

Gli anticorpi e la diversità immunitaria

ANTIGENI

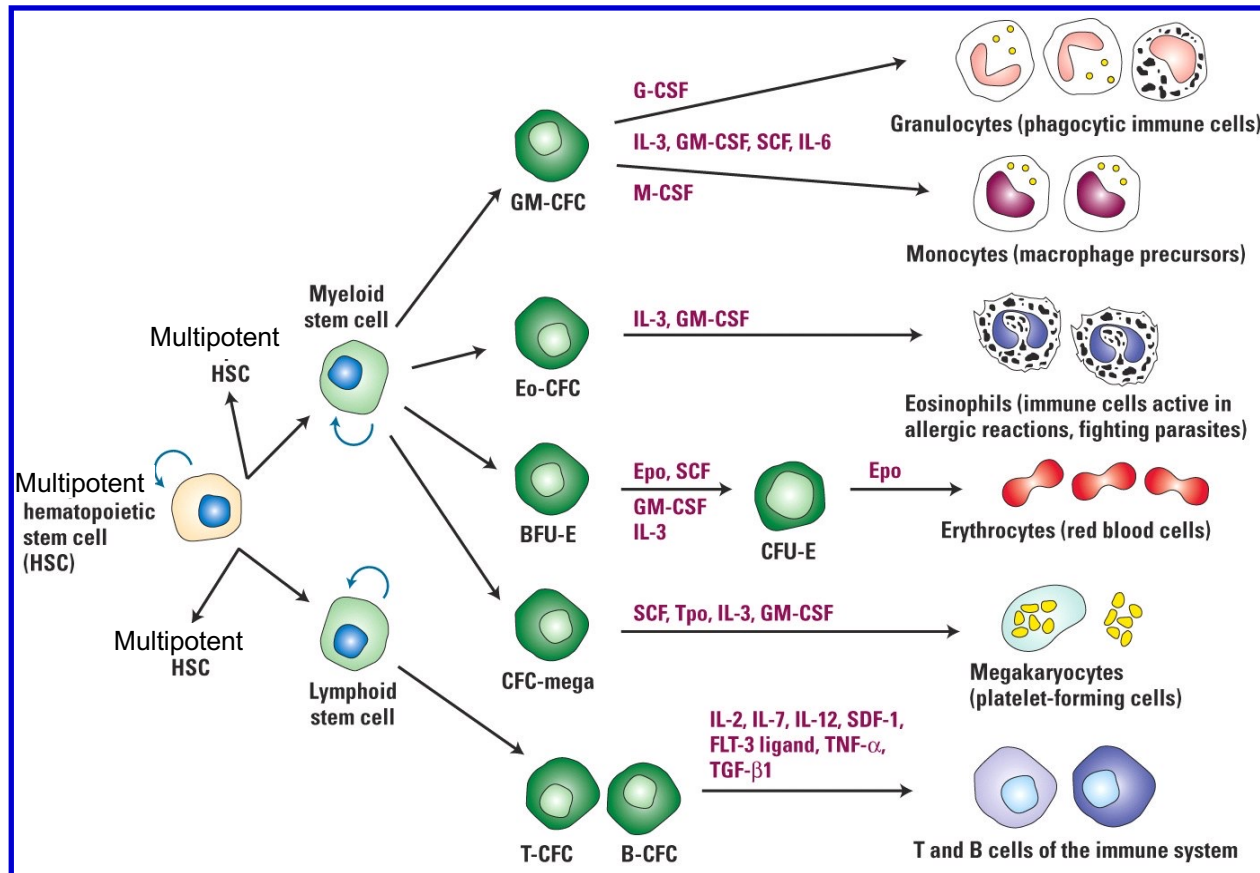
- Le sostanze in grado di indurre una risposta immunitaria sono chiamate antigeni o immunogeni.
- Per proteggersi da malattie infettive il SISTEMA IMMUNITARIO (SI) deve essere in grado di riconoscere batteri e prodotti batterici (tossine) funghi, parassiti e virus come immunogeni.
- Il SI riconosce particolari macromolecole di un agente infettivo, di solito proteine (piu' potente immunogeno) o polisaccaridi..
- Lipidi e acidi nucleici non sono molto immunogenici, a meno che non siano complessati a proteine o polisaccaridi.

Antigeni/Immunitari

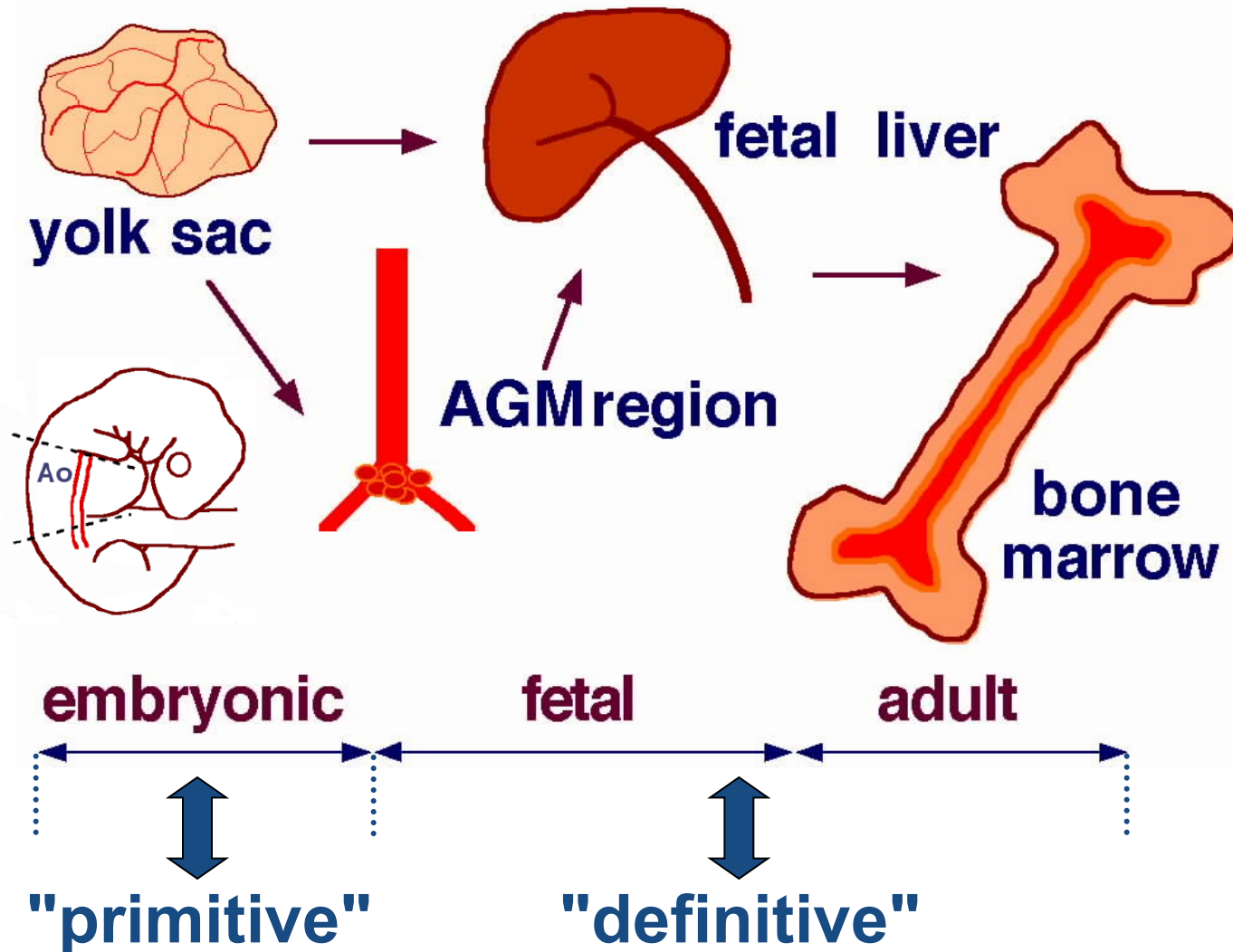
Iniziatori della risposta Immunitaria

- Il sistema immunitario riconosce gli antigeni (Ag) i due principali modi.
 - Gli Ag sono riconosciuti dagli Anticorpi (Ab) prodotte dai linfociti B nel loro stato nativo
 - Oppure sono riconosciuti dalle cellule T quando frammentati.
- Il SI deve proteggere contro microorganismi vivi specie se producono sostanze tossiche. Gli Ab neutralizzano sostanze tossiche e le rimuovono dal sistema o legandole le bloccano. Gli anticorpi scatenano inoltre un processo di eliminazione mediato da cellule (fagocitosi) che uccide il parassita.
- Il SI deve anche proteggere contro parassiti che vivono o si nascondo nella cellula. Questi sono riconosciuti dalle **cellule T** mediante un sistema mediato dal recettore delle cellule T , il Major Histocompatibility Complex (MHC), complesso maggiore di istocompatibilità, e processamento dell'antigene. Con il suo recettore T, la cellula T controlla la superficie delle cellule in cerca di peptidi antigenici presentati e complessati da molecole di MHC.

Hematopoietic Stem Cells of the Bone Marrow: multipotent stem cells



Shifts in site of hematopoiesis during development



Primitive versus definitive hematopoiesis

Primitive

Definitive

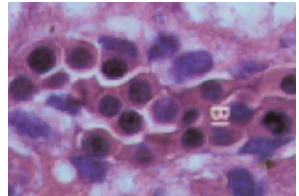
Site of production

Yolk sac

Yolk sac
AGM
Fetal liver
Bone marrow



Lineages



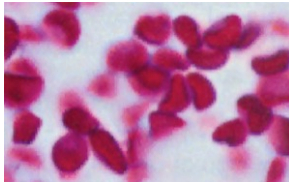
Embryonic globin genes

*** Primitive erythroblasts

Megakaryocytes
Macrophages

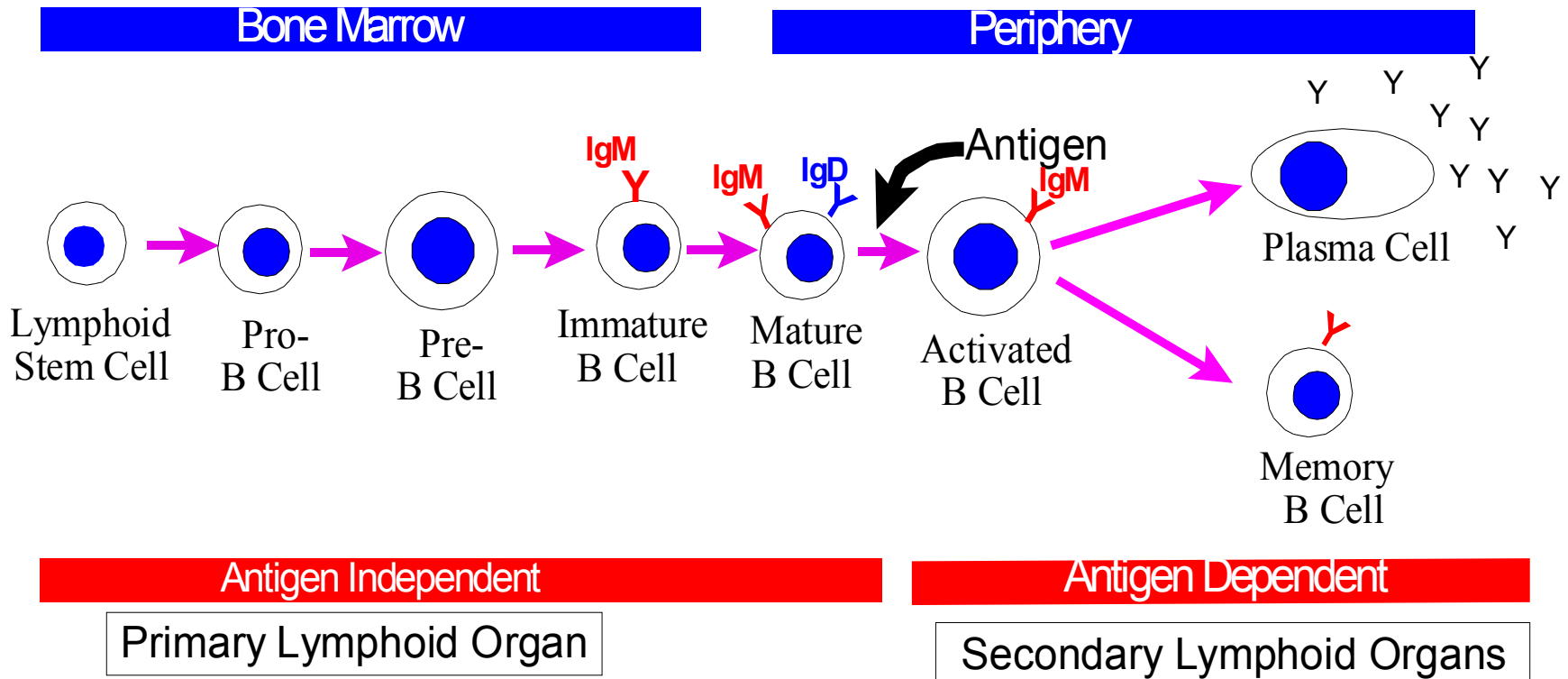
Definitive erythroid cells

All other hematopoietic lineages

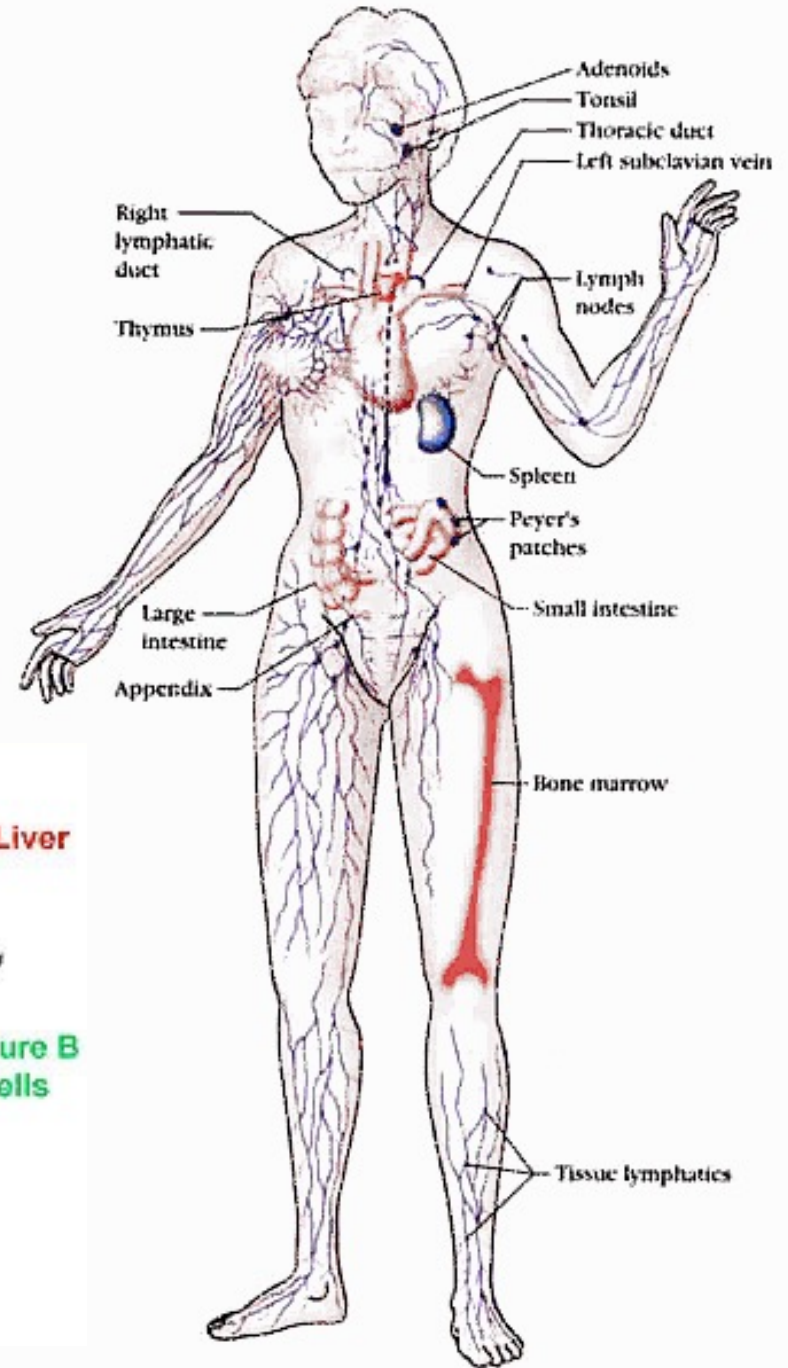


Fetal and adult type globin genes

Overview of B-Cell Development



ORGANI LINFATICI



Bone Marrow
Thymus

Bone Marrow
(primary reticular cells)

Fetal Liver

Mature T
Cells

Secondary Lymphoid Tissue:
Lymph Nodes and Lymphatic System
Spleen
Mucosal Associated Lymphoid
Tissue
Adult Bone Marrow

Mature B
Cells

Generazione dei recettori degli Antigeni

- L'espressione del recettore dell'antigene e' l'evento definitivo ed essenziale nello sviluppo di linfociti T e B.
- I recettori per l'antigene sono il mezzo in cui la cellula sente la presenza dell'antigene nell'ambiente..
 - le Immunoglobuline o anticorpi nelle B
 - il TCR (T cell receptor) per le T
- Il repertorio di recettori e' ottenuto mediante un complesso ed elegante meccanismo.
- Il meccanismo di generazione della diversita' e comune a B e T e coinvolge enzimi comuni.

- Il recettore prodotto da ogni linfocita ha un'unica specificità per un singolo antigene determinato dalla struttura del suo recettore.
- L'ampia gamma della specificità antigenica e' dovuta a variazione di sequenza di aminoacidi in particolari regioni del recettore.
- Ogni individuo possiede miliardi di linfociti, che forniscono all'individuo la capacità di rispondere ad una grande varietà di antigeni.
- Nel recettore oltre alla parte variabile esiste una parte costante, che funge da regione effettrice.

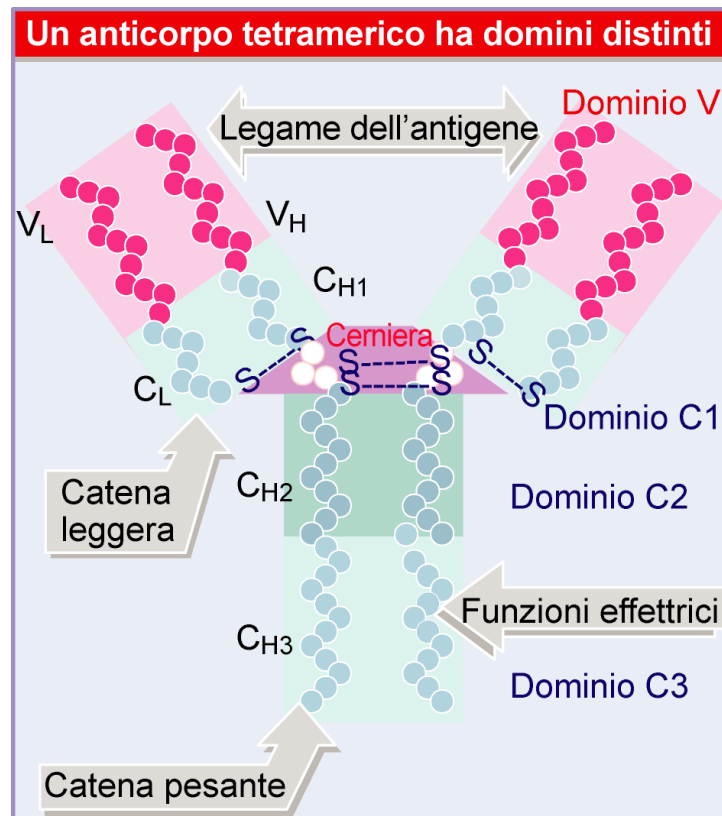
Gli anticorpi

Sono glicoproteine

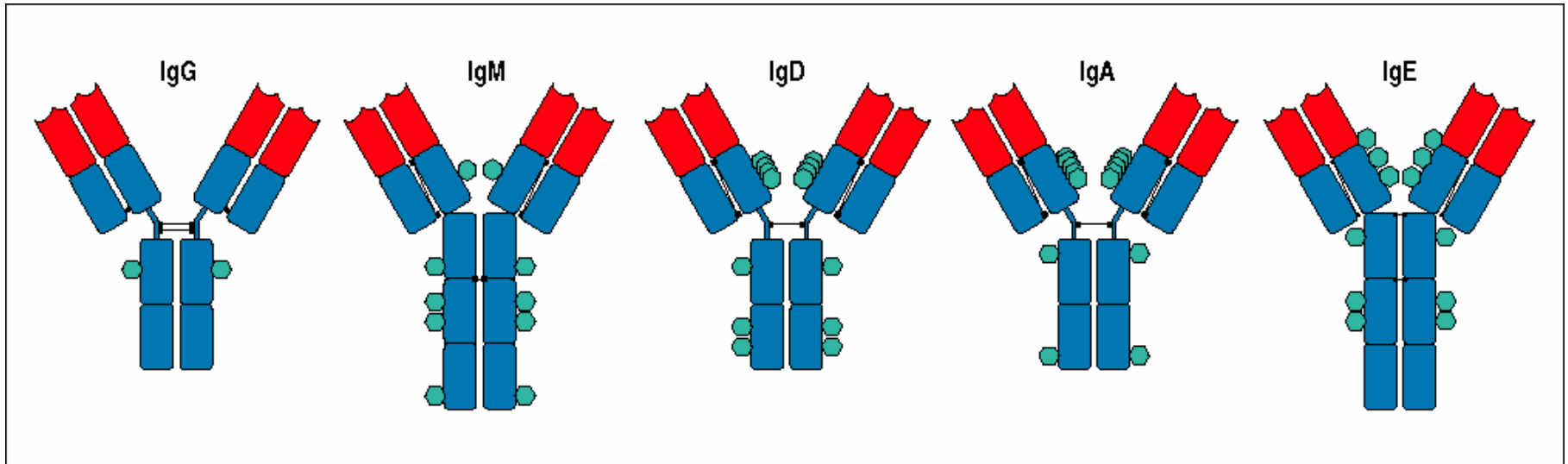
Sono costituiti da 2 subunita':

2 identiche catene leggere **light chains (L chains)**, circa 200 aminoacidi

2 identiche catene pesanti **heavy chains (H chains)**, circa 2 volte le catene L



Tutte le classi di Ab hanno la stessa struttura di base.

