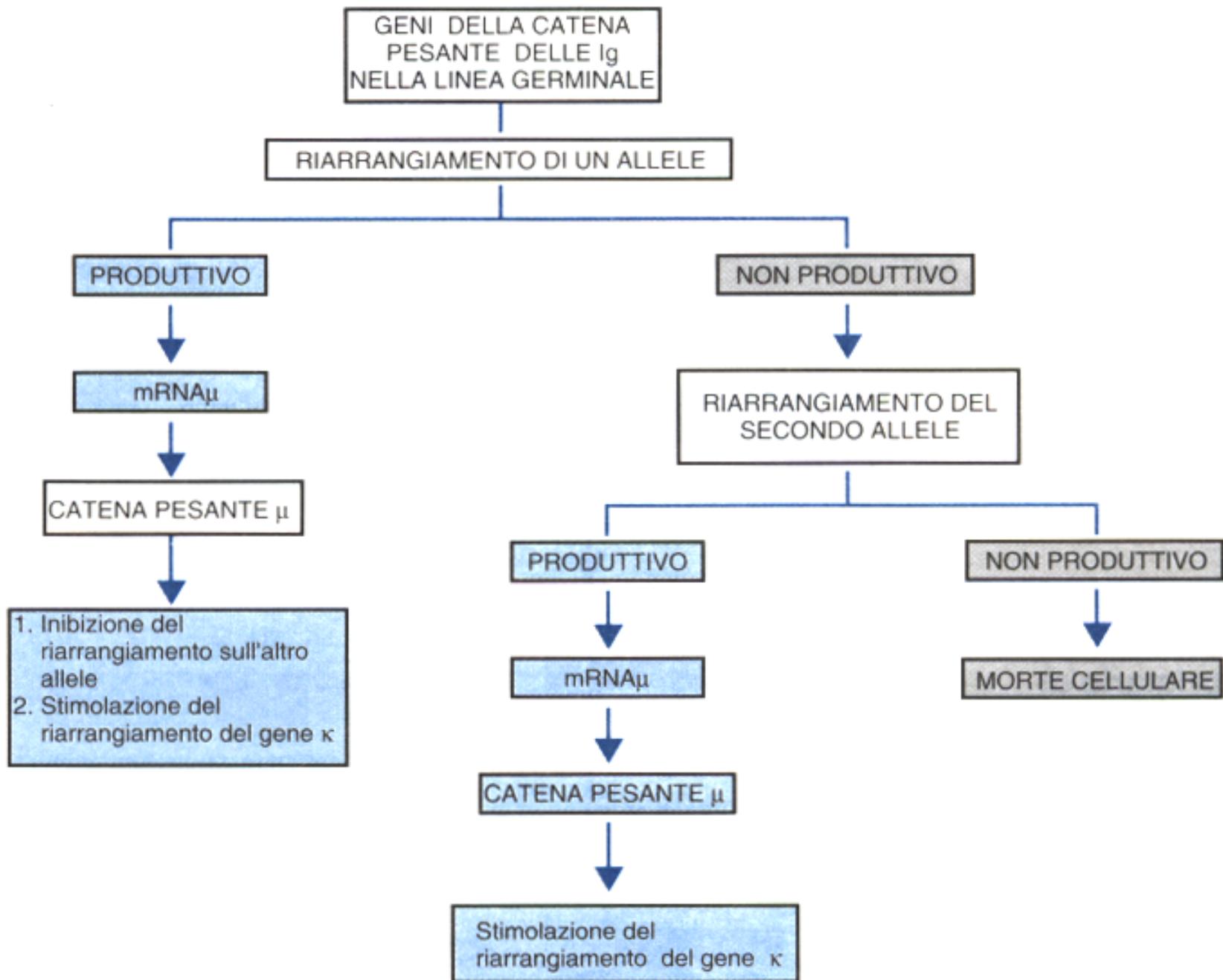
†A causa della diversità dovuta alla flessibilità giunzionale, all'aggiunta di nucleotidi N e P e alla mutazione somatica il potenziale reale supera queste stime di diversi ordini di grandezza.