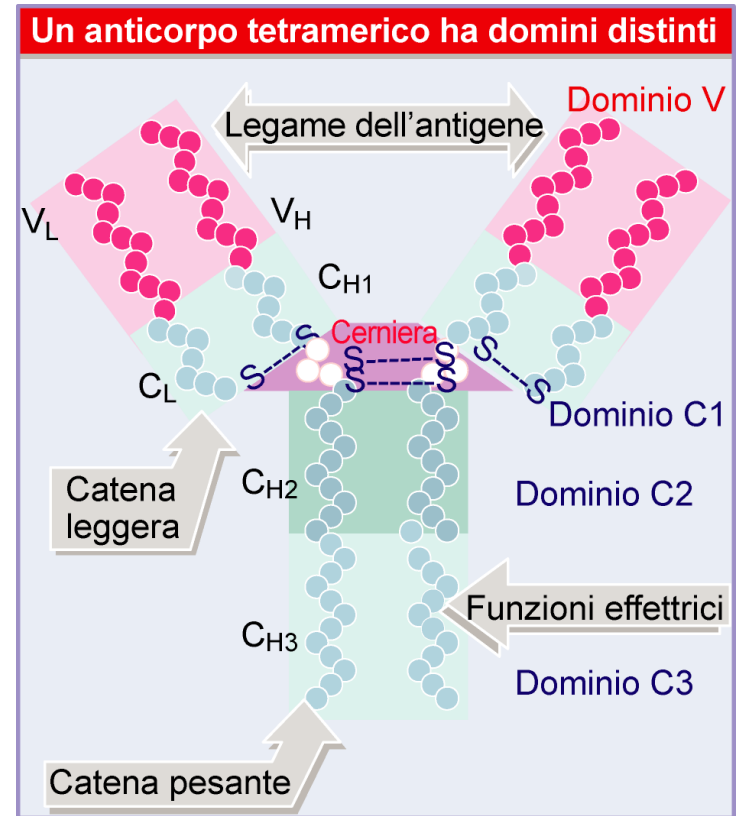


Organizzazione strutturale degli isotipi di immunoglobuline umane

Classi o isotipi

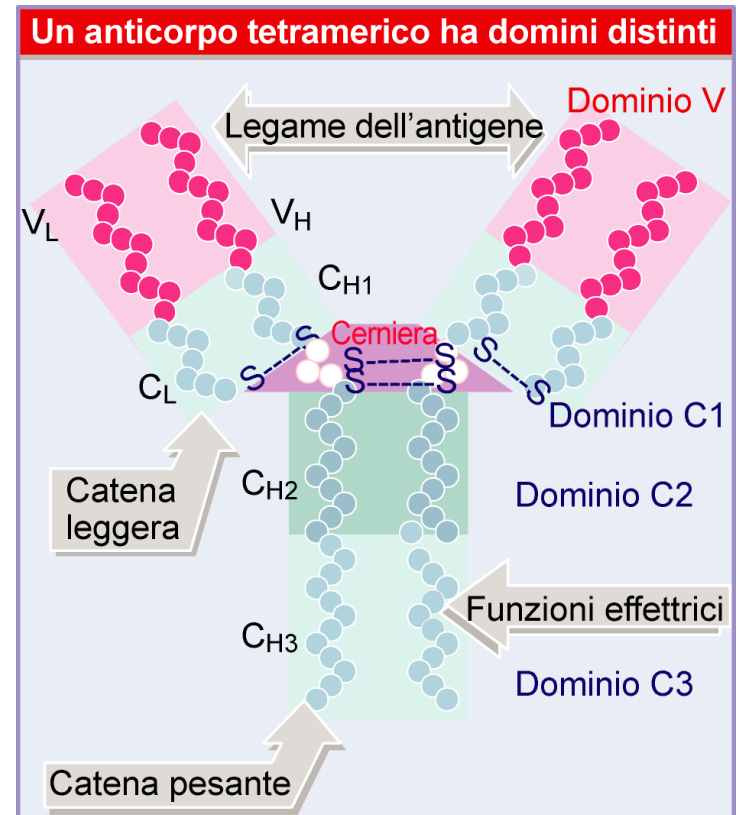
Gli Anticorpi

- I primi 100 aa all' N-term di catene H e L varia grandemente tra anticorpo e anticorpo –**variable (V) regions**
- Non ci sono 2 B cells (a meno che non siano parte dello stesso clone) che secerna anticorpi con la stessa V region
- La sequenza aa della V regions e' soprattutto variabile in **3 hypervariable regions** chiamate anche **CDR's**
- La struttura terziaria e quaternaria degli anticorpi porta le regioni CDR di H e L chain insieme a formare la regione di legame all'antigene **antigen binding site** che lega l'epitopo



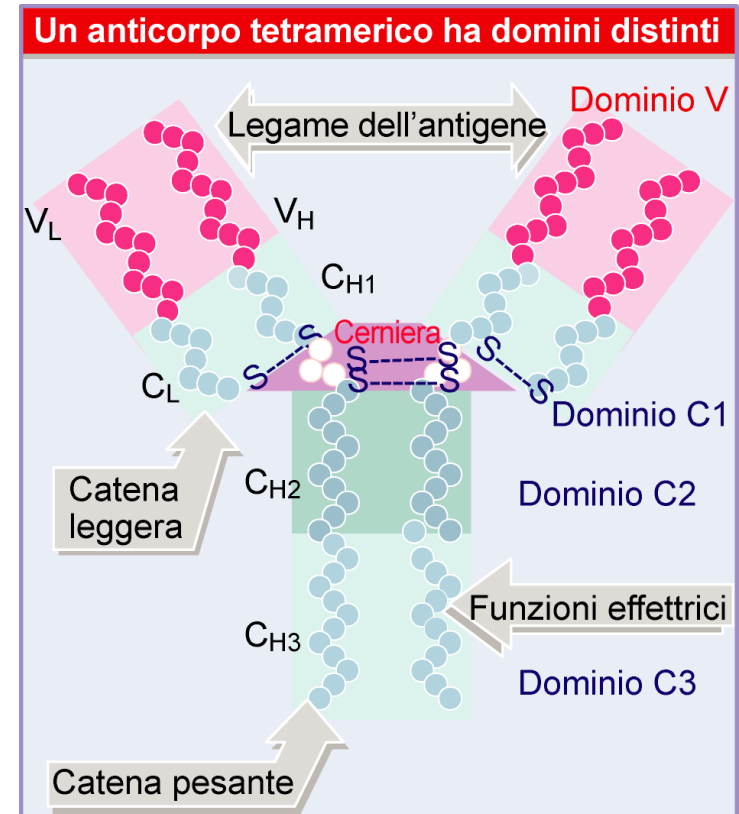
Gli anticorpi

- Solo alcuni aa invece sono diversi nel C-term di H and L chains e si chiamano **constant (C) region, regioni costanti**
 - 2 diverse C regions for L chains -- **kappa (κ)** and **lambda (λ)**
 - 5 diverse C regions for H chains
 - **mu (μ)** chains, **IgM**
 - **gamma (γ)** chains, **IgG**
 - **alpha (α)** chains, **IgA**
 - **epsilon (ϵ)** chains, **IgE**
 - **delta (δ)** chains, **IgD**
 - Ognuna di questi 5 tipi of H chains puo' appaiarsi con lambda or kappa L chains



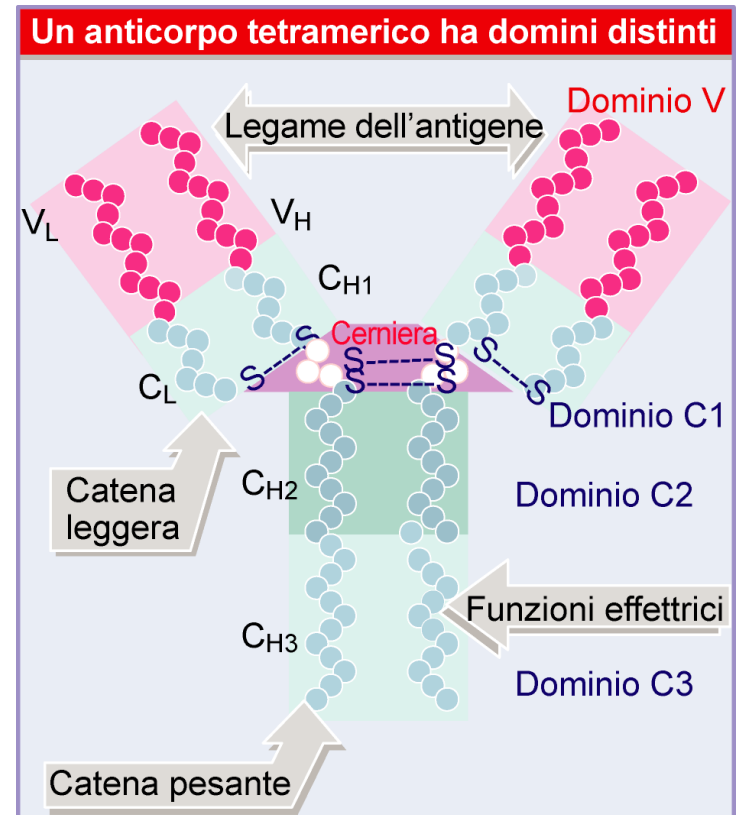
Domini delle regioni costanti

- Le regioni costanti delle catene H sono numerate (C_H1 , C_H2 , C_H3 , and C_H4) a partire dal dominio piu' vicino al dominio V.
- Le regioni costanti delle catene H sono responsabili di molti aspetti delle funzioni anticorpali, inclusa l'interazione con i recettori Fc, responsabili della fissazione del complemento, trasferimento transplacentale, l'abilità di formare multimeri e la capacità di essere secreti attraverso le superfici delle mucose..



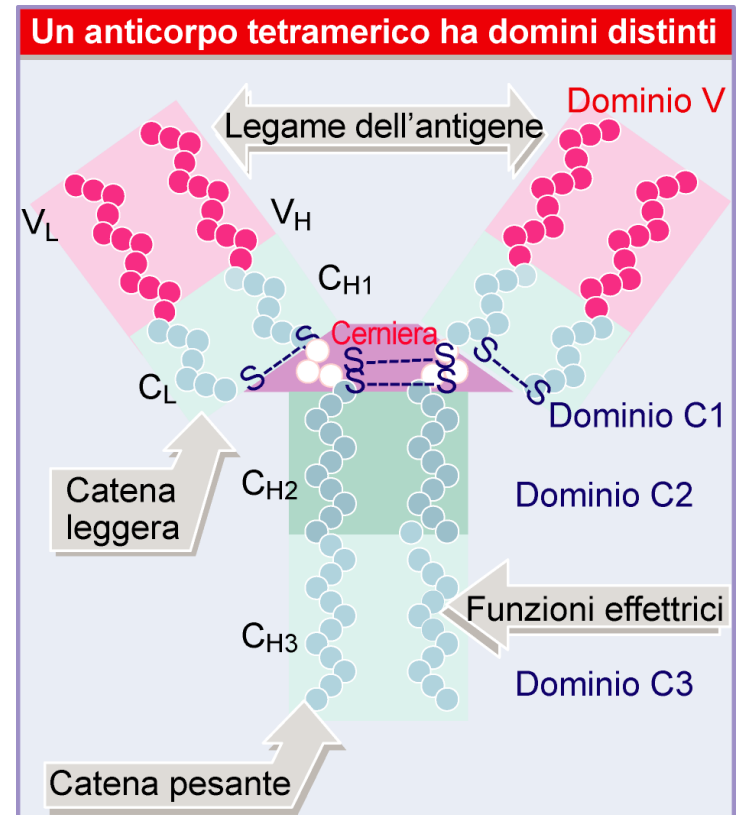
Domini delle regioni costanti

- Diversi isotipi di catene H hanno diversi domini di regioni C e quindi hanno diverse caratteristiche. vary with the class of the particular antibody.
- Esistono 5 principali classi di regioni C delle catene H. (γ , α , μ , δ , ϵ). Quindi c'è una diretta correlazione tra le classi di catene H di un anticorpo e le sue funzioni effettrici: le immunoglobuline sono state nominate in accordo con la rispettiva catena H. IgG, IgA, IgM, IgD and IgE.

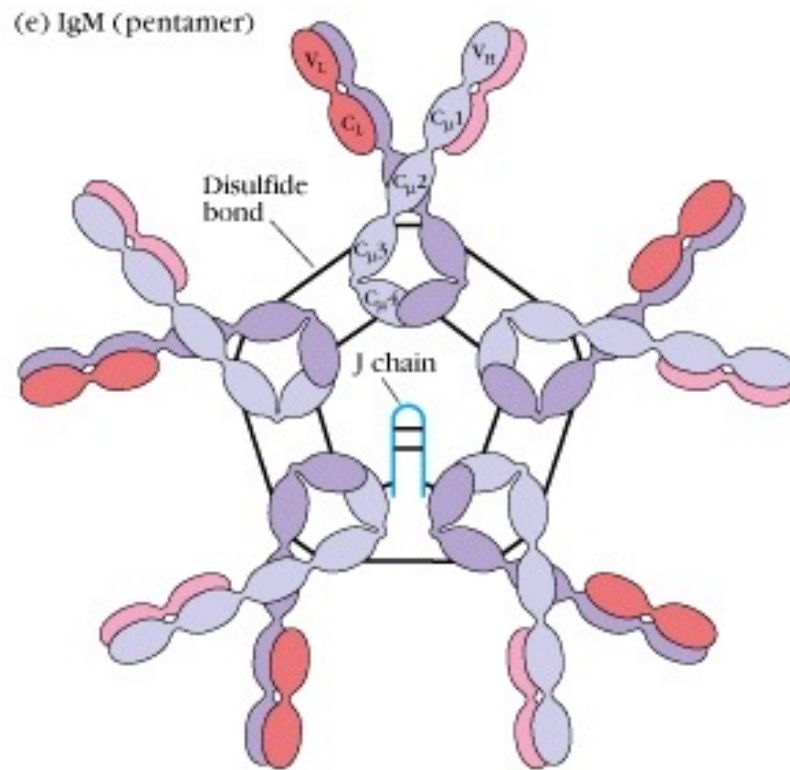
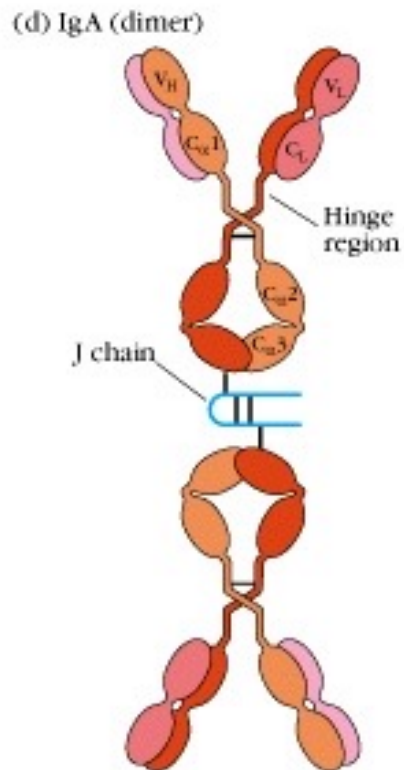
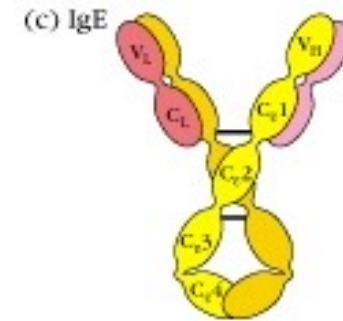
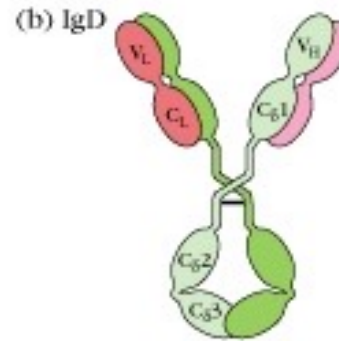
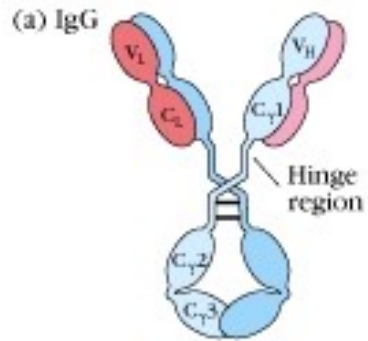


Regione Cerniera

- Le Ig hanno una **hinge region (regione cerniera)** al C-term del dominio C_H1 della loro catena H.
- Nelle catene H degli isotipi μ e ϵ la hinge e' molto allungata, da formare un dominio extra spiegando la presenza di un 4to C domain .
- Gli altri isotipi (γ , α , and δ) hanno come Hinge corte sequenze di aminoacidi che pero' si pensa si siano evoluti da dolla regione $C_{\mu/\epsilon}2$ domain.
- Hinge regions sono codificati da esoni separati.
- La hinge region permette un considerevole grado di flessibilita' tra i componenti antigen-binding and effector-interacting della Ig.

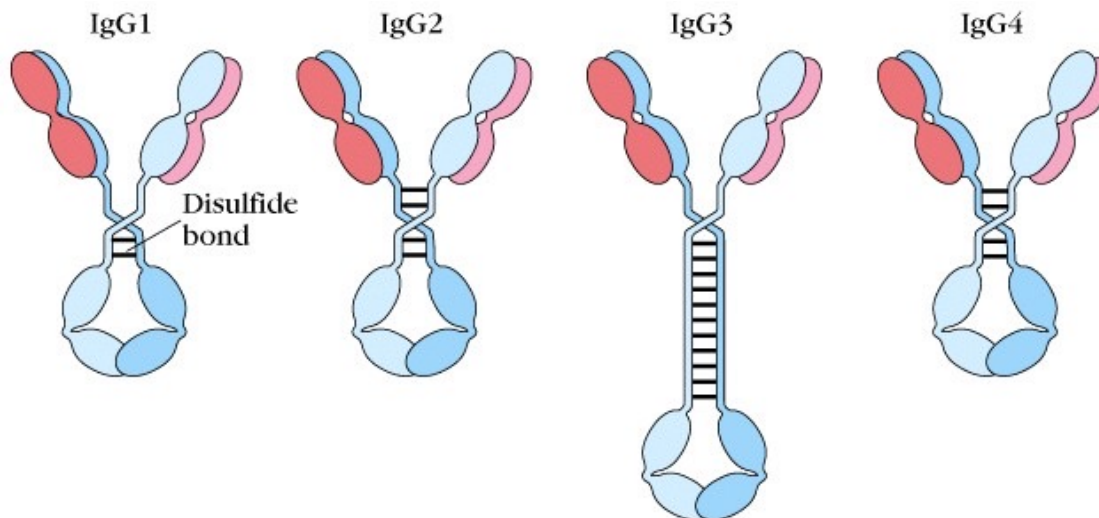


Struttura delle 5 classi di Anticorpi



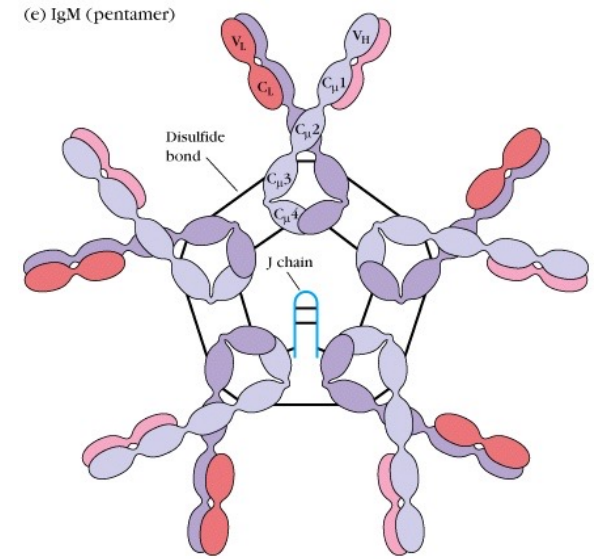
Immunoglobulin G (IgG)

- Classe piu' abbondante nel siero ~80% delle Ig totali.
- IgG si trovano anche negli spazi interstiziali.
- Le IgG consistono di 2 γ H-chains e 2 κ o 2 λ L-chains.
- In uomo e topo 4 sottoclassi di IgG.
- Le IgG fissano il complemento
- Le IgG sono le uniche ad attraversare la placenta.
- IgG reagiscono con i recettori sulle cellule fagocitiche



Immunoglobulin M (IgM)

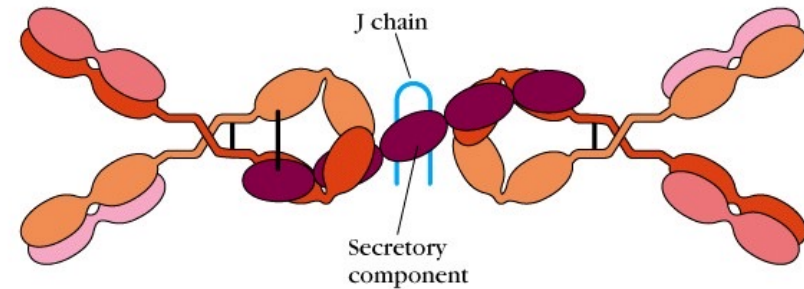
- IgM terza piu' abbondante nel siero.
- IgM secrete da plasmacellule come un pentamero in cui 5 monomeri sono legati da ponti S-S. Ogni pentamero contiene un peptide addizionale, **J** (**joining**) **chain**.



- Molto grossa, escluse dallo spazio interstiziale a meno di danno all'endotelio.
- IgM monomeriche si trovano anche sulle B cells come parte del B-cell antigen receptor.
- IgM e' il primo isotipo ad essere prodotto nella risposta immune primaria e anche nel neonato..
- IgM molto efficiente a fissare il complemento.
- IgM non attraversano la placenta.
- La presenza della J chain permette alle IgM di legarsi a recettori sulle cellule secretorie che le trasportano attraverso il rivestimento epiteliale delle mucose..

Immunoglobulin A (IgA)

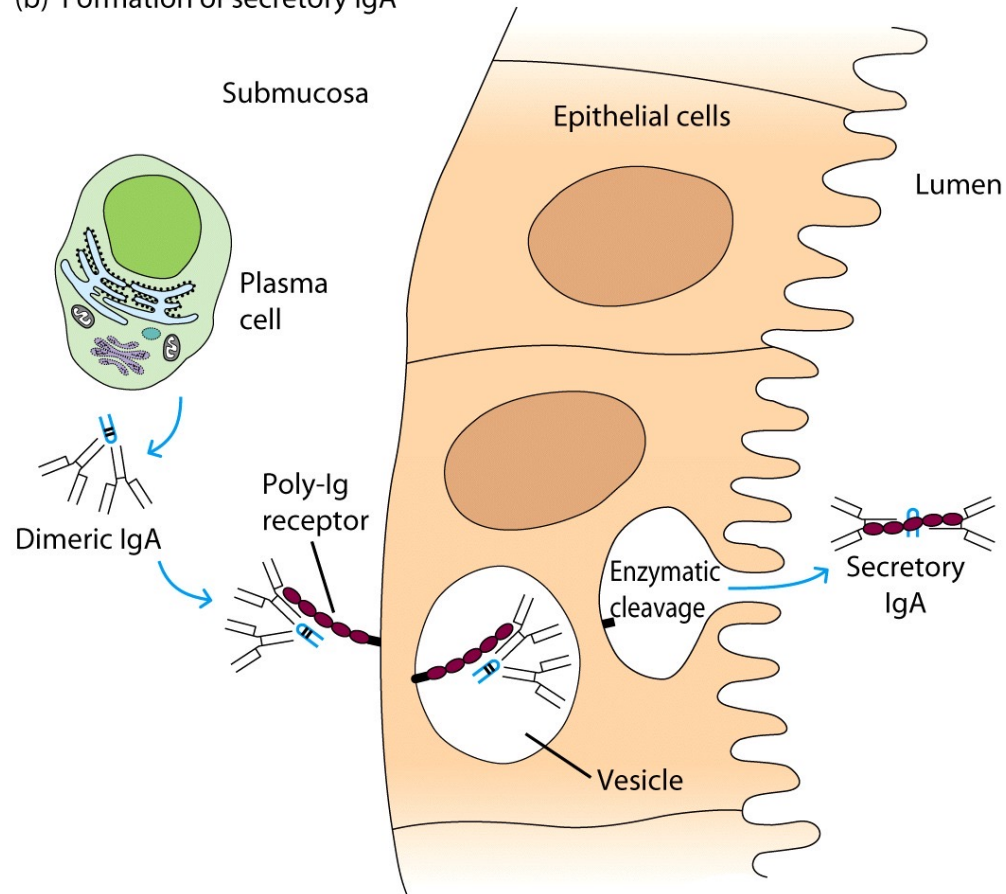
(a) Structure of secretory IgA



- IgA seconda piu' abbondante nel siero.
- IgA piu' abbondante nelle secrezioni esterne, latte, saliva, lacrime, muco del tratto bronchiale , genitourinario, intestinale.
- Nel siero e' un monomero.
- Nelle secrezioni e' un dimero (termed **secretory IgA**).
- Secretory IgA ha una J chain e una catena polipeptidica chiamata **secretory component** derivata dal recettore responsabile del trasporto delle IgA polimeriche attraverso le membrane.

IgA Antibody Transport Across Cell (Transcytosis)

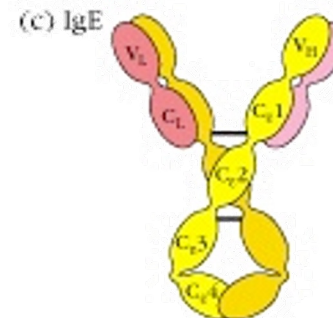
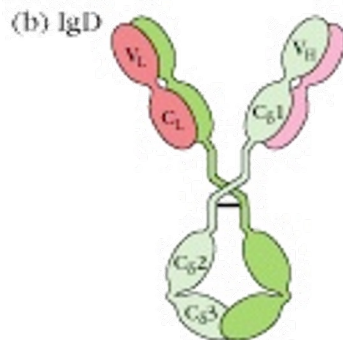
(b) Formation of secretory IgA



Secretions, as dimer or tetramer+J-chain polypeptide+secretory component (Poly IgR)

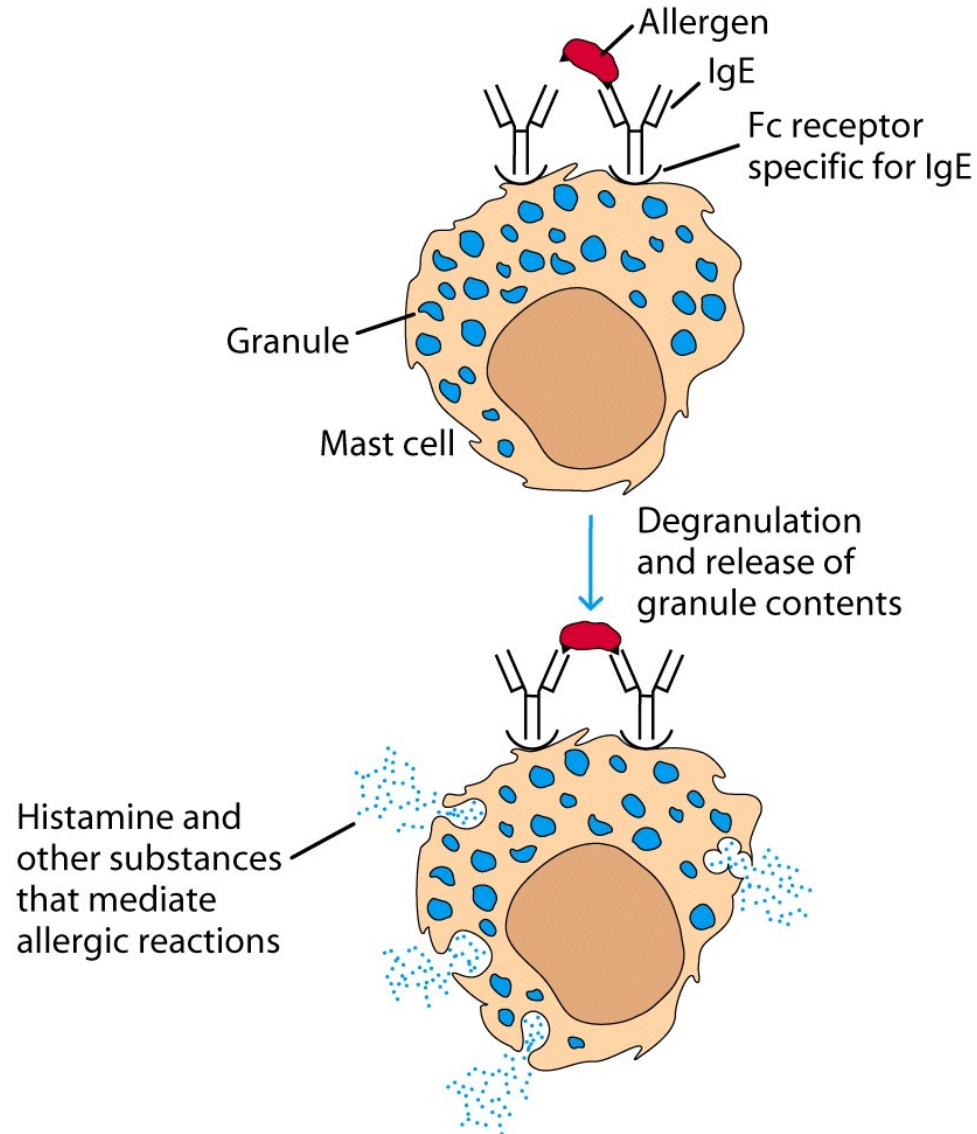
IgD and IgE

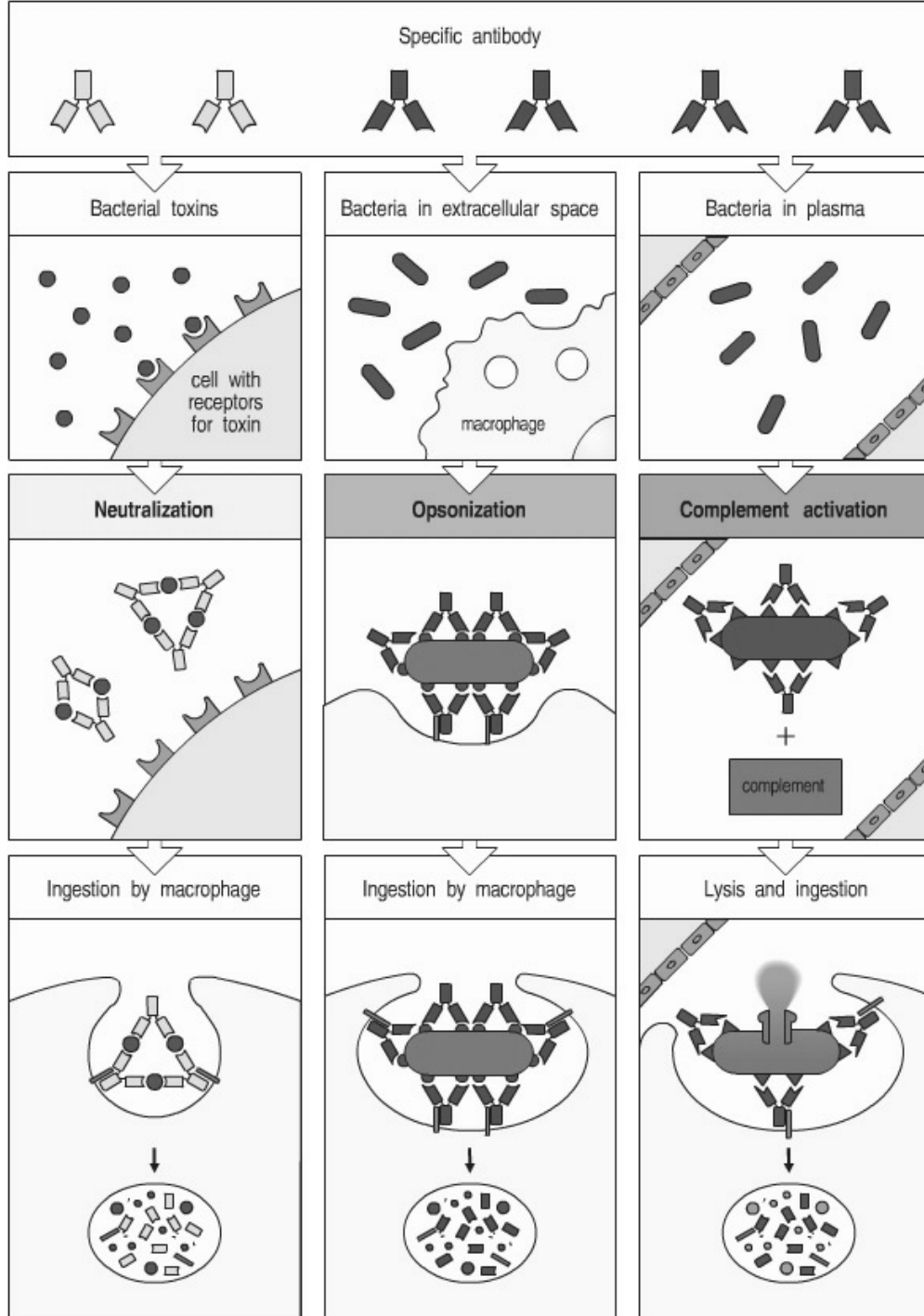
- Ruolo principale delle IgD: (catena H di tipo δ) si trovano sulla superficie alla superficie dei linfociti B e insieme alle IgM media il riconoscimento antigenico delle B cell. Pertanto, esse vengono prodotte prevalentemente in forma di membrana (al contrario di ciò che avviene con le IgM, che vengono prodotte sia in una forma monomerica di membrana sia in una forma pentamerica secretoria). Per questo motivo, nel plasma non si ritrovano che rare tracce di IgD.
- IgE (catena H di tipo ϵ) lega le mast cells e i basofili mediante un forte legame FcR and e media le risposte di ipersensibilità' (allergie).



Cross-Linkage of Bound IgE Antibody With Allergen Causes

Antibody With Allergen Causes

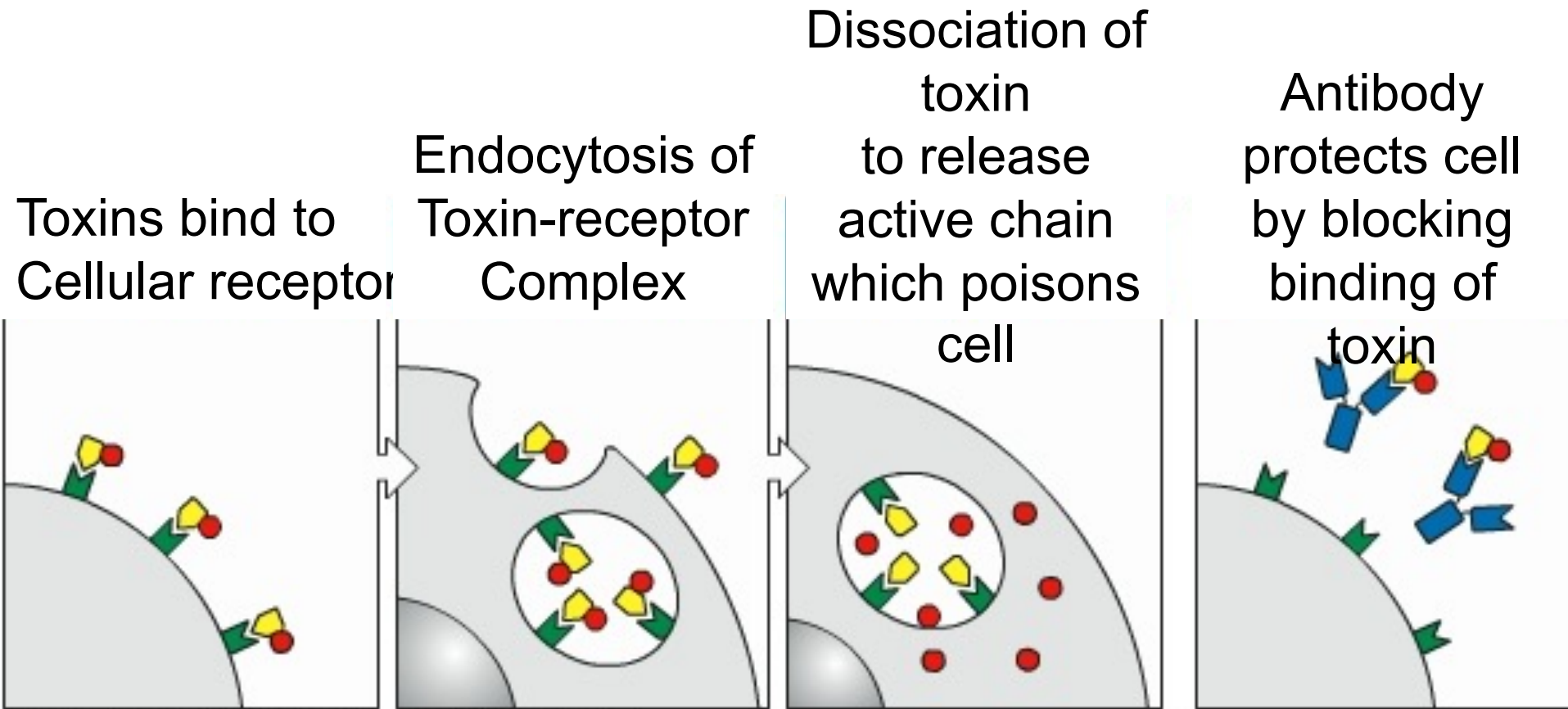




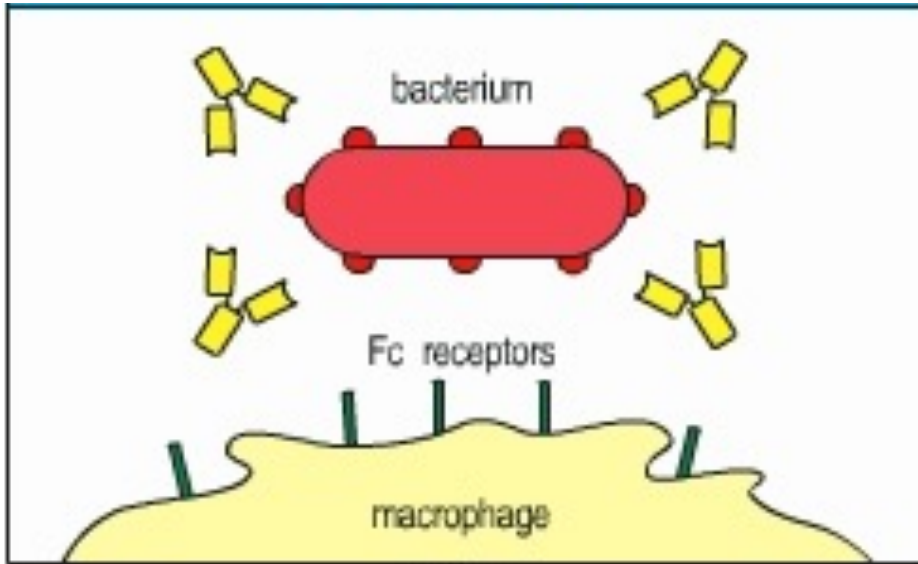
Antibody Effector Mechanisms

- Neutralization: binding itself prevents pathogenesis.
- Opsonization: enhancing phagocytosis
- Complement activation