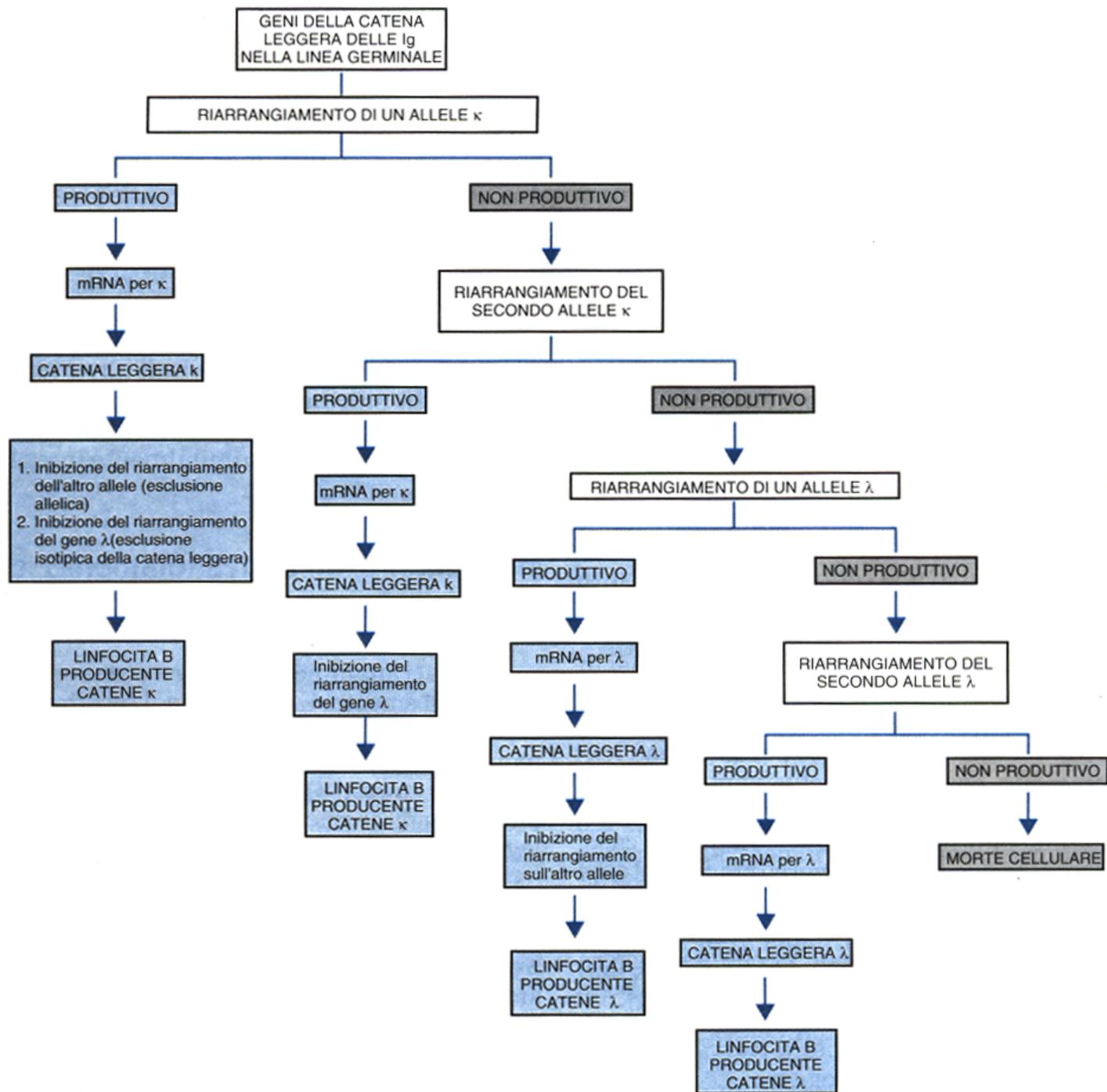
FONTI DI VARIABILITA' DELLE REGIONI DETERMINANTI LA COMPLEMENTARIETA'

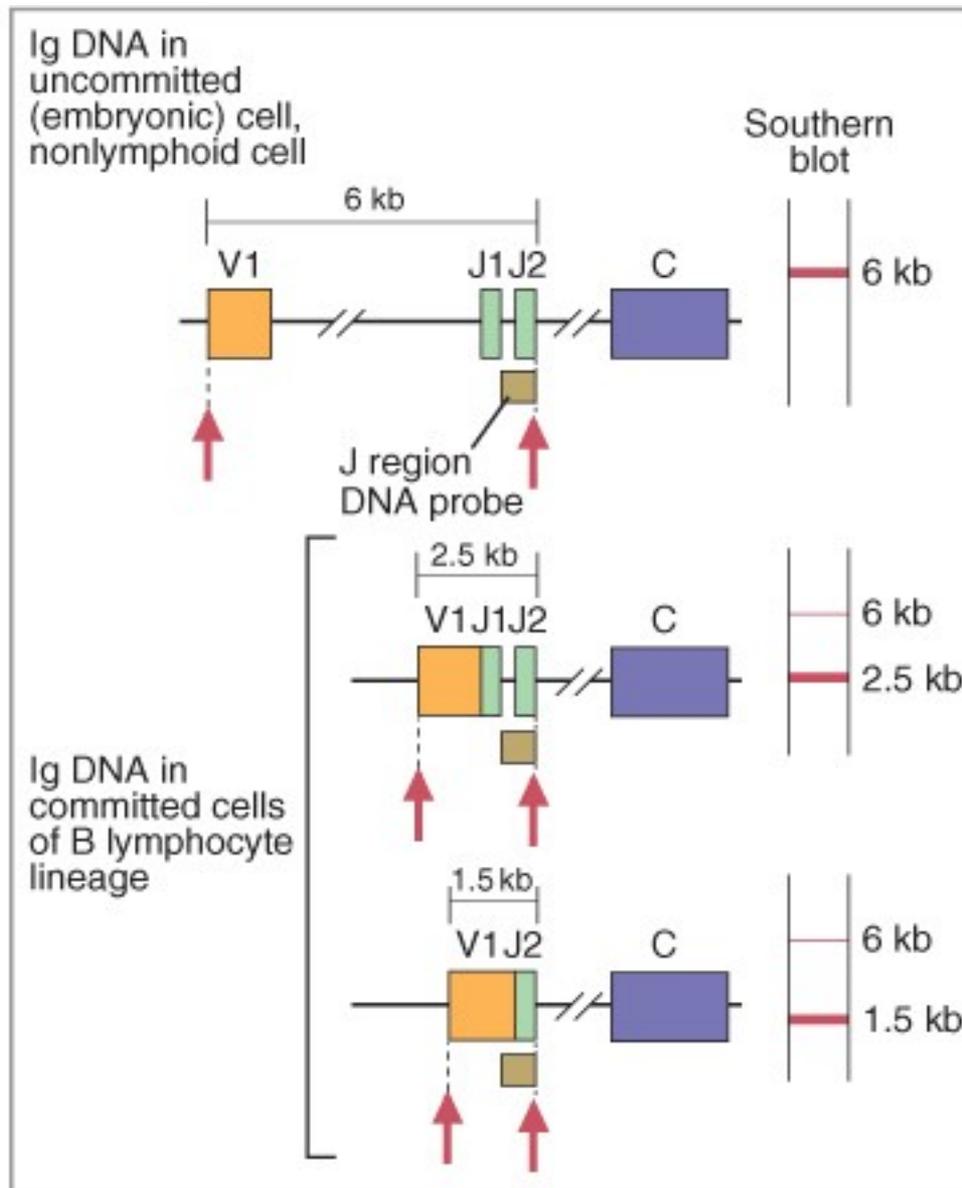
	CDR1	CDR2	CDR3
FLESSIBILITA' GIUNZIONALE			Giunzione VJ Giunzioni VDJ
AGGIUNTA NUCLEOTIDI P			+
AGGIUNTA NUCLEOTIDI N			+
IPERMUTAZIONE SOMATICA	+	+	+