Neutralization

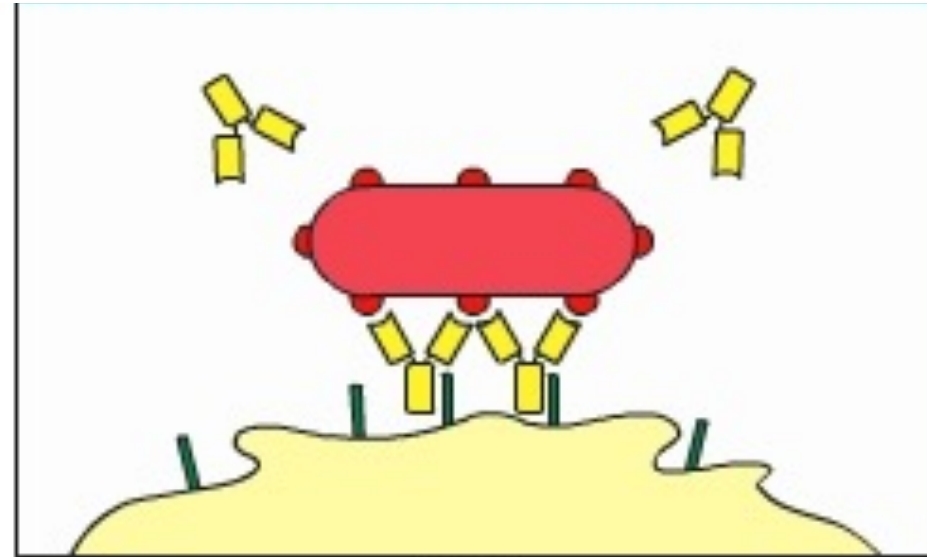


Free Ig binds poorly to Fc receptors



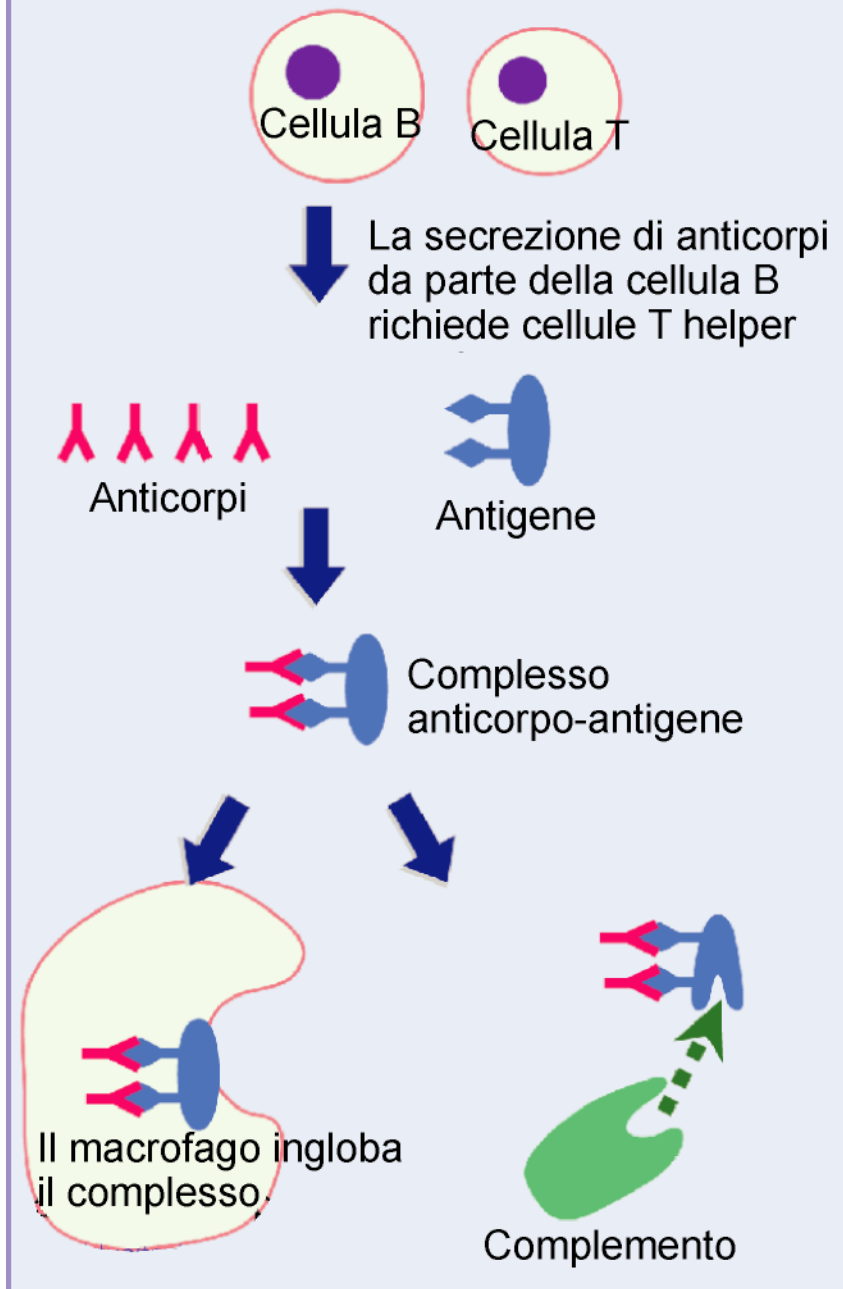
No activation of macrophage,
No destruction of bacterium

Aggregation of Ig on bacterial surface promotes aggregation of Fc receptors



Activation of macrophage
leading to
destruction of bacterium

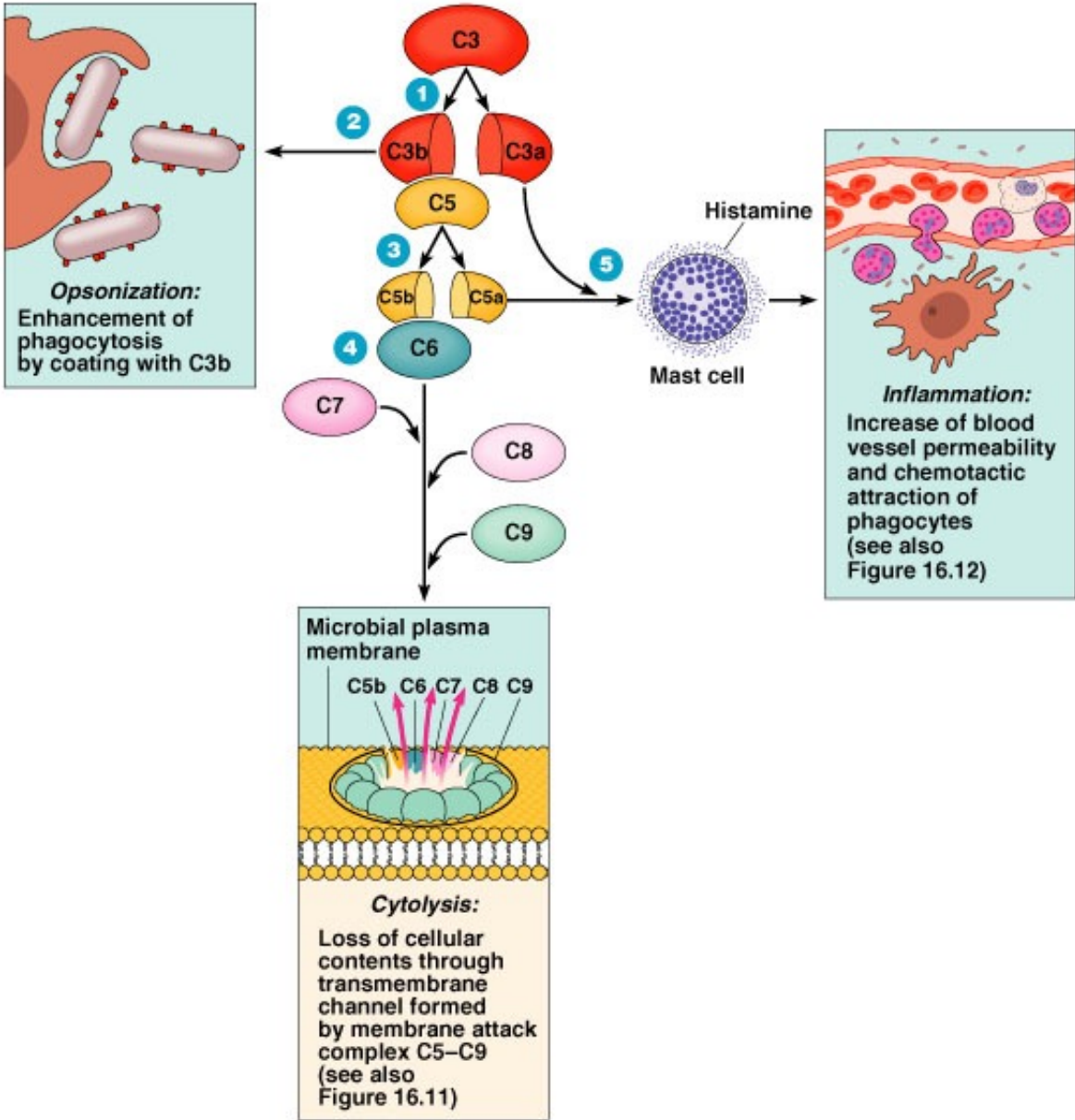
Gli anticorpi interagiscono con gli antigeni



Opsonizzazione è un fenomeno indotto dalle opsonine durante una risposta immunitaria in cui vi è l'attivazione del sistema complemento.

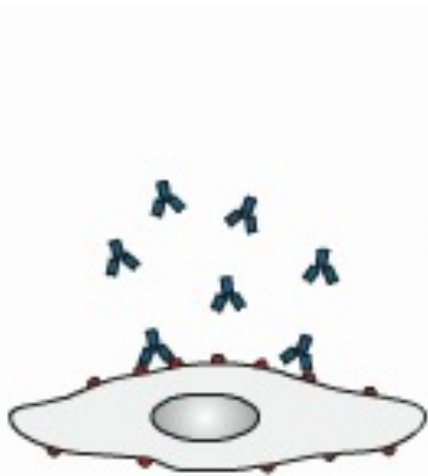
Le opsonine sono delle macromolecole che, se rivestono un microrganismo, aumentano enormemente l'efficienza della fagocitosi in quanto esse sono riconosciute da recettori espressi sulla membrana dei fagociti. Le Ig sono opsonine

Attivazione del complemento

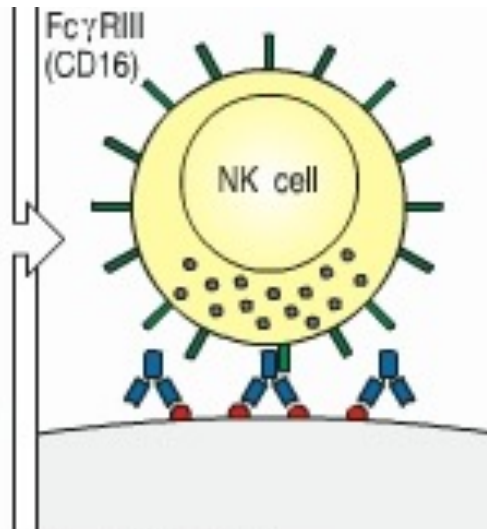


Antibody-Dependent Cellular Toxicity (ADCC)

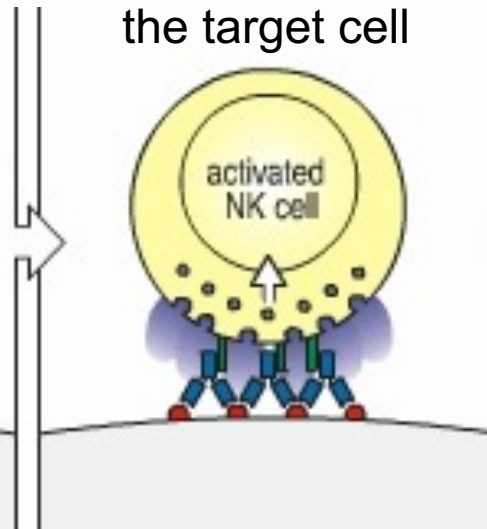
Antibody binds antigens on the surface of target cells



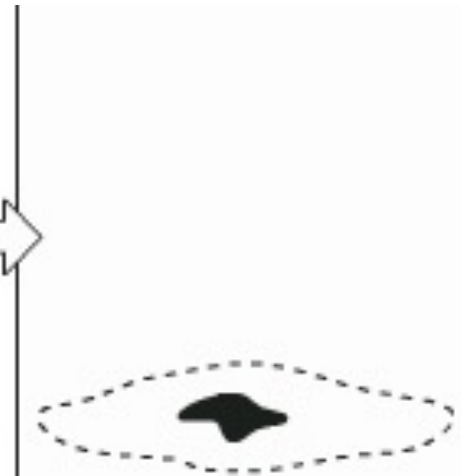
Fc receptors on NK cells recognize bound antibody



Cross-linking of Fc receptors signals the NK cell to kill the target cell



Target cell dies by apoptosis and membrane damage



Funzioni Biologiche delle classi di IgG

Funzione		IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Attivazione del Complemento		+	+	-	-	-
Opsonizzazione		+	-	-	-	-
ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)		+	-	-	-	-
Prodotte dal Neonato		-	+	-	-	-
Trasporto placentare		+	-	-	-	-
B cell antigen receptor	Naïve	-	+	-	+	-
	Memory	+	-	+	-	+
Scatena la de-granulazione delle mast cell		-	-	-	-	+
Antigen binding		+	+	+	+	+

TABLE 4-4 Properties and biological activities* of classes and subclasses of human serum immunoglobulins

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgM[†]	IgE	IgD
Molecular weight[†]	150,000	150,000	150,000	150,000	150,000 – 600,000	150,000 – 600,000	900,000	190,000	150,000
Heavy-chain component	γ1	γ2	γ3	γ4	α1	α2	μ	ε	δ
Normal serum level (mg/ml)	9	3	1	0.5	3.0	0.5	1.5	0.0003	0.03
In vivo serum half-life (days)	23	23	8	23	6	6	5	2.5	3
Activates classical complement pathway	+	+/-	++	-	-	-	++	-	-
Crosses placenta	+	+/-	+	+	-	-	-	-	-
Present on membrane of mature B cells	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Binds to Fc receptors of phagocytes	++	+/-	++	+	-	-	?	-	-
Mucosal transport	-	-	-	-	++	++	+	-	-
Induces mast cell degranulation	-	-	-	-	-	-	-	+	-

*Activity levels indicated as follows: ++ = high; + = moderate; +/- = minimal; - = none; ? = questionable.

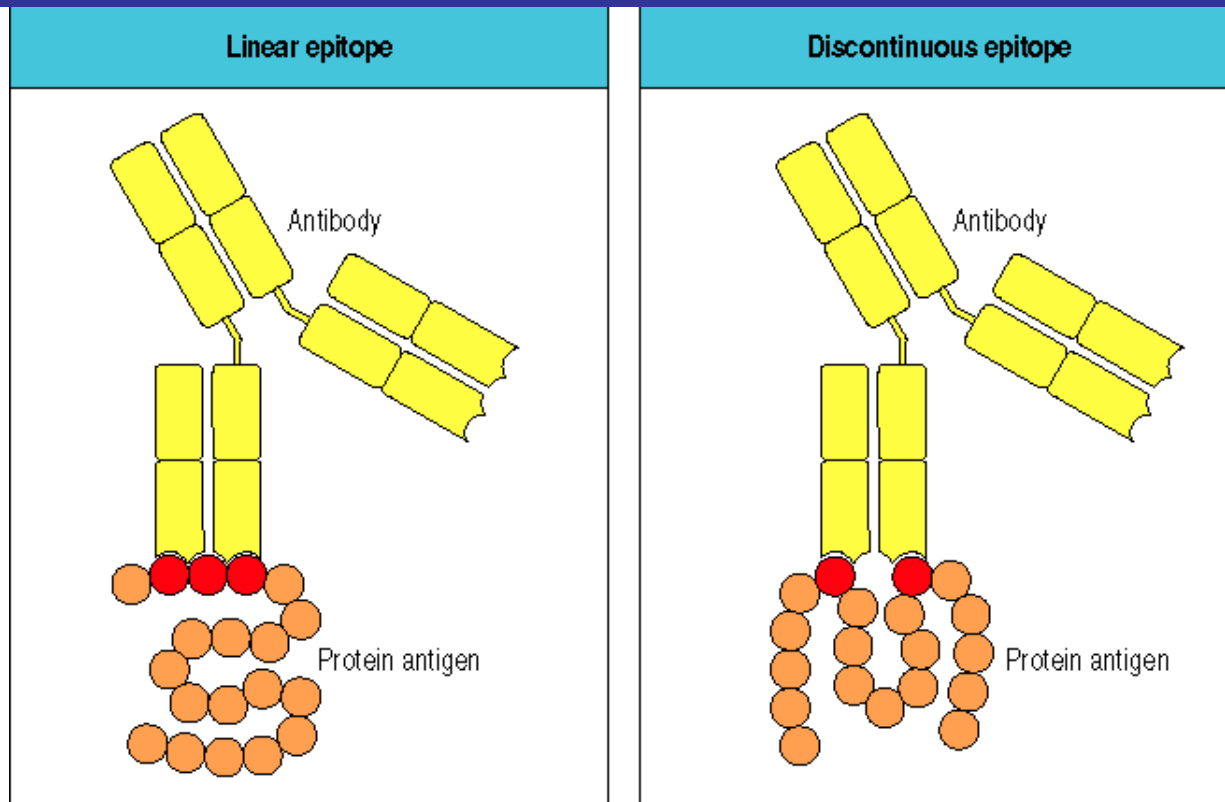
[†]IgG, IgE, and IgD always exist as monomers; IgA can exist as a monomer, dimer, trimer, or tetramer. Membrane-bound IgM is a monomer, but secreted IgM in serum is a pentamer.

[‡]IgM is the first isotype produced by the neonate and during a primary immune response.

EPITOPI

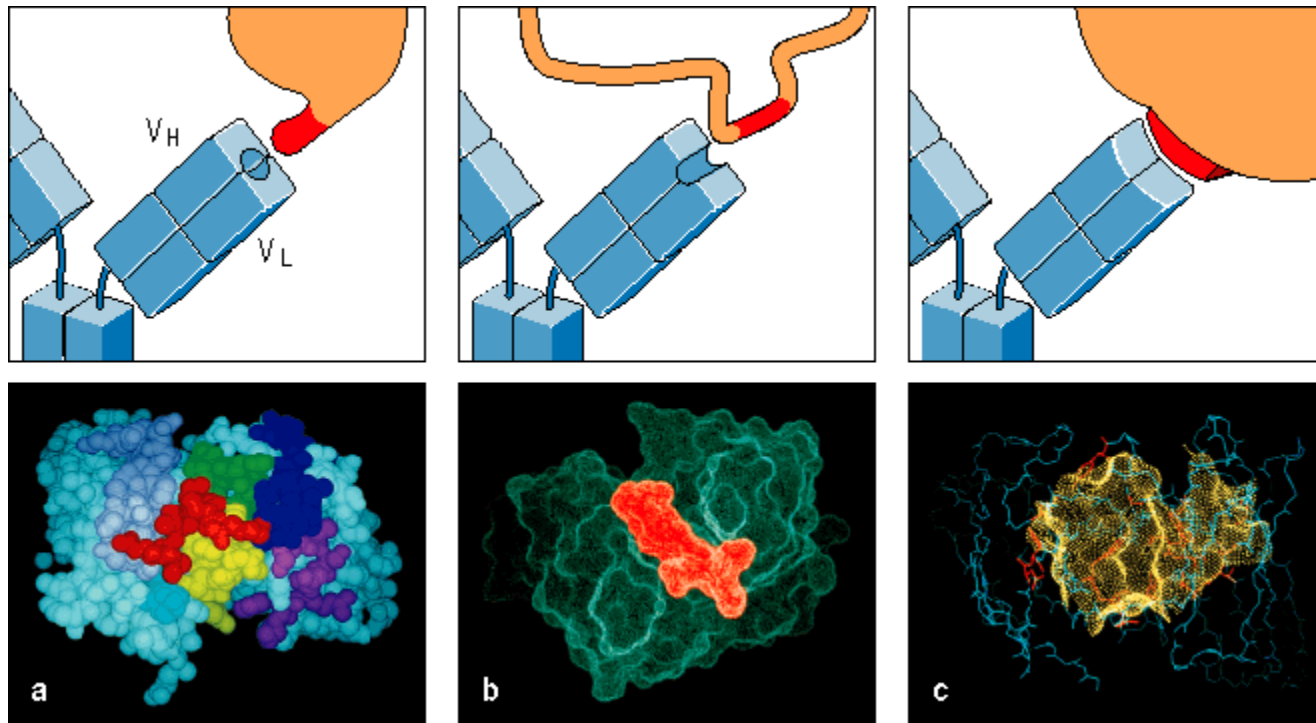
- Sito molecolare dell'antigene che stimola la risposta immune: **epitopi** o **determinanti antigenici**.
- **B-cell Epitopes** —sequenziali o conformazionali
- **B cell epitopes** si trovano in **proteine o polisaccaridi**
- Apteni --sostanze non-immunogeniche che se legate a proteine o zuccheri possono diventare epitopi..
- Le B cells riconoscono antigeni liberi in fase fluida.
- I T-cell Epitopes — sono costituiti da residui sequenziali in un immunogeno proteico-
- Le T cells riconoscono gli antigeni solo dopo che sono stati processati dalle APC (antigen presenting cells) e presentate nel contesto delle MHC.

l'epitopo di una proteina puo' essere lineare o discontinuo (conformazionale)



A linear epitope of a protein antigen is formed from contiguous amino acids. A discontinuous epitope is formed from amino acids from different parts of the polypeptide that are brought together when the chain folds, i.e., are dependent on the conformation of the protein.

Gli epitopi possono legarsi in tasche o solchi o su superfici estese nel sito di legame dell'anticorpo.



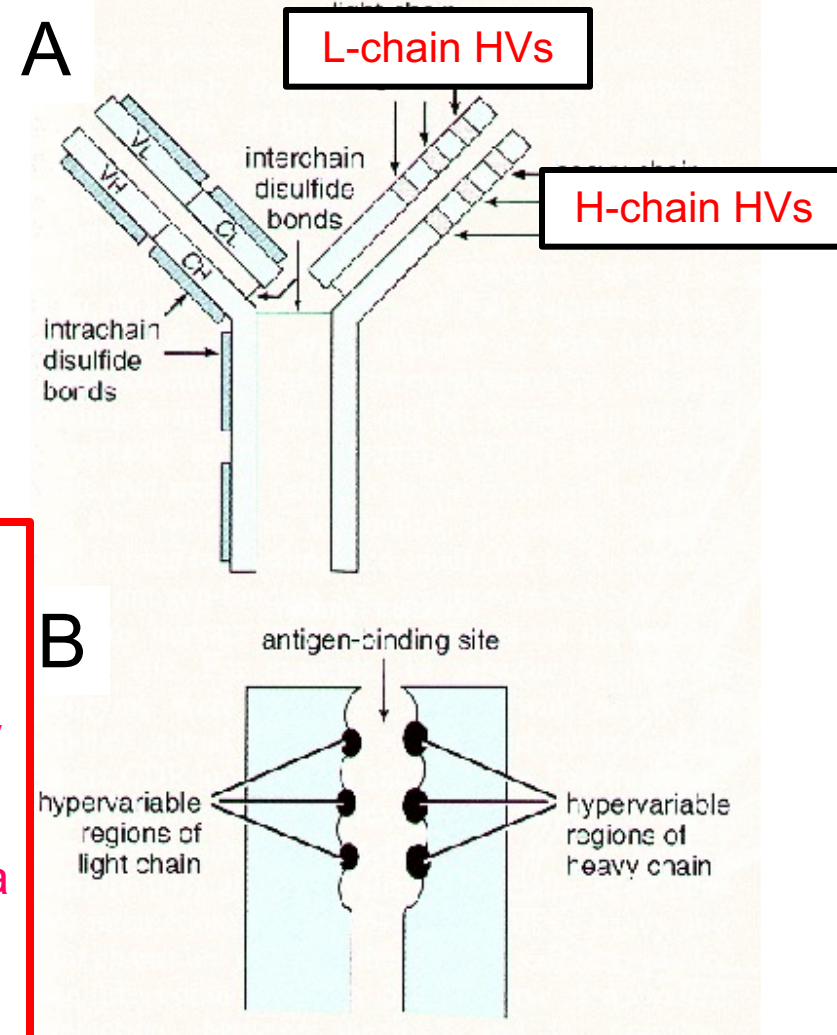
© 2000 Garland Publishing/Elsevier Science

Il sito di legame dell'anticorpo e' formato dalla regione ipervariabile dei domini V delle H-chain and L-chain.

- Comparazione di sequenza dei domini V domains di H and L chains da diversi anticorpi ha mostrato che esiste una regione in cui c'e' maggiore variabilita' chiamata **hypervariable regions**, fiancheggiata da regioni meno variabili (**framework regions**).
- Le regioni ipervariabili sono chiamate **Regioni determinati la complementarita'** o **Complementarity determining regions (CDRs)**.
- Ci sono 3 CDRs in ogni V domain, dall' N-terminus sono numerate CDR1, CDR2, and CDR3.
- L'appaiamento di una H e una L chain in una molecola di Ab porta insieme le CDR di ogni dominio a formare il sito di legame per l'antigene.

Antigen Combining Site

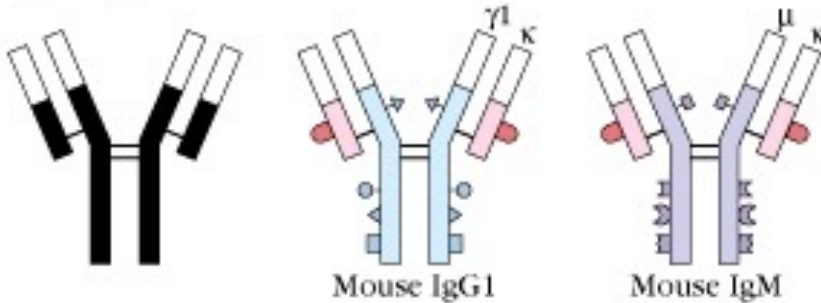
- A. Schematic of an IgG molecule showing the approximate location of the hypervariable regions (CDRs).
- B. Schematic showing how the CDRs in each heavy- and light-chain pair for an antigen binding site.



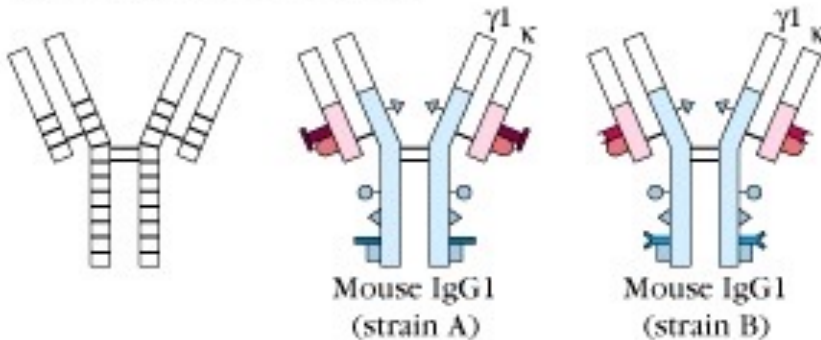
- Hypervariable Regions (HV): regioni di estrema variabilità nel dominio variabile di catene L e H**
Hypervariable regions = complementarity determining regions (CDRs).
- Framework Regions:** sequenze di aa tra le regioni ipervariabili che mostrano relativamente meno variabilità

Antigenic Determinants of Ig's

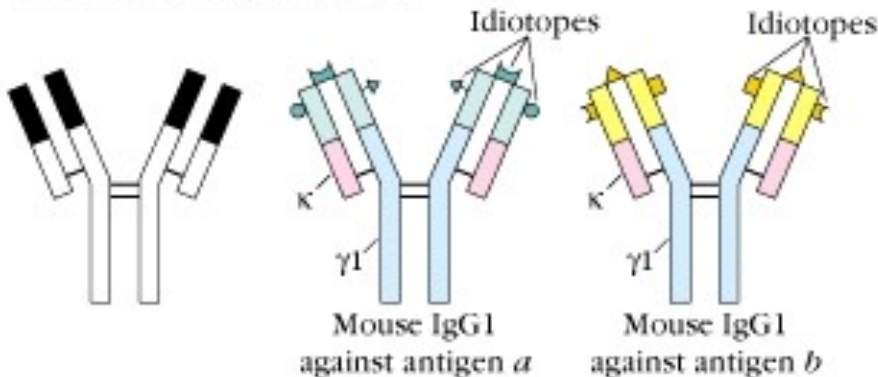
(a) Isotypic determinants



(b) Allotypic determinants



(c) Idiotypic determinants



I determinanti antigenici o epitopi sulle Ig cadono in 3 categorie:

L' **isotipo** di una Ig e' determinata dalla catena pesante. L'uomo ha 9 isotipi di Ig.

Polimorfismi genetici nelle molecole di ab: **allotipi**.

La struttura antigenica unica formata dalle sequenze variabili delle Ig produce un unico epitopo per ogni specificita' anticorpale. Questi epitopi sono chiamati **idiotipi**. La collezione di diversi idiotipi definisce l'idiotipo delle immunoglobuline.

Gli anticorpi

Sono glicoproteine

Sono costituiti da 2 subunita':

2 identiche catene leggere **light chains (L chains)**, circa 200 amino acids

2 identiche catene pesanti **heavy chains (H chains)**, circa 2 volte L chains

I primi 100 amino acids all' N-terminus di H and L chains varia grandemente tra anticorpo e anticorpo –**variable (V) regions**

Non ci sono 2 B cells (a meno che non siano parte dello stesso clone) che secerna anticrpi con la stessa V region

La sequenza aa della V regions e' soprattutto variabile in **3 hypervariable regions** chiamate anche **CDR's**

La struttura terziaria e quaternaria degli anticorpi porta le regioni CDR di H e L chain incseme a formare la regione di legame all'antigene **antigen binding site** che lega l'epitopo dell'antigene

Solo alcuni aa invece sono diversi nel C-term di H and L chains and sono chiamate **constant (C) region, regioni costanti**

2 diverse C regions per L-chains -- **kappa (κ) e lambda (λ)**

5 diverse C regions per H chains

mu (μ) chains, IgM

gamma (γ) chains, IgG

alpha (α) chains, IgA

epsilon (ϵ) chains, IgE

delta (δ) chains, IgD

Ognuna di questi 5 tipi of H chains puo' appaiarsi con lambda or kappa L chains

Come si genera la diversita' anticorpale per ricombinazione

Modello genetico della diversita' delle Ig.

Ogni modello deve essere compatibile con le proprieta' delle Ig

1. Vasta diversita' di specificita' antigenica
2. Regione variabile e regione costante
3. Esistenza di diversi isotipi nella stessa regione di specificita'

– **Germline Theory**

– Ogni anticorpo e' codificato da un gene.

– **Somatic Mutation Model**

– Il genoma contiene un piccolo numero di geni e la diversita' e generata per mutazione.

Problemi con le due teorie: Germline and Somatic-Mutation Models

- **Germline Theory**
 - Parte del gene dovrebbe essere variabile e parte costante
 - Troppa specificita' per il numero di geni (tutto e più del genoma dovrebbe codificare per le Ig)
 - Stessa regione variabile su diversi isotipi.
- **Somatic Mutation Theory**
 - Parte del gene dovrebbe essere variabile e parte costante.
 - Stessa regione variabile su diversi isotipi
- **Resolution Begins**
 - Dreyer-Bennet Hypothesis

The Dreyer – Bennett Hypothesis

Two genes – one polypeptide chain

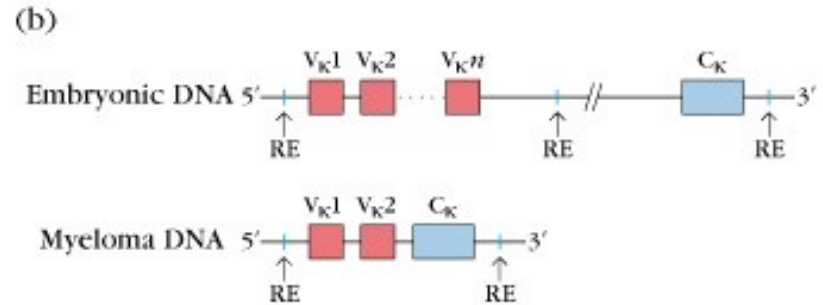
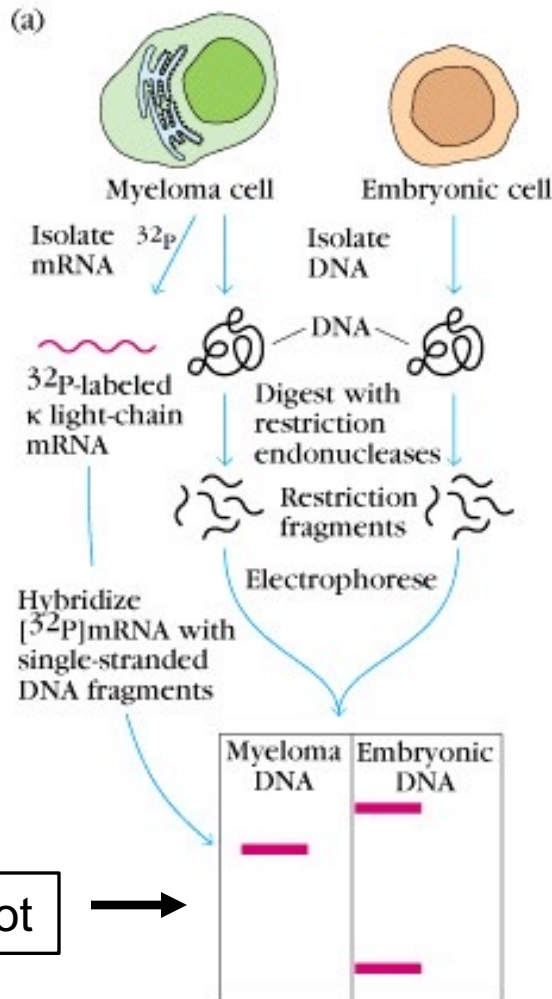
- 2 geni separati codificano per una singola H o L chain
 - 1 gene per la regione V e uno per la C
 - I 2 geni vengono assemblati a livello di DNA e trascritti insieme.
 - Migliaia di geni V e 1 gene C.

- Vantaggi del Recombination Model
 - Mette insieme due parti della stessa molecola (V e C)
 - Accomoda come una singola V puo' essere associata con piu' di un isotipo.

- PROBLEMA
 - La specificita' e sempre troppo alta per il numero di geni.

Prova della Dryer-Bennett Hypothesis

I geni dell Ig sono riarrangiati nelle cellule B



Conclusion

1. LE cellule embrionali hanno geni che codificano per le regioni V e C che sono separate nel genoma.
2. Durante lo sviluppo delle B cells i geni per le regioni V e C sono "avvicinati", e sono nelle cellule B.

Ogni V region e' codificata da piu' di un segmento genico

- Il clonaggio e sequenziamento dei geni Ig ha mostrato una complessità ancor maggiore di quella predetta da Dreyer and Bennett.
- La sequenza di DNA che codifica la regione V completa e' generata da ricombinazione SOMATICA (sito specifica) tra segmenti genici separati.
- Un singolo gene C codifica la regione C.

Gene Segments of V_L and V_H Regions

- **Light chain V region – two gene segments**
 - V gene segment – first 95-101 amino acids
 - J (joining) gene segment – up to 13 amino acids

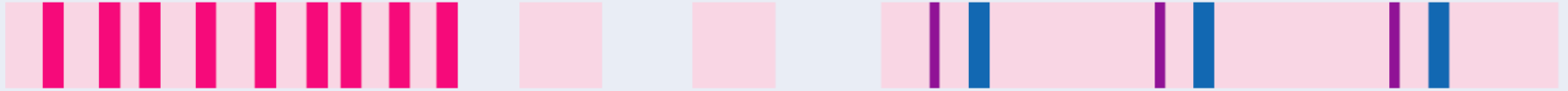
Inoltre la catena leggera e' codificata da due diverse famiglie: kappa e lambda

- **Heavy chain V region – three gene segments**
 - V and J gene segments
 - D (diversity) gene segment

La famiglia lambda ha geni V e segmenti J-C

Segmenti genici V_λ

$J_{\lambda 1} C_{\lambda 1}$ $J_{\lambda 2} C_{\lambda 2}$ $J_{\lambda 3} C_{\lambda 3}$



2 nel topo

Circa 300
nell'uomo

(per la maggior
parte inattivi)

4 segmenti J-C nel topo

>6 segmenti genici J-C
nell'uomo

La famiglia kappa ha soltanto un gene C

36 V_{κ}

40 V_{κ}

J_{1-5}

C_{κ}

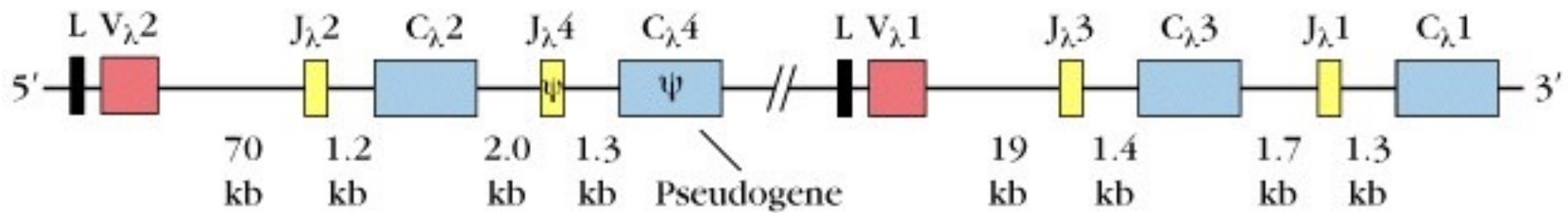


Ci sono multipli diversi segmenti genici per la V region

- I segmenti genici delle Ig sono organizzati in 3 clusters o locus genici - i locus delle catene leggera κ , quello della catena leggera λ , and quello delle catene pesanti sono ognuno su un cromosoma separato.
- I segmenti genici V possono essere raggruppati in FAMIGLIE in cui ciascun membro ha almeno l'80% di identità di sequenza con gli altri nella famiglia.

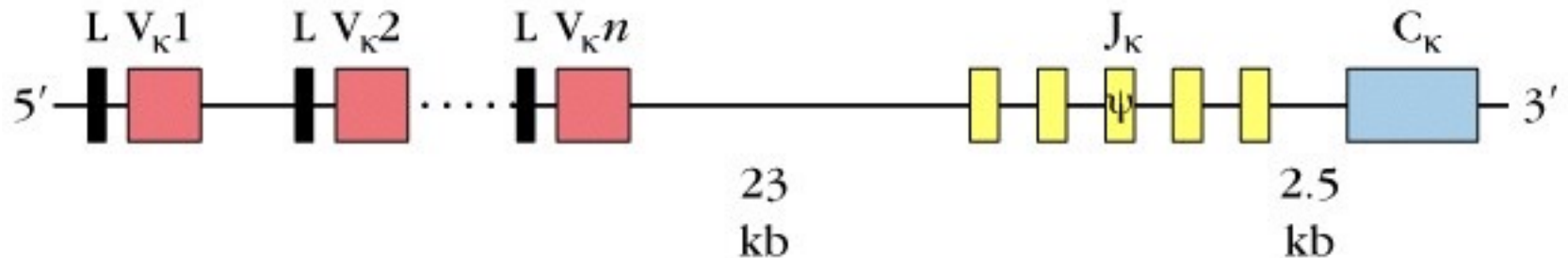
Organization of Ig-gene segments in the mouse

(a) λ -chain DNA



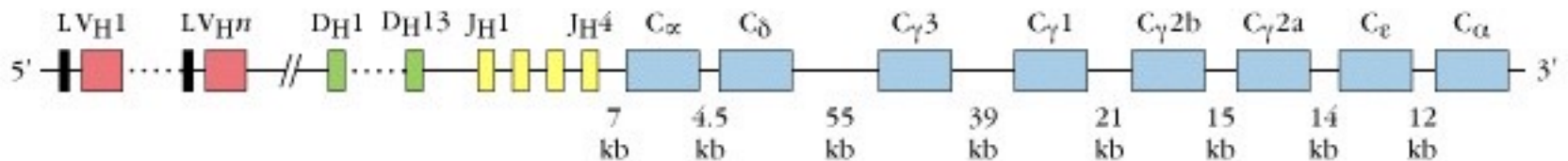
(b) κ -chain DNA

$n = \sim 85$



(c) Heavy-chain DNA

$n = \sim 134$



I geni della V-region sono costruiti mediante ricombinazione somatica

- V_L mediante ricombinazione V-J a produrre il gene della regione variabile VJ.
- V_H mediante ricombinazione D-J seguita a dalla ricombinazione di V a D-J a formare il gene della regione variabile VDJ.

Ricombinazione genetica

General vs. Site Specific

- **Genetic recombination**

- Abilità del DNA di andare incontro a riarrangiamenti che variano la particolare combinazione di geni presenti in ogni particolare genoma.

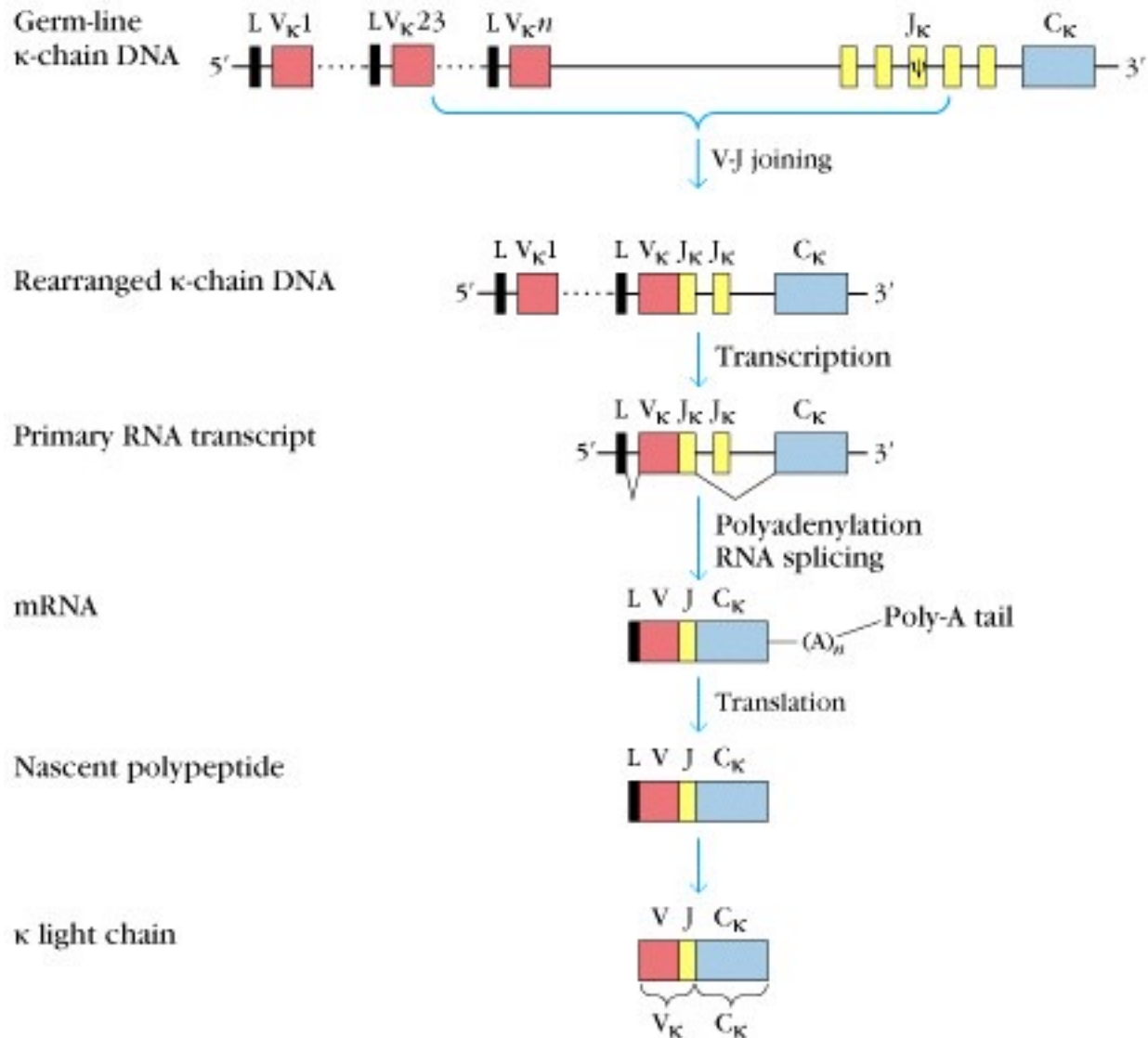
- **General recombination**

- Scambio genetico che avviene tra ogni paio di sequenze omologhe di DNA, di solito localizzate su due copie dello stesso cromosoma– e.g.scambio di regioni omologhe durante la meiosi.