Sebbene il linfocita B sia diploide esso esprime i geni riarrangiati della catena pesante e della catena H leggera di un solo cromosoma (esclusione allelica)







Le diverse teorie sulla generazione della diversità

- **Beadle e Tatum 1941: 1gene-1proteina**
- **Teoria della linea germinale:** *genoma della delle cellule germinali contiene un vasto repertorio di geni immunoglobulinici (15% del genoma).*
- **Teorie della variabilità somatica:** *Specificità Ab originate da meccanismi di mutazione o ricombinazione che avvengono nelle cellule somatiche.*
- **Dreyer e Bennet 1965:** *ogni catena anticorpale è codificata da almeno 2 geni: 1V e 1C*

TABELLA 9-1 LE FAMIGLIE MULTIGENICHE DEL TCR NELL'UOMO

Gene	Localizzazione cromosomica	N. di segmenti genici			
		V	D	J	C
Catena α	14	50		70	1
Catena δ	14	3	3	3	1
Catena β	7	57	2	13	2
Catena γ	7	14		5	2

* I segmenti genici della catena δ sono localizzati tra i segmenti V_α e J_α .

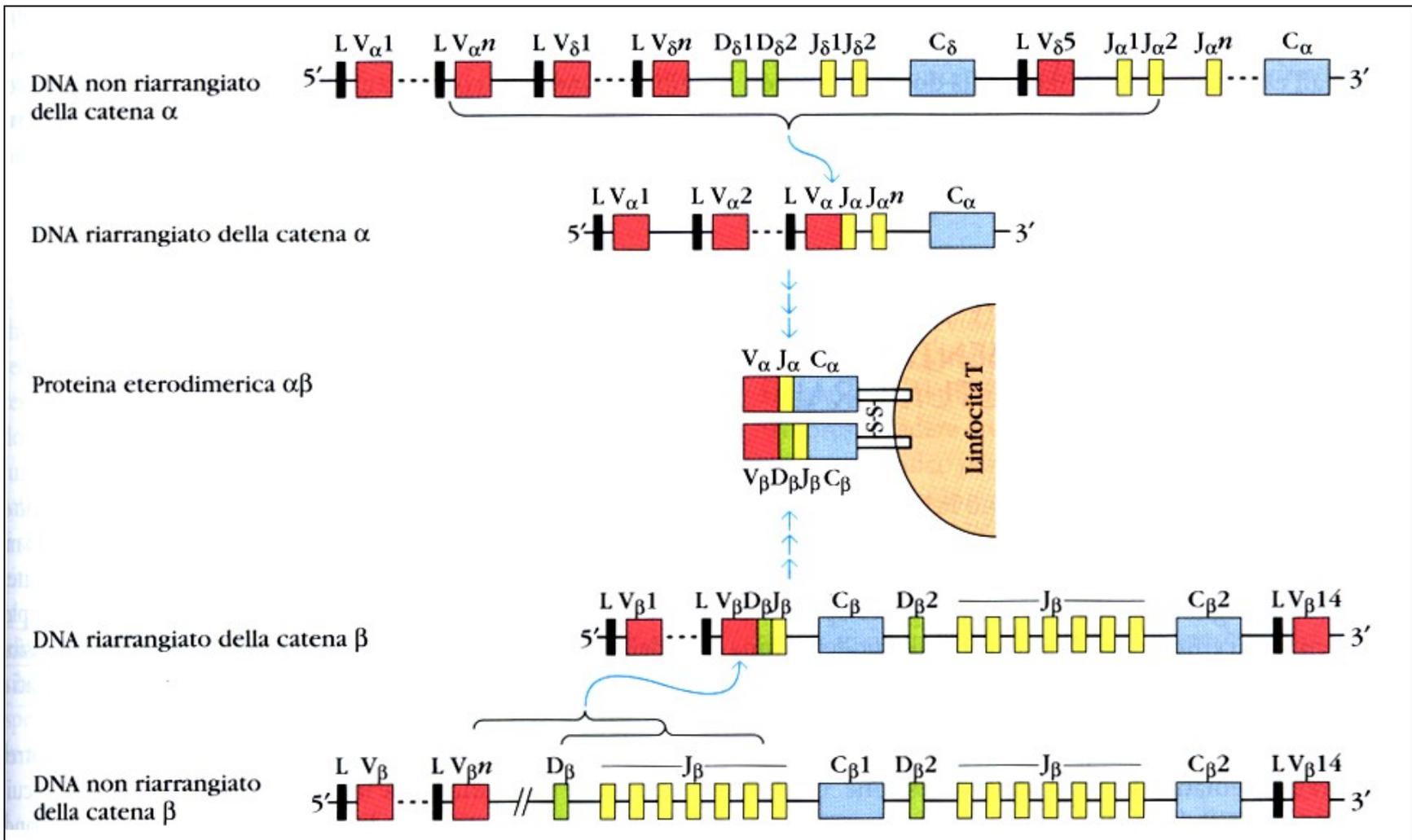
† Vi sono due porzioni ripetute, ognuna contenente 1 segmento D_β , 6 o 7 J_β e 1 C_β .

‡ Vi sono due porzioni ripetute, ognuna contenente 2 o 3 segmenti J_γ e 1 C_γ .

Fonte: Dati tratti da P. A. H. Moss et al., 1992, *Annu. Rev. Immunol.* 10:71.