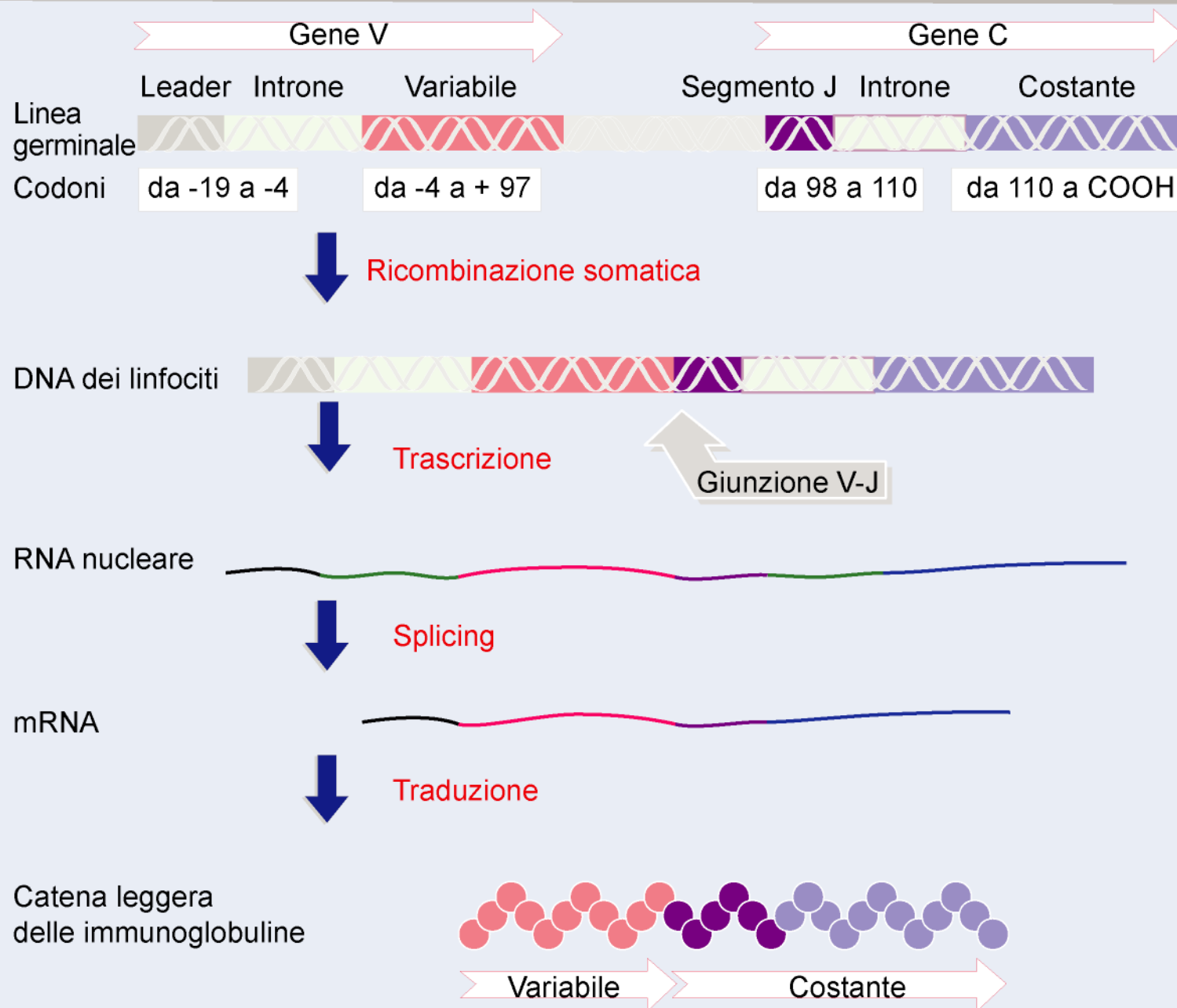
- **Ricombinazione sito-specifica**

- L'omologia di sequenza non è richiesta. Lo scambio avviene tra specifiche corte sequenze nucleotidiche che sono riconosciute da enzimi sito-specifici- examples: integrazione del fago lambda nei batteri.

5.4 Kappa Light Chain Gene Rearrangement



I geni lambda sono generati da una ricombinazione V-JC



I geni kappa sono generati da una ricombinazione V-J



Linea germinale

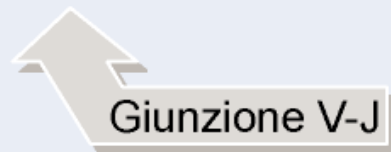
Ricombinazione somatica a J2



DNA dei linfociti



Trascrizione



RNA nucleare

J2

J3



Splicing di J2 a C

mRNA



Traduzione

Catena leggera
delle immunoglobuline



5.5 H-chain Gene Rearrangement



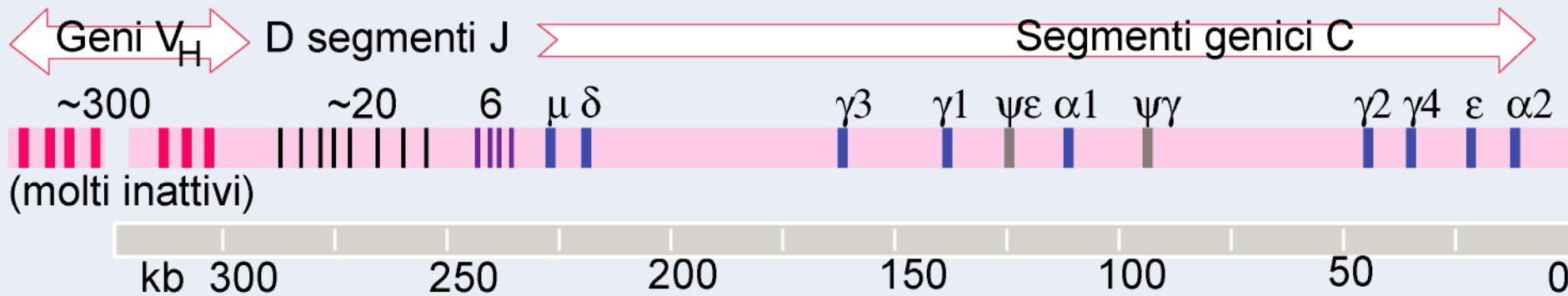
Le catene pesanti sono assemblate da ricombinazioni successive



La struttura reale del gene C è interrotta



Il locus della catena pesante occupa parecchie centinaia di kb



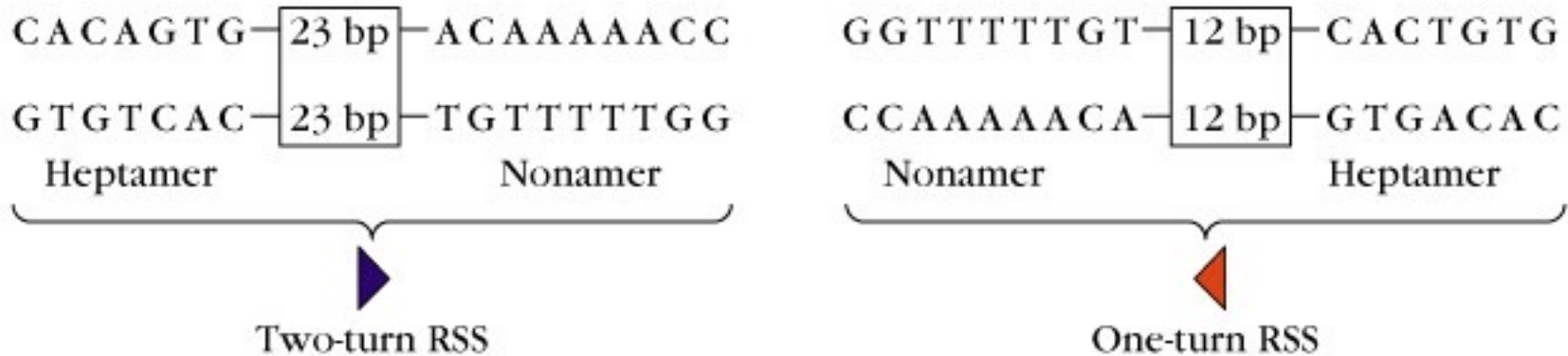
Riarrangiamento di V, (D), and J gene segments e' guidato da sequenze fiancheggianti

Recombination Signal Sequences – RSS – assicura che il riarrangiamento del Dna avvenga correttamente nel corretto posto relativamente ai segmenti V, D, or J

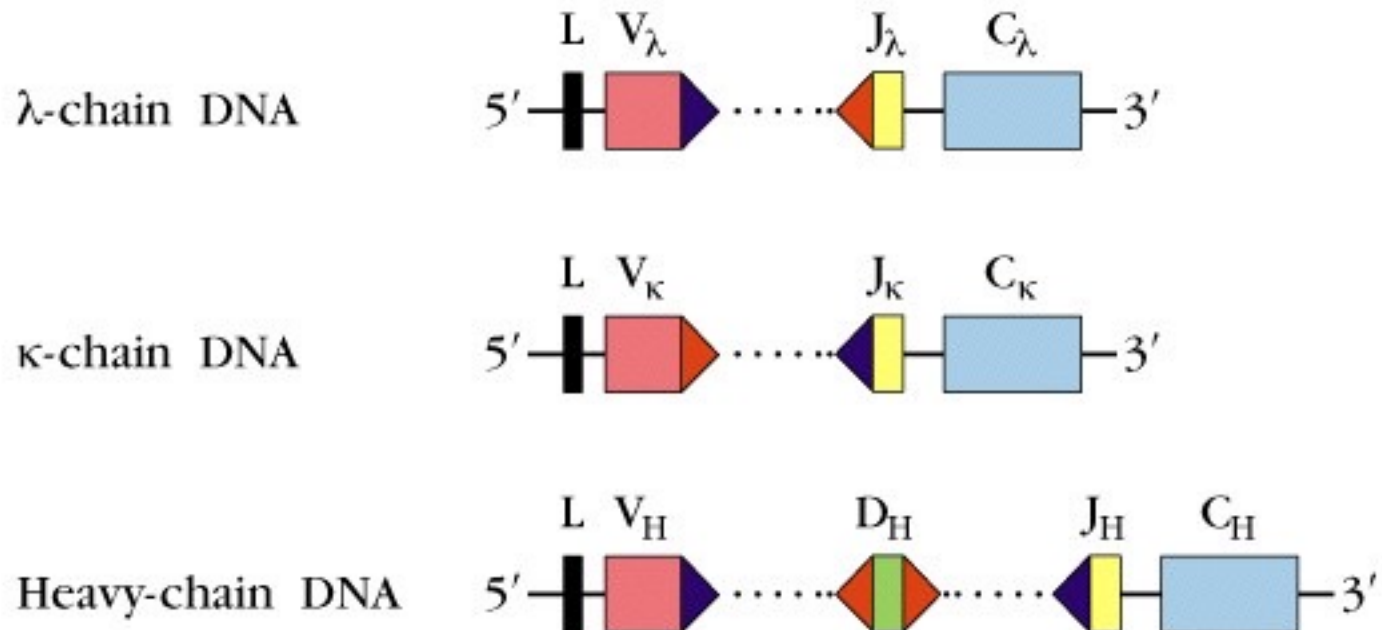
- Ci sono sequenze conservate eptamari e nonameri che fiancheggiano i segmenti genici.
- Lo spazio (spacer) tra eptamero e nonamero e sempre di circa 12bp o 23 bp
- Lo spacer varia di sequenza ma la sua lunghezza e' conservata corrisponde a 1 o 2 giri della doppia elica del DNA. Questo porta eptamero e nonamero dallo stesso lato della doppia elica
- La sequenza eptamero-spacer-nonamero e' chiamata sequenza segnale di ricombinazione- **recombination signal sequence - RSS**
 - Regola 12/23 rule – la ricombinazione, per la maggior parte avviene tra una 12 bp (one turn) e una 23 bp (two turn) RSS

5.6 Recombination Signal Sequences

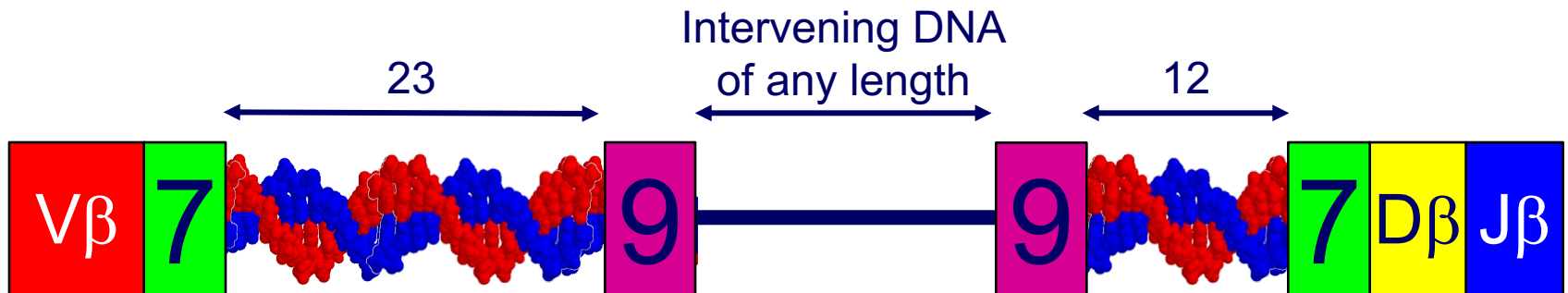
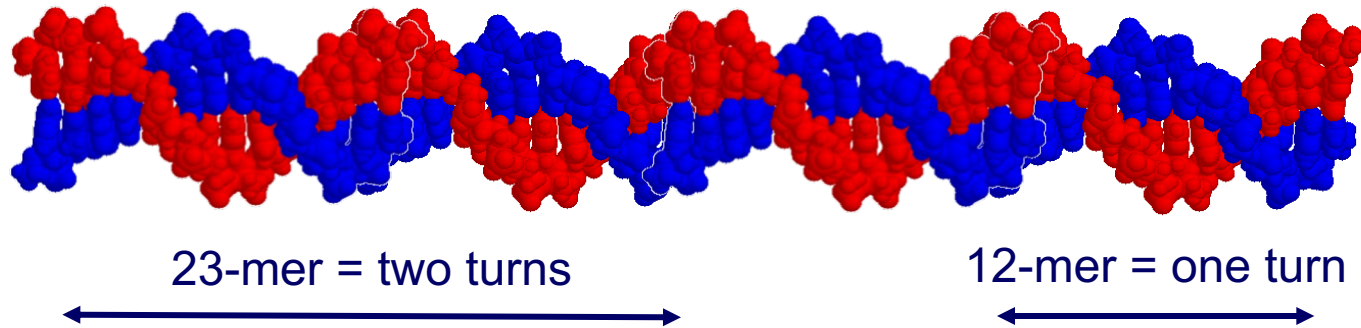
(a) Nucleotide sequence of RSSs



(b) Location of RSSs in germ-line immunoglobulin DNA



Molecular explanation of the 12-23 rule

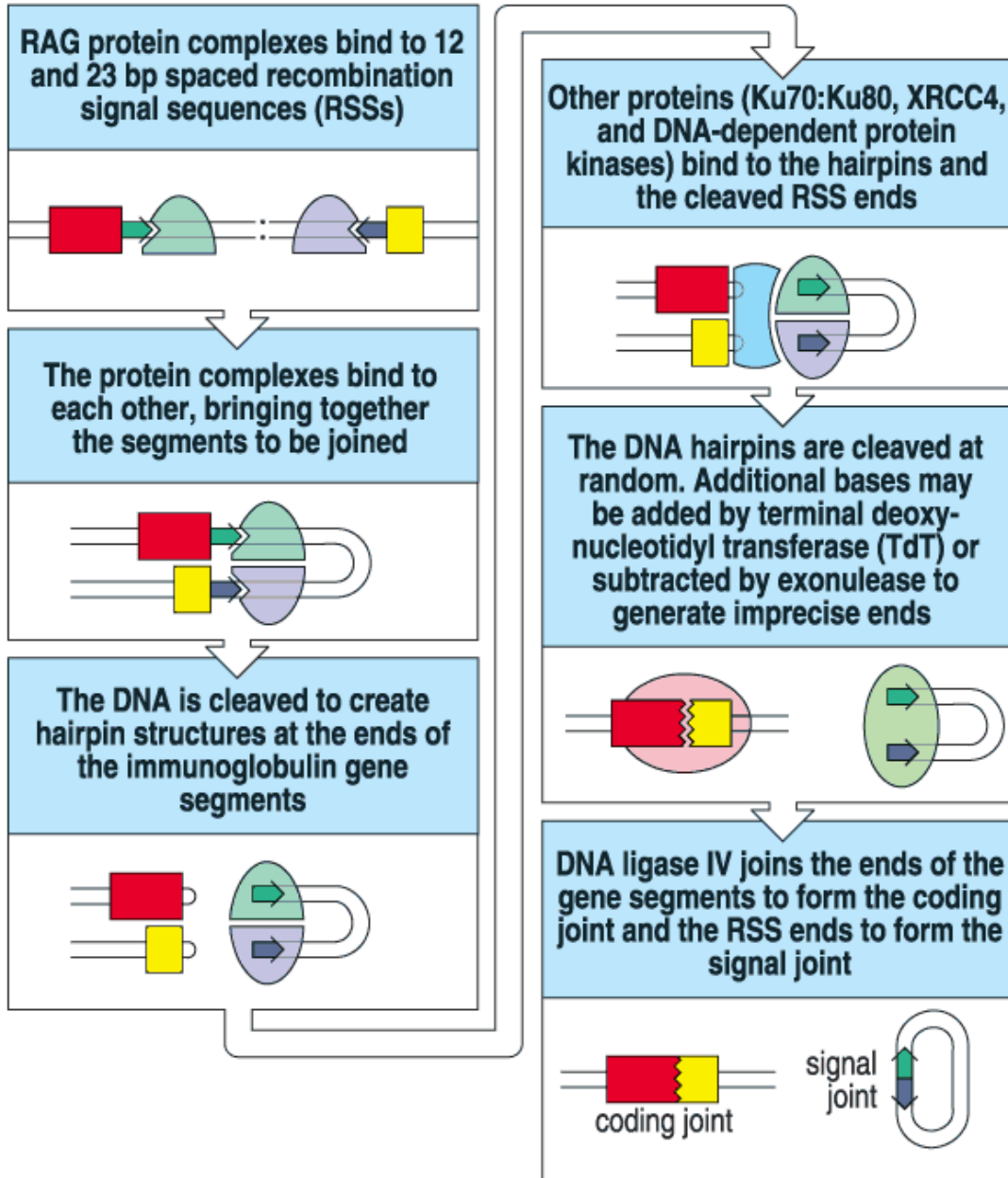


La reazione che combina V, D, J coinvolge enzimi modificanti il DNA sia ubiquitari che linfociti specifici.

Il complesso di enzimi che agisce nella somatic V(D)J recombination e' chiamato **V(D)J recombinase**

- **Rag1 e Rag-2 (recombination-activating genes)** sono le ricombinasi lymphoid-specific.
- Gli altri enzimi sono altri enzimi modificanti il DNA, coinvolti nel riparo, ripiegamento, e modificazione delle estremita' libere del DNA -
 - DNA ligase
 - DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)
 - Ku which is a heterodimer (Ku 70:Ku 80) that associates with DNA-PK.