TCR $\alpha\beta$ 85-95%

TCR $\gamma\delta$ 15-5%



TCR $\alpha\beta$ 85-95%

TCR $\gamma\delta$ 15-5%

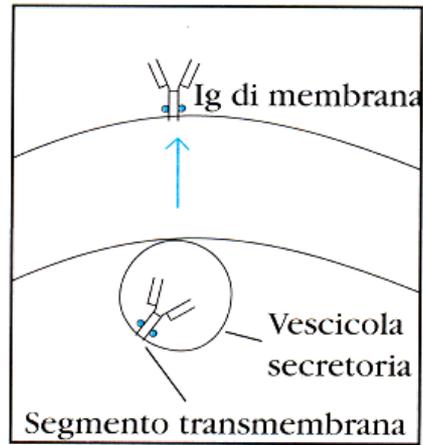
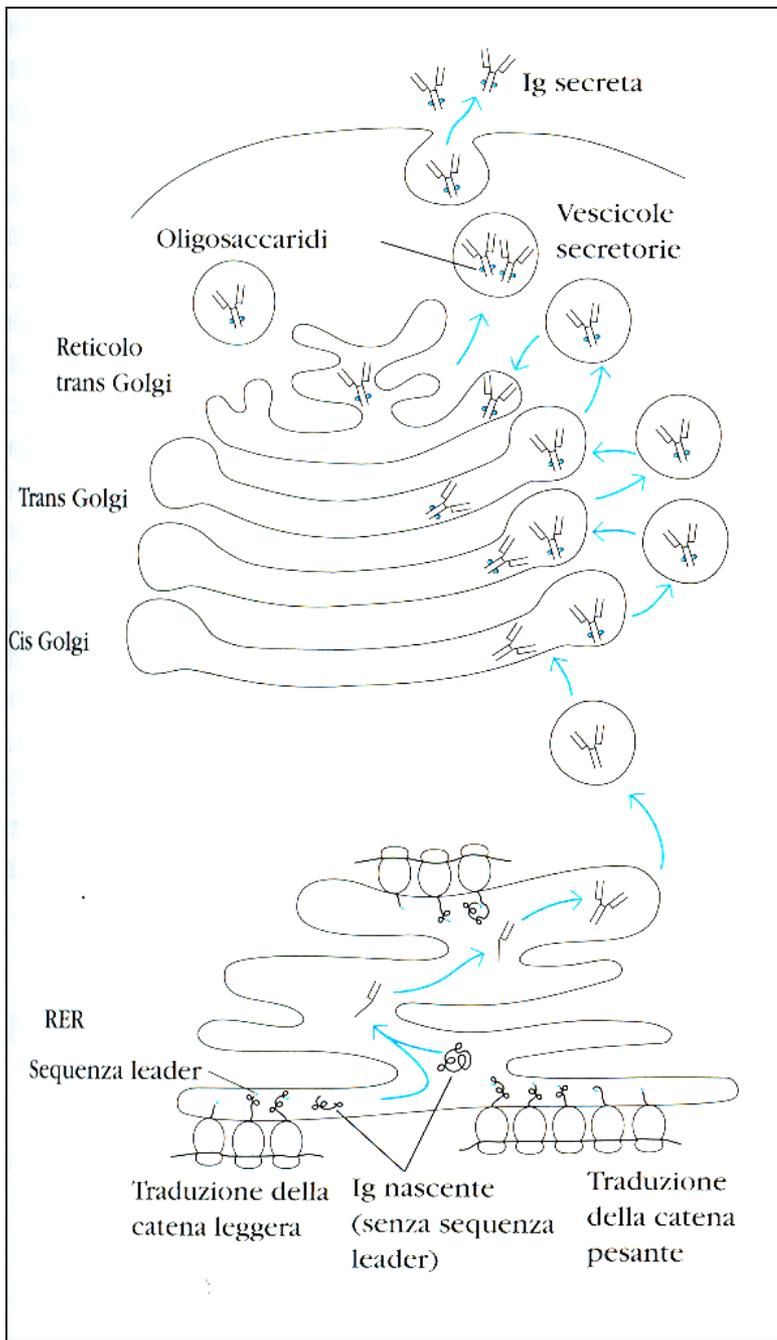
POSSIBILI MECCANISMI DELLA GENERAZIONE DELLA DIVERSITÀ NEI GENI MURINI DELLE IMMUNOGLOBULINE E DEL TCR

Meccanismo di diversità	Immunoglobuline		TCR $\alpha\beta$		TCR $\gamma\delta$	
	Catena H	Catena κ	Catena α	Catena β	Catena γ	Catena δ
Numero stimato di segmenti						
Segmenti genici non riarrangiati multipli						
V	134	85	100	25	7	10
D	13	0	0	2	0	2
J	4	4	50	12	3	2
Numero di combinazioni possibili*						
Giunzione combinatoria V-J e V-D-J	$134 \times 13 \times 4$ $= 7 \times 10^3$	85×4 $= 3,4 \times 10^2$	100×50 $= 5 \times 10^3$	$25 \times 2 \times 12$ $= 6 \times 10^2$	7×3 $= 21$	$10 \times 2 \times 2$ $= 40$
Giunzione alternativa dei segmenti genici D	-	-	-	+ (talvolta)	-	+ (spesso)
Flessibilità giunzionale	+	+	+	+	+	+
Aggiunta di nucleotidi N [†]	+	-	+	+	+	+
Aggiunta di nucleotidi P	+	+	+	+	+	+
Mutazione somatica	+	+	-	-	-	-
Associazione combinatoria delle catene		+		+		+

* Il (+) indica che il meccanismo contribuisce significativamente alla diversità, ma in modo non quantificato.

Il (-) indica che il meccanismo non avviene.

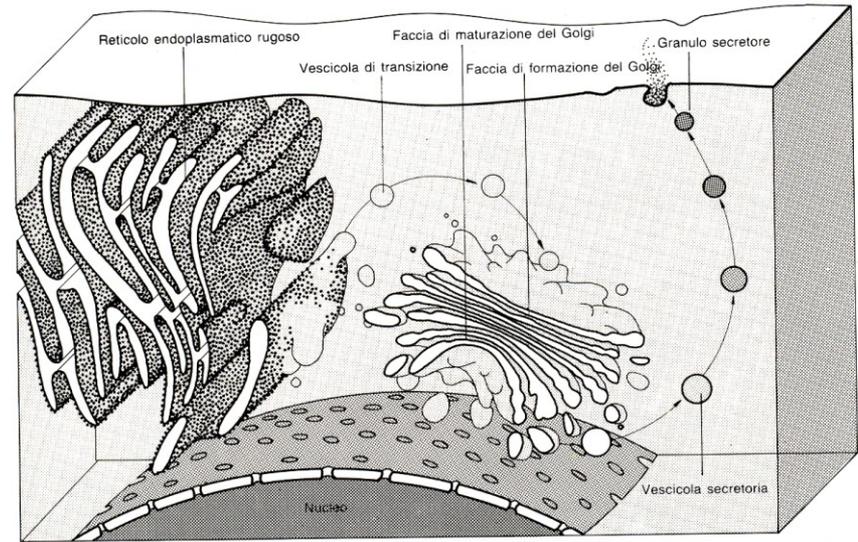
[†] Vedere Figura 9-8d per il numero teorico di combinazioni generate dall'aggiunta di nucleotidi N.



**IgM: H+L
HL+HL**

**IgG: H+H
H2+L
H2L+L**

L dirige le catene nel lume del RER



BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) si lega a molecole Ab non completamente assemblate

Plasmacellule: producono più di mille Ab/sec

AID

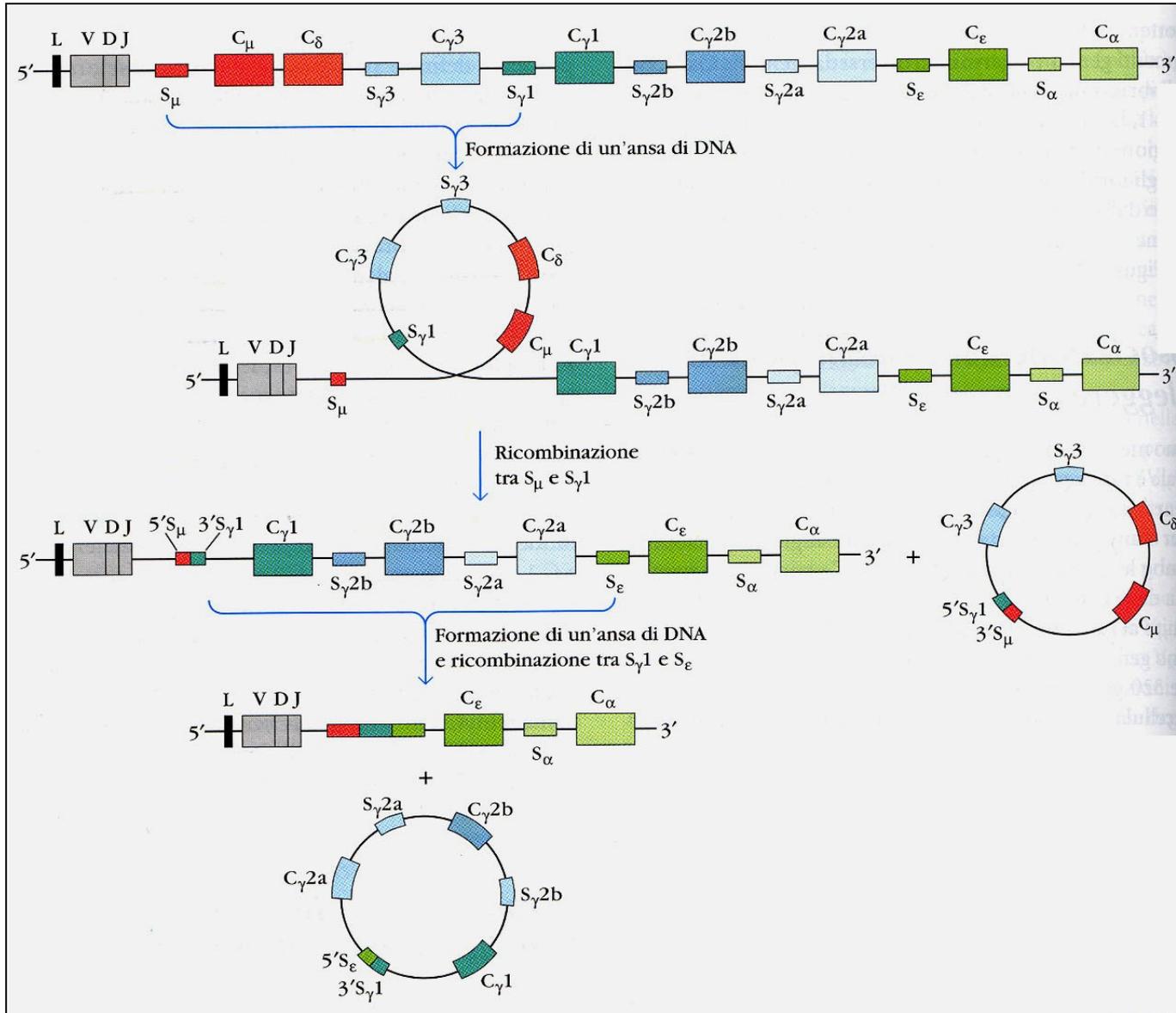
(Activation induced deaminase)

- Enzima chiave del processo di scambio isotipico e maturazione per affinità.
- La sua espressione è regolata dal CD40
- Deficit di AID inducono patologia caratterizzata da mancanza di scambio isotipico e maturazione per affinità