Enzymatic Steps in Recombination



La ricombinazione V(D)J Recombination e' un processo multistadio

1. Le proteine RAG protein si legano alle RSS 12 e 23.
2. Il complesso porta vicino i segmenti che devono essere uniti.
3. Il DNA e' tagliato a formare un struttura a forcina all'estremita' dei segmenti genici
4. Gli altri enzimi modificatori legano le forcine e tagliano le estremità delle RSS.
5. Le forcine sono tagliate in modo casuale. Altre basi sono aggiunte da terminal transferasi e tolte da esonucleasi, a formare estremita' impresise..
6. La DNA ligase IV unisce le estremita' dei segmenti a formare le regione codificante.

La ricombinazione delle catene L puo' avvenire per "looping out" o "Inversione"

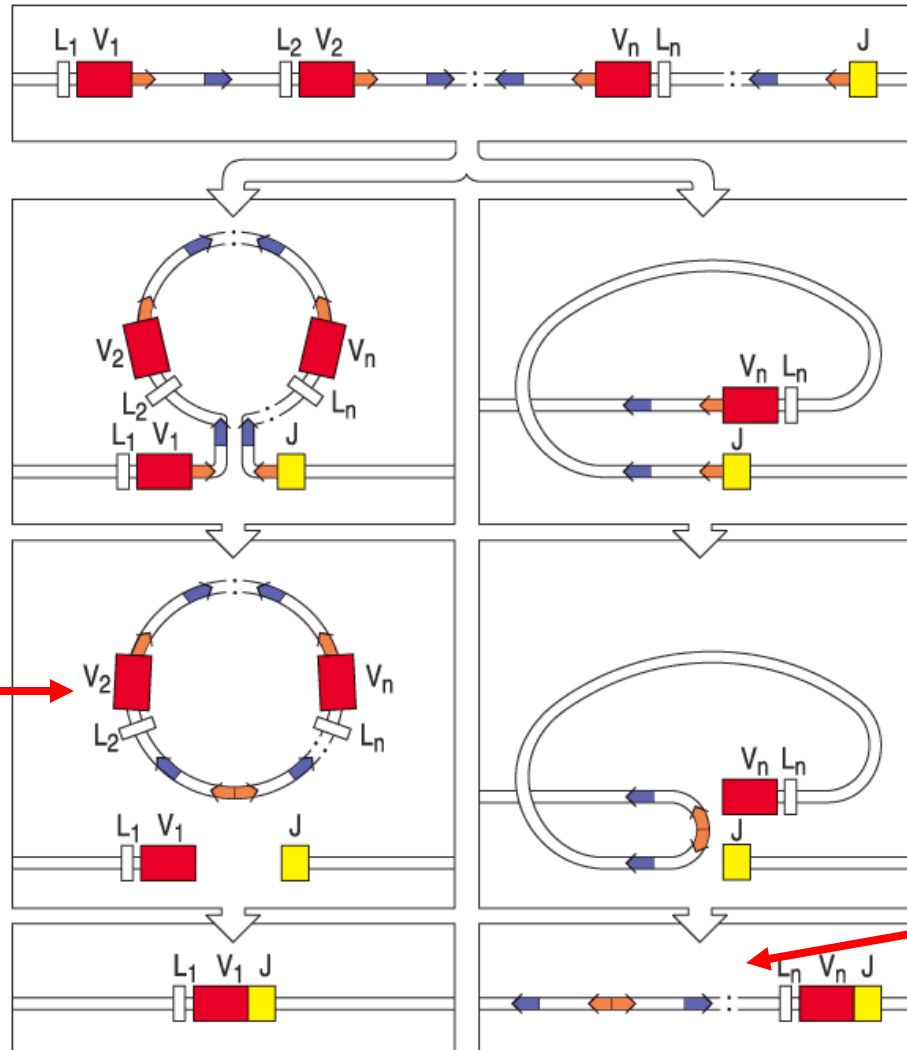
Il meccanismo dipende dall'orientamento tra V e J.

Same Orientation
"looping out"

Opposite Orientation
"Inversion"

Intervening DNA
"looped out" and lost at the next cell division

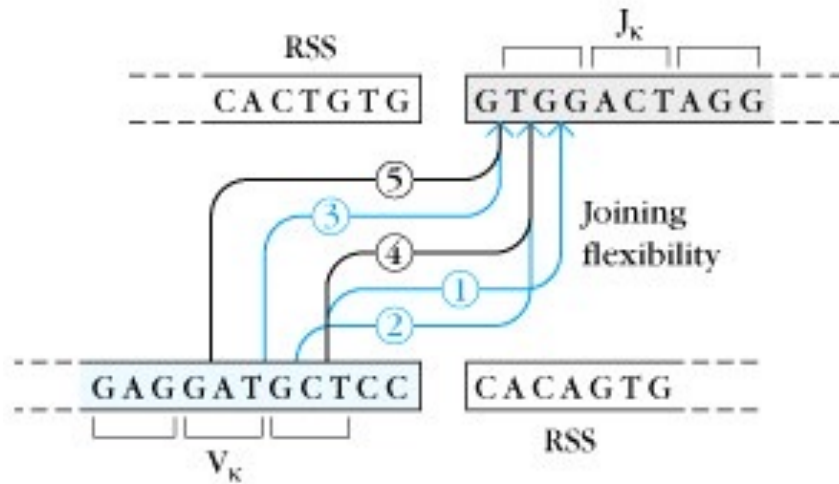
Recombination of gene segments that are in the opposite orientation results in inversion and integration of the intervening DNA



Generazione della diversità anticorpale

1. Multipli segmenti genici nella linea germinale
2. Combinatorial V-(D)-J joining
3. Flessibilità giunzionale
4. Aggiunta di nucleotidi nella P-region (P-addition)
5. Aggiunta di nucleotidi nella N-region (N-addition)
6. Associazione combinatoriale L e H chains.
7. Ipermutazione somatica

5.11 Junctional Flexibility: Productive vs. Non-productive



Productive rearrangements

- ①

Glu	Asp	Ala	Thr	Arg
GAGGATGCGACTAGG				
- ②

Glu	Asp	Gly	Thr	Arg
GAGGATGGGACTAGG				
- ③

Glu	Asp	Trp	Thr	Arg
GAGGATTGGACTAGG				

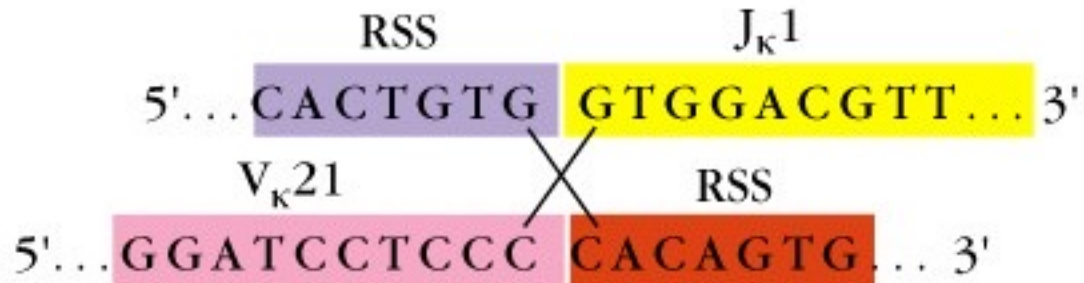
Nonproductive rearrangements

- ④

Glu	Asp	Ala	Asp	Stop
GAGGATGCGGACTAGG				
- ⑤

Glu	Val	Asp	Stop
GAGGTGGACTAGG			

Junctional Flexibility



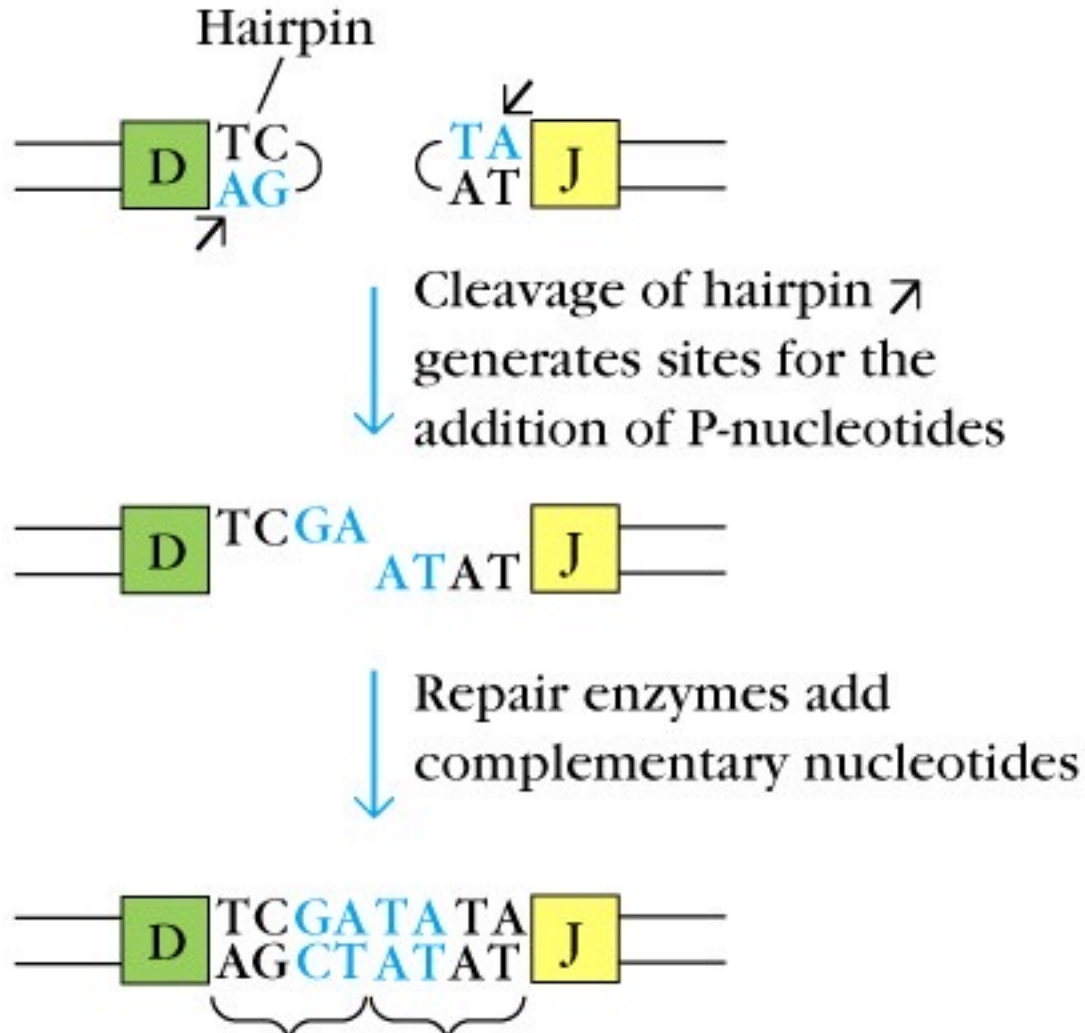
Pre-B cell lines	Coding joints (V _κ 21 J _κ 1)	Signal joints (RSS/RSS)
Cell line #1	5'-GGATCC GGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'
Cell line #2	5'-GGATC TGGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'
Cell line #3	5'-GGATCCTC GTGGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'
Cell line #4	5'-GGATCCT TGGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'

Productive vs. Non-productive Rearrangements

- La giunzione V(D)J gene segments e' imprecisa e i segmenti sono fuori fase e il reading frame non e' mantenuto.
- **non-productive rearrangement**, le unità VJ o VDJ conterranno molti stop codons, che interromperanno la traduzione .
- Se viene mantenuta la fase di lettura ci sara' **productive rearrangement**.

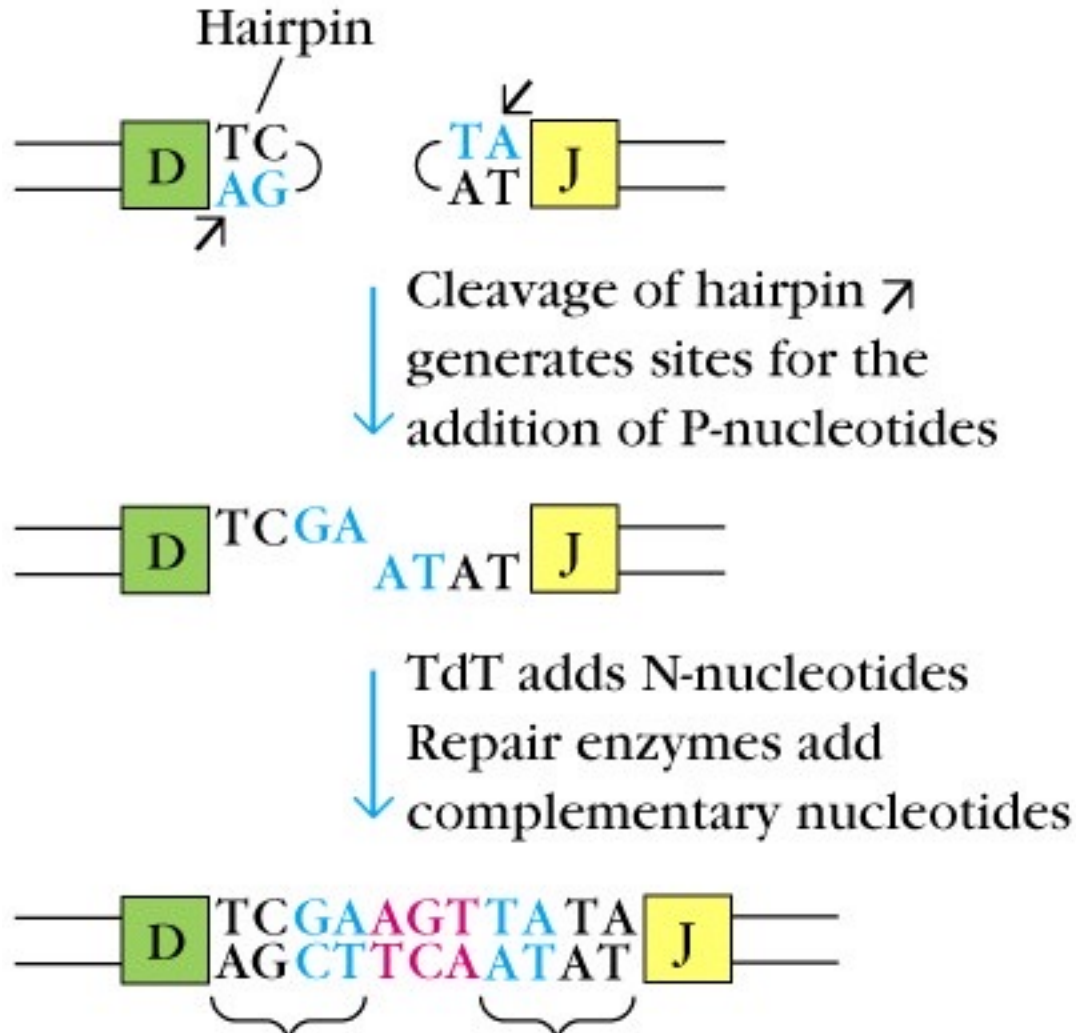
5.15a P-Nucleotides

(a) P-nucleotide addition



5.15b N-Nucleotides

(b) N-nucleotide addition

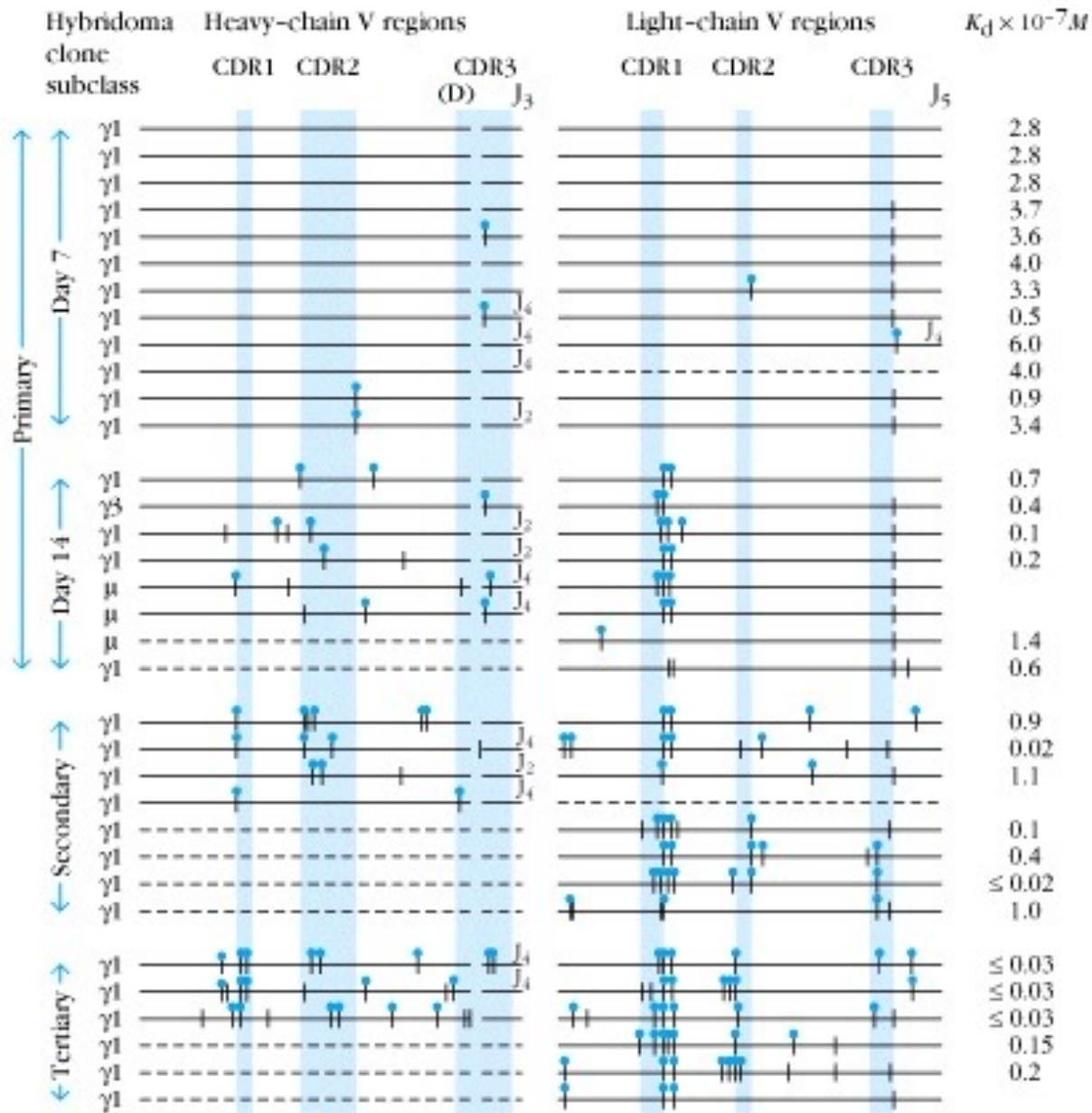


Somatic Hypermutation

Somatic hypermutation diversifica ulteriormente il repertorio di Ab

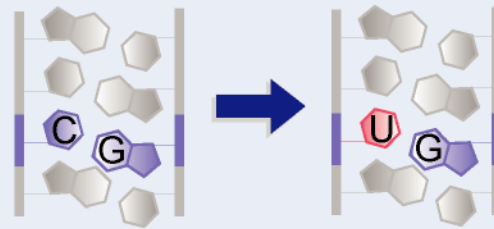
- Introduce varianti nella regione V soggetta a selezione negativa-positiva.
- Avviene nei centri germinali in seguito alla stimolazione antigenica delle B cells..
- Somatic hypermutation necessita di segnali dalle T cells attivate.
- Hypermutation avviene mediante rottura a doppio filamento del Dna nella V region e riparo non error free e per deaminazione delle citosine .
- Hypermutation avviene allo stesso momento dello “switching di classe”, ma coinvolge diversi meccanismi.