Sindrome da Iper-IgM

Stimolazione Ag

SWITCH ISOTIPICO



**ENZIMA
CHIAVE:**

AID

AID

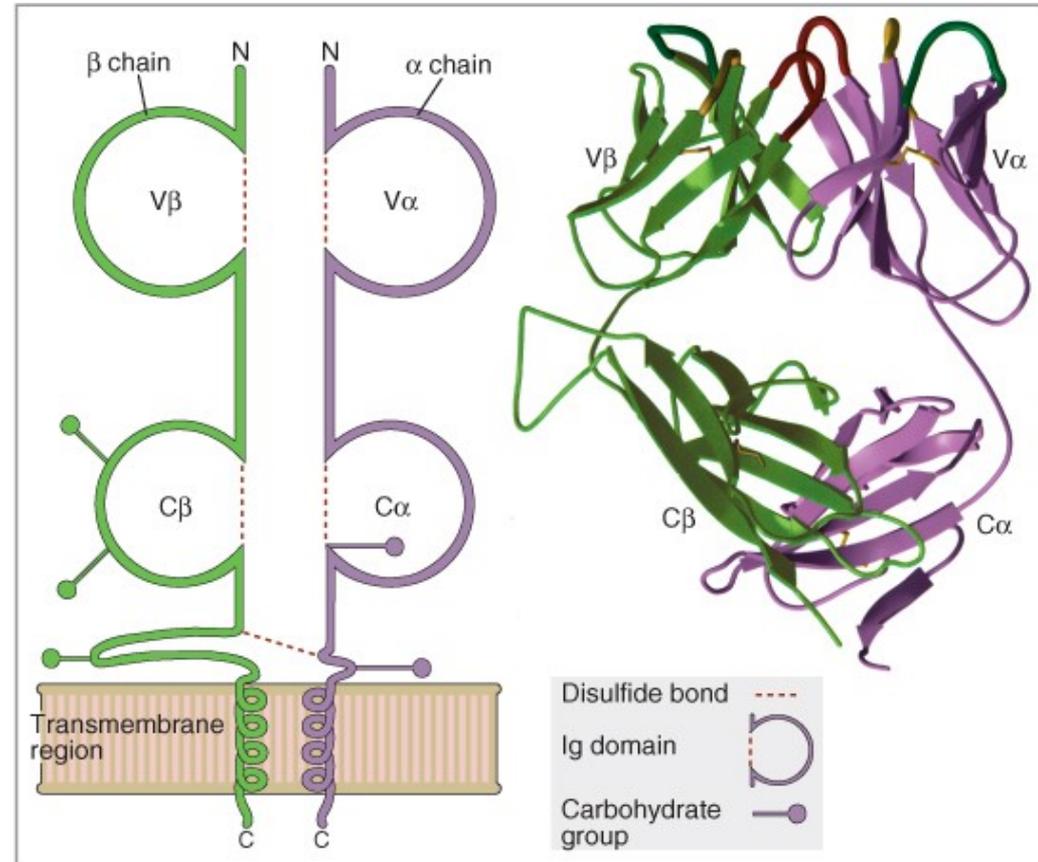
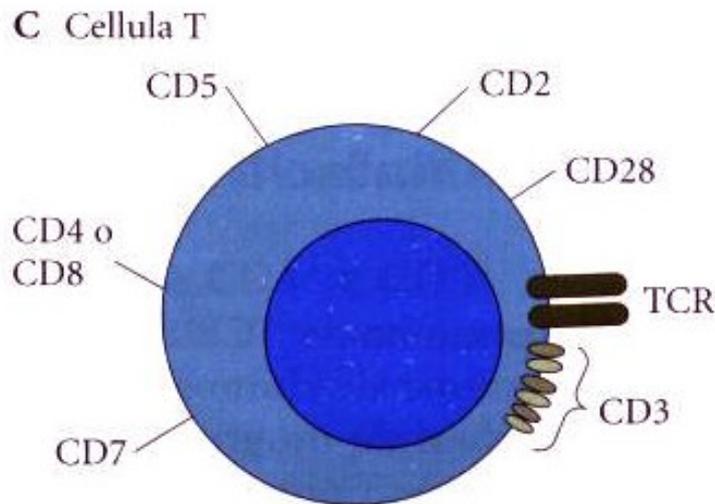
- AID è collegata ad enzimi che deaminano citosina a uracile del DNA
- Quando AID deamina residui nella regione V delle Ig vengono iniziate le ipermutazioni somatiche
- Quando i residui di citidina vengono deaminate nelle regioni di conversione viene iniziata la conversione di classe
- Riparazione per escissione di base o riparo del mismatch

Conclusions

- l' **esistenza nello stesso anticorpo di una parte variabile ed una costante;**
- l' **esistenza della enorme variabilità (diversità) del sito combinatorio; il repertorio anticorpale è dato da tutte le specificità anticorpali disponibili in un individuo. Nell' uomo, diversità totale $> 10^{11}$.**
- l' **esistenza di diversi isotipi con la stessa specificità nella regione variabile.**

Marcatori delle principali popolazioni e sottopopolazioni dei linfociti T:

T Cell Receptor (TCR)

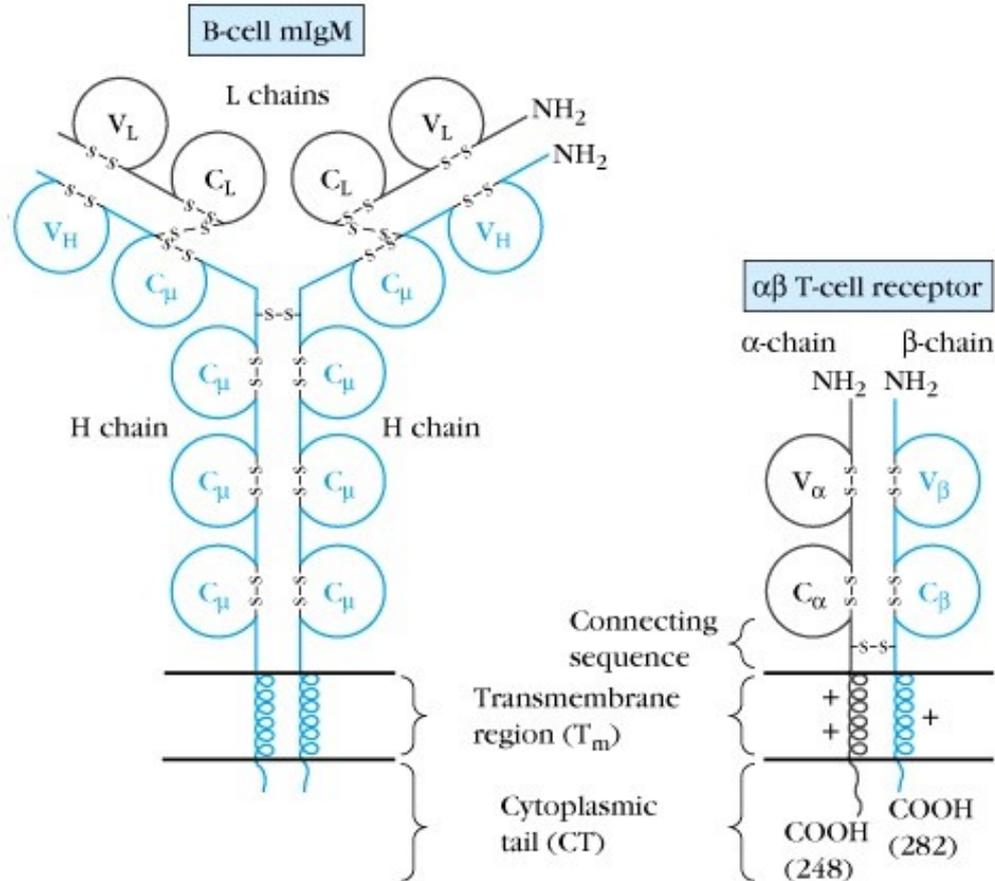


TCR-2 (α e β) 85-95%

TCR-1 (γ e δ) 15-5%

Maturazione linfociti T e B:

1. Riarrangiamento genico

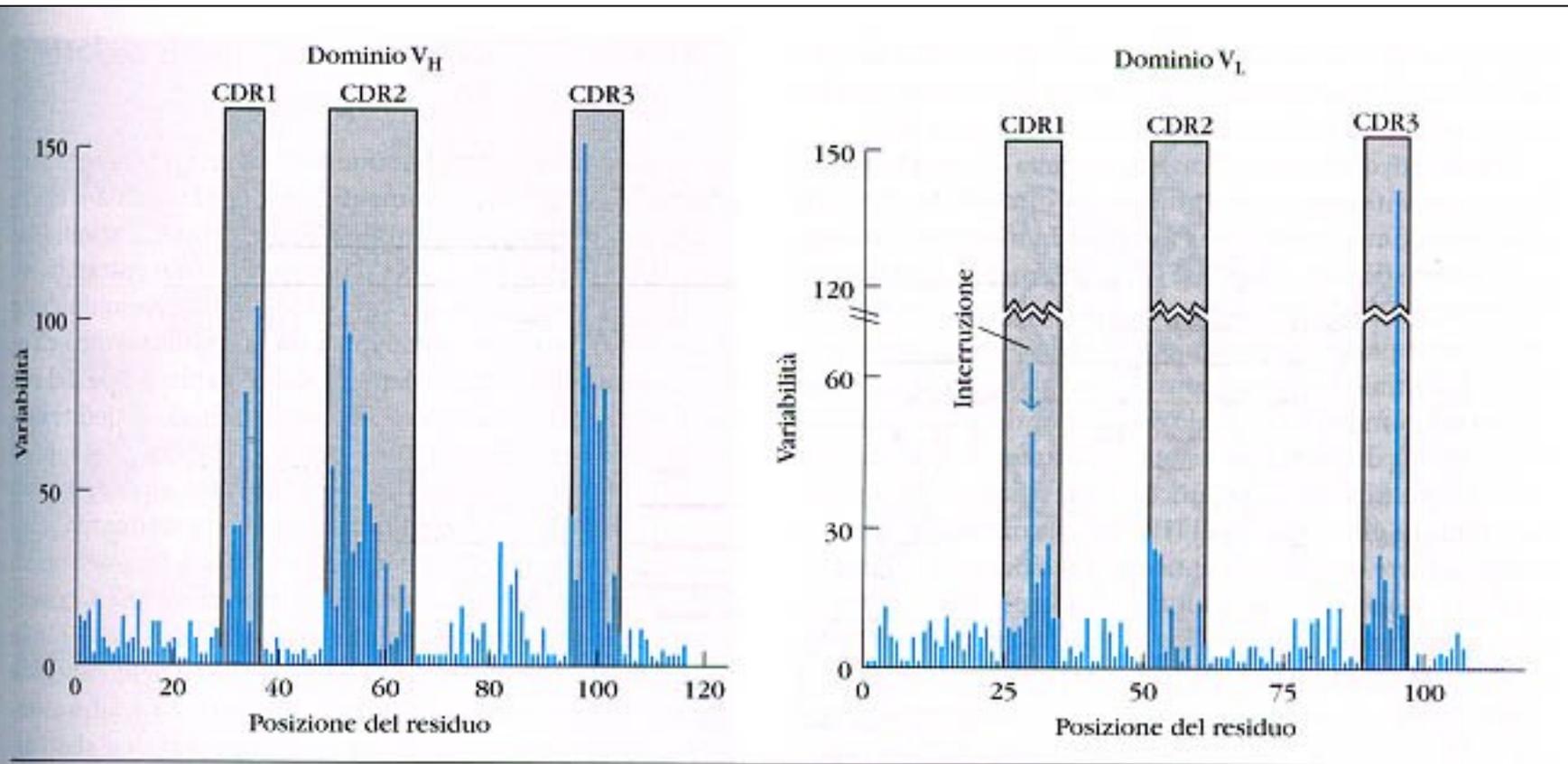


3 quesiti per la comprensione

- l'esistenza nello stesso anticorpo di una parte variabile ed una costante;
- l'esistenza della enorme variabilità (diversità) del sito combinatorio; il repertorio anticorpale è dato da tutte le specificità anticorpali disponibili in un individuo. Nell'uomo, diversità totale $> 10^{11}$.
- l'esistenza di diversi isotipi con la stessa specificità nella regione variabile.

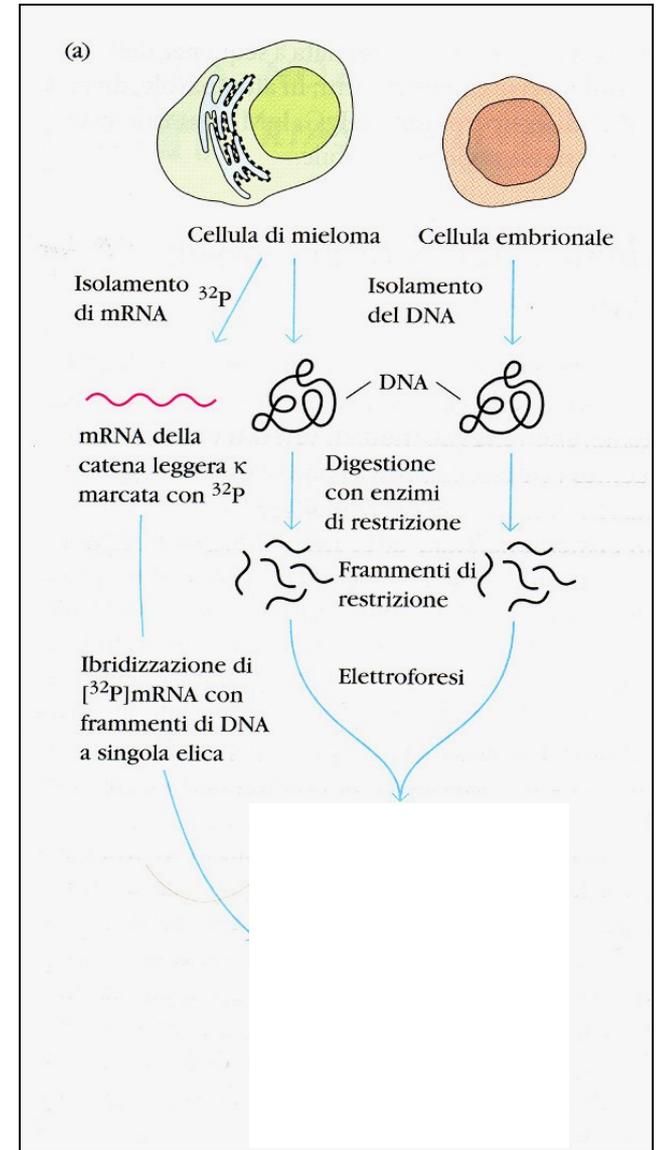
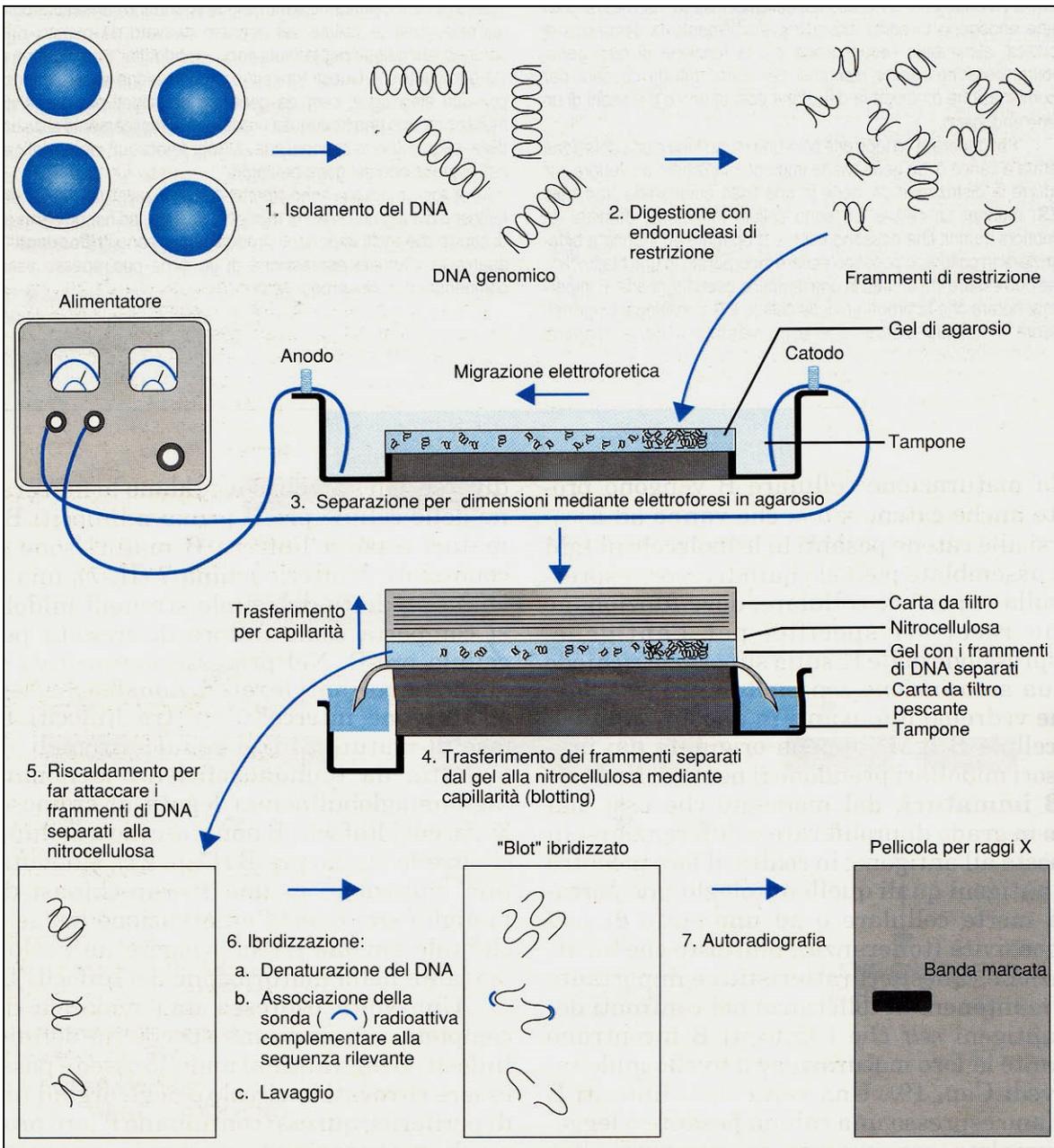
IPERMUTAZIONE SOMATICA

(Sostituzioni nucleotidiche)



- Altera la specificità delle Ig codificate

1976 S. Tonegawa (premio Nobel 1987), N. Hozumi:



Ibridizzazione secondo southern