Somatic Hypermutation



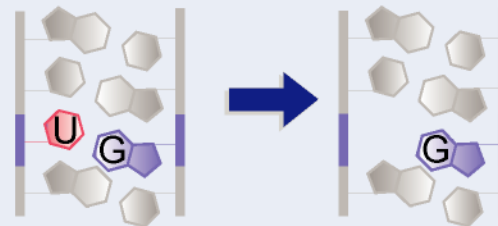
L'ipermutazione è scatenata da citidina deaminasi e uracil DNA-glicosilasi

La citidina deaminasi crea una coppia U-G

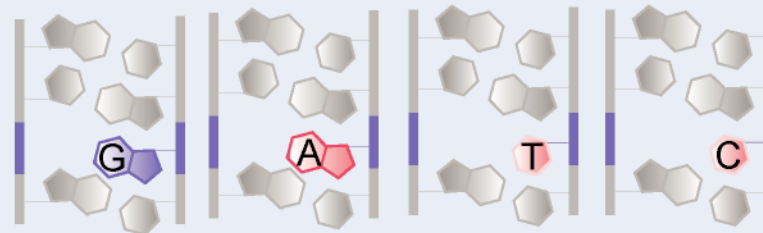


Risultati sperimentali

L'uracil DNA-glicosilasi crea un sito abasico



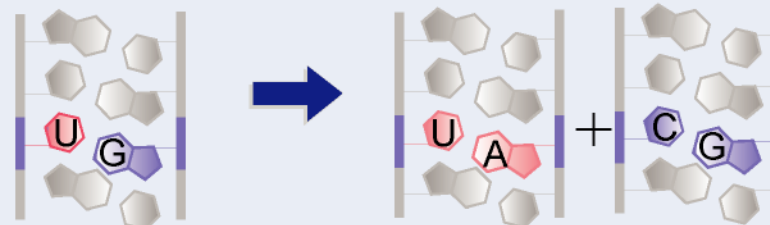
La replicazione inserisce basi a caso di fronte all'interruzione



Schema normale di mutazioni

G → A = 48%
G → C = 39%
G → T = 12%

La replicazione di una coppia U-G provoca una transizione da G ad A



Uracil DNA-glicosilasi BLOCCATA

G → A = 84%
G → C = 16%

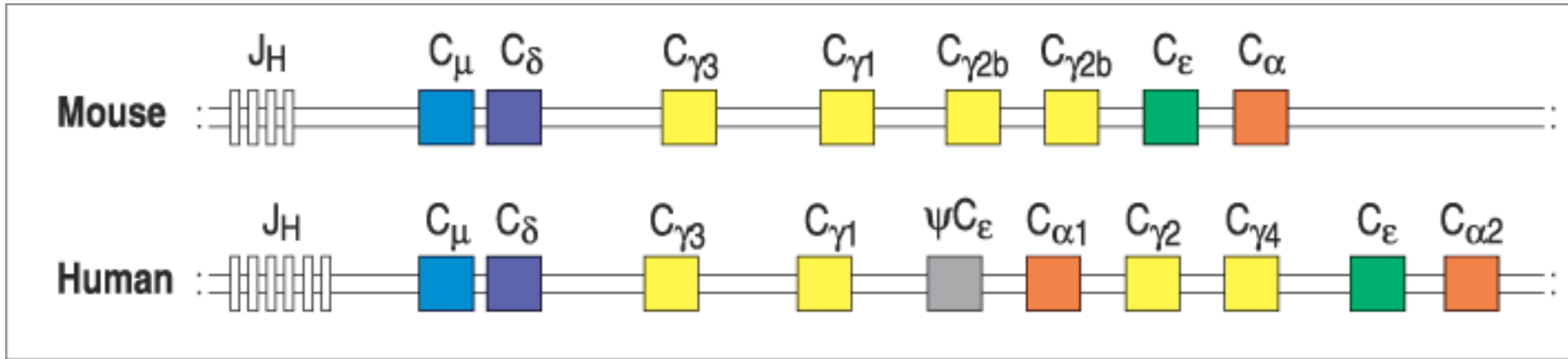
Conclusione: La combinazione di diverse strategie genera un vasto repertorio di specificità anticorpale da un limitato numero di geni.

1. Le regioni Variabili sono codificate da diversi frammenti che vengono uniti mediante ricombinazione somatica a fare un gene della regione V completo.
2. Molti segmenti genici della regione V sono presenti nel genoma: fonte ereditabile di diversità.
3. La diversità combinatoriale deriva dalla ricombinazione random tra diversi segmenti genici V, D e J a formare una completa regione V.
4. La variabilità alle estremità è aumentata dall'aggiunta di nucleotidi alle regioni N e P alla fine delle regioni codificanti.
5. L'associazione di diverse regioni V delle catene L e H a formare la regione di legame all'antigene dell'Ig contribuisce ulteriormente alla diversità.
6. Una volta che una Ig è espressa, le regioni codificanti delle regioni V sono modificate da ipermutazione somatica in seguito a stimolazione delle cellule B da parte dell'antigene.

Variazione strutturale delle Ig nella regione costante

- Gli isotipi delle Ig si differenziano per la struttura delle loro C regions.
- Antibody C-regions danno specializzazione funzionale.
- H-chain transcripts vanno incontro a processamento differenziale dell'RNA
 - Forme transmembrana e secrete delle Ig sono generate da forme alternative di splicing di trascritti delle H chain.
 - La co-espressione di IgM e IgD sulle B cells risulta da trascritti di H chain per splicing alternative
 - **CLASS SWITCHING** – Lo stesso esone V_H si puo' associare con diversi C_H genes nel corso della risposta immunitaria.

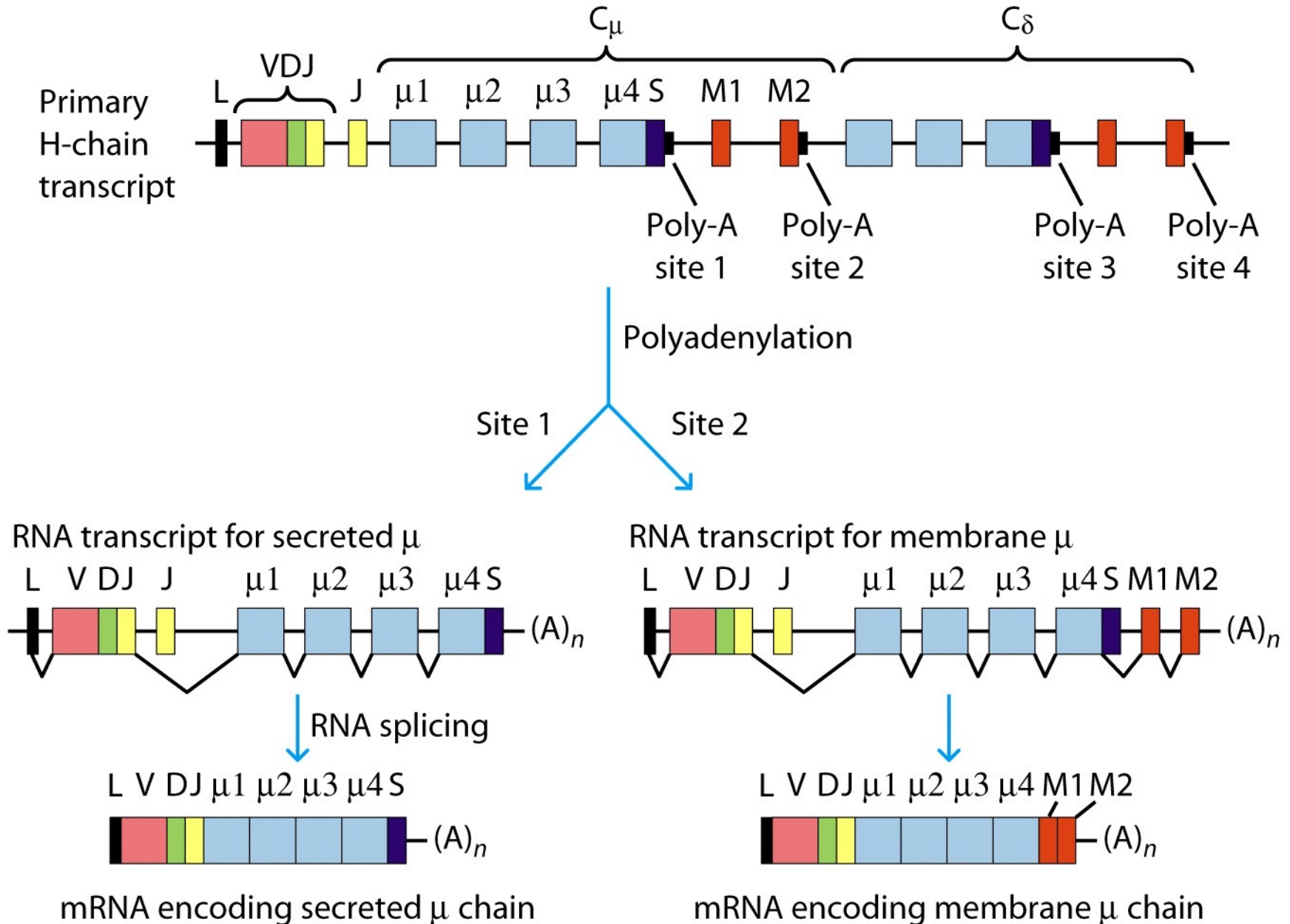
Organization Of The Ig Heavy-chain C-region Genes In Mice And Human



Ci sono cinque tipi di catene pesanti

Tipo	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
Catena pesante	μ	δ	γ	α	ϵ
Struttura	$(\mu_2L_2)_5J$	δ_2L_2	γ_2L_2	$(\alpha_2L_2)_2$	ϵ_2L_2
Proporzione	5%	1%	80%	14%	<1%
Funzione effettrice	Attiva il complemento	Sviluppo di tolleranza (?)	Attiva il complemento	Presente nelle secrezioni	Risposta allergica

Transmembrane and Secreted Forms of Ig's

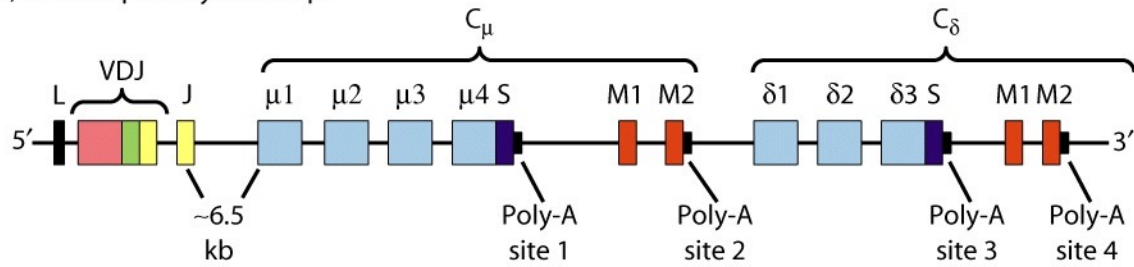


Transmembrane and Secreted Forms of Ig's

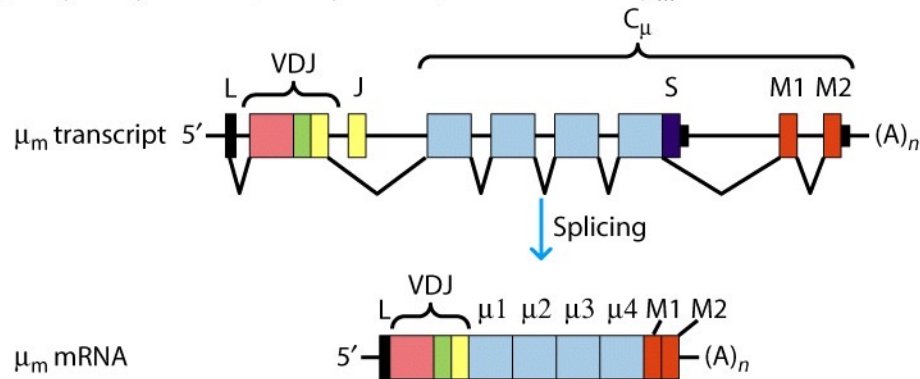
Entrambe hanno la stessa sequenza della H-chain gene

- **Ogni H-chain ha:**
 - 2 esoni che codificano la regione transmembrana e la coda citoplasmatica
 - 1 esone che codifica per la regione C-terminale della forma secreta.
- Gli eventi che determinano se una RNA della H-chain risulta in forma secreta o TM avviene durante il processamento del trascritto iniziale.
- La selezione della forma S o TM é regolata nello sviluppo. Prima della stimolazione dell'antigene la B-cell produce la forma TM, poi la plasmacellula produce forma S.

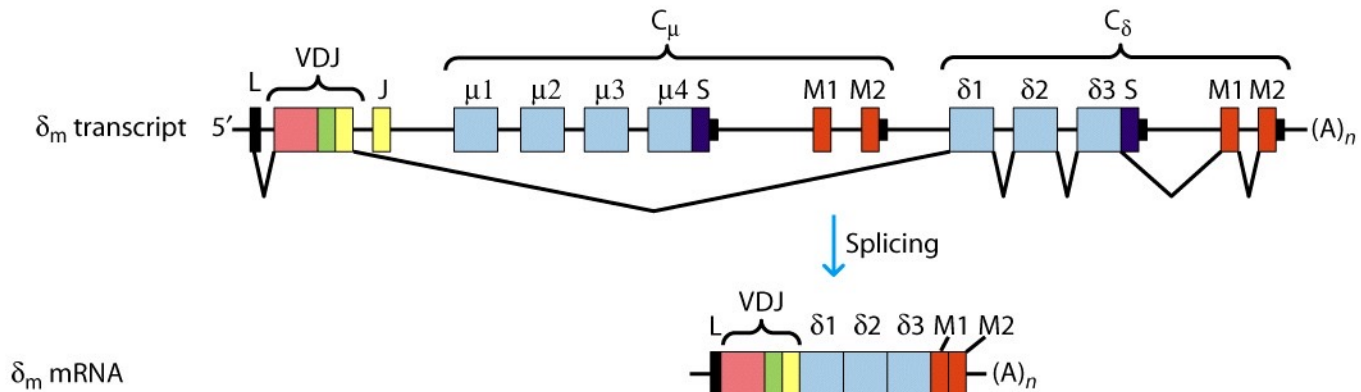
(a) H-chain primary transcript



(b) Polyadenylation of primary transcript at site 2 → μ_m



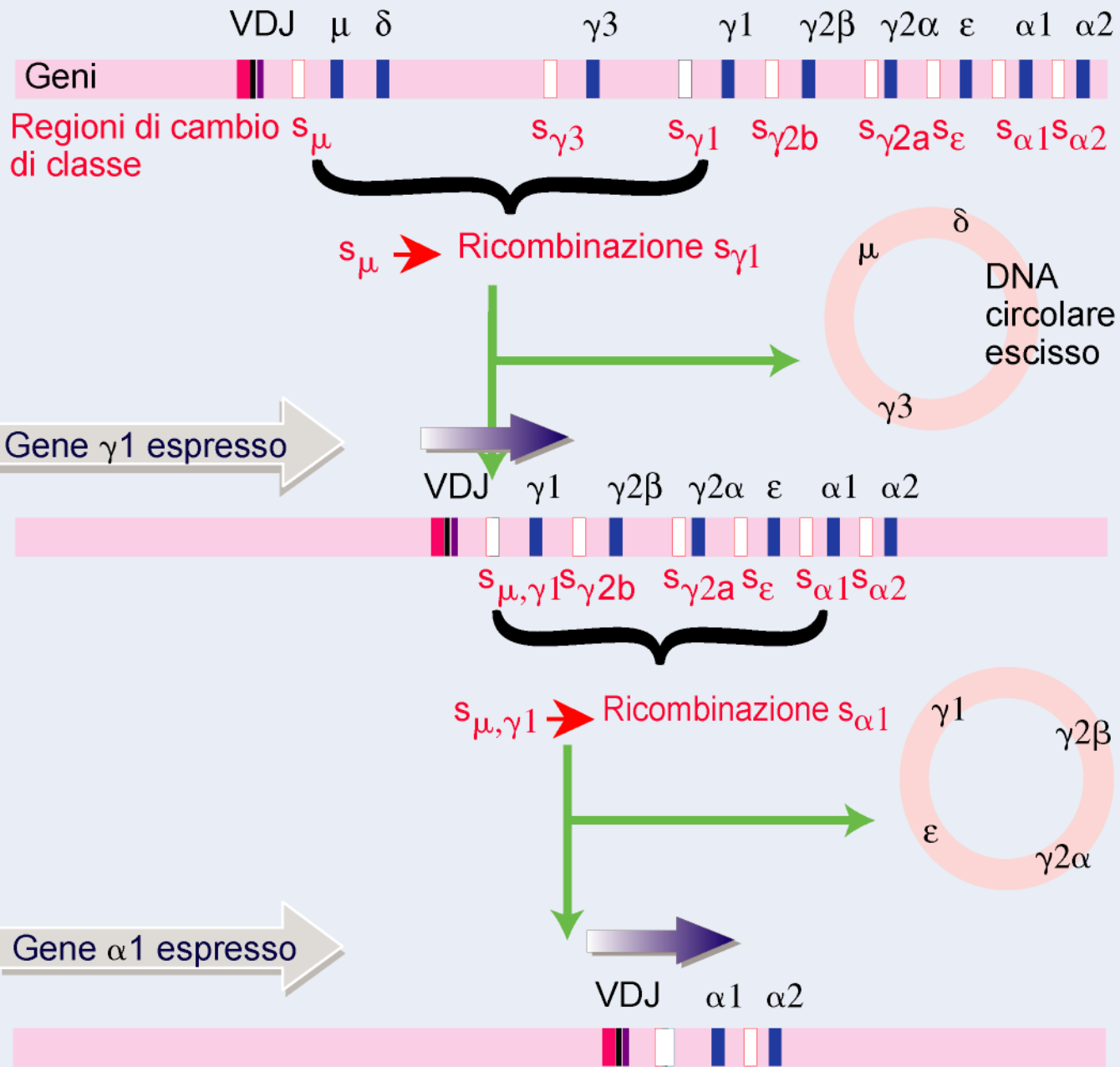
(c) Polyadenylation of primary transcript at site 4 → δ_m



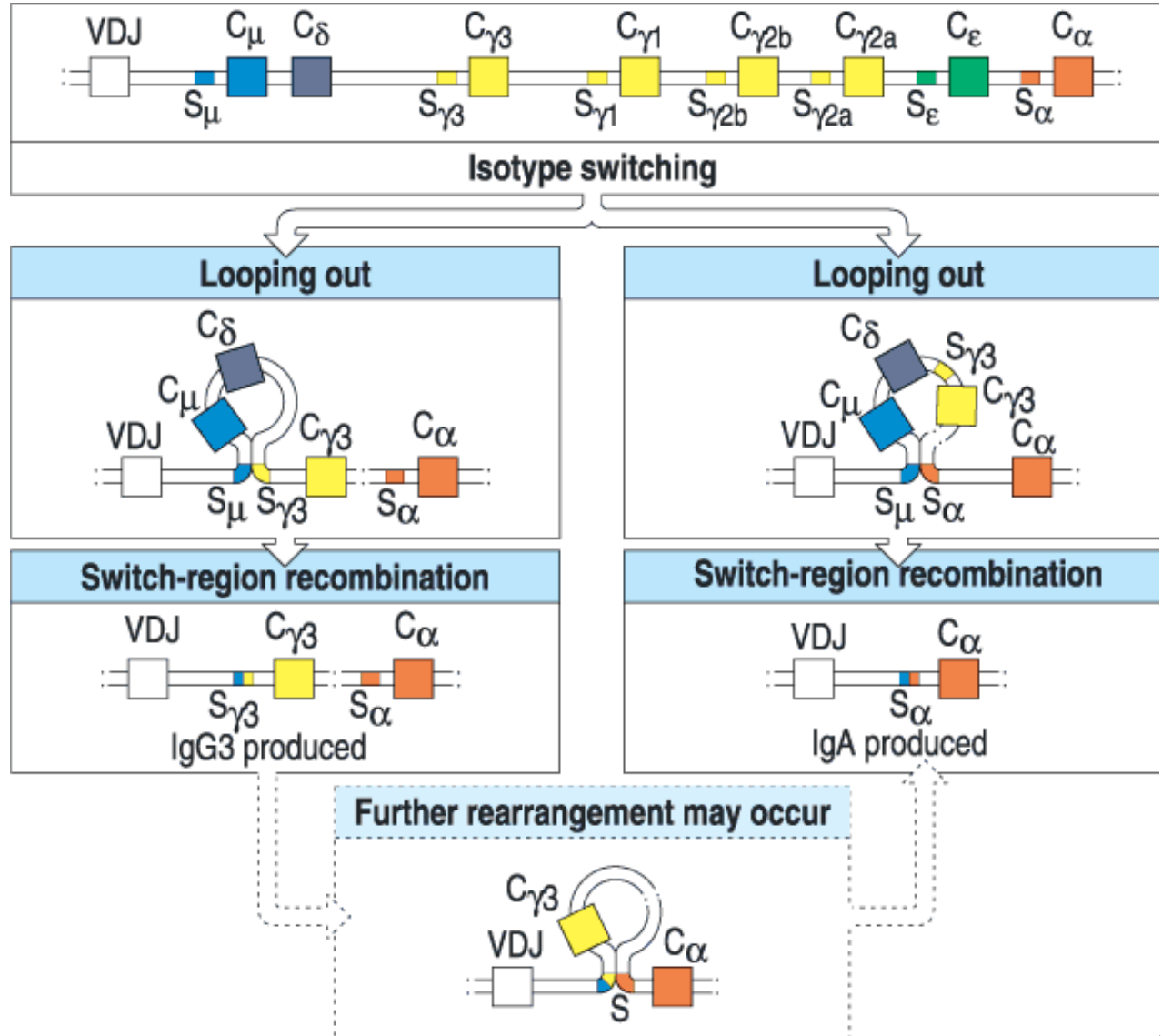
Isotype Switching: CAMBIO DI CLASSE

- Sequenze ripetute di DNA guidano isotype switching sono upstream i C-region genes.
- Switching avviene per ricombinazione tra queste regioni ripetute (**switch signals**).
- Isotype switching causa delezione di DNA tra le switch signals.
- Cambio irreversibile, non è possibile tornare indietro ma e' possibile ancora cambiare isotipo.
- L'evento iniziale avviene a partire dalle μ switch region
- Successivi switches ad altri isotipi cominciano dalla regione dopo μ switching.
- Isotype switching e' diverso dalla V(D)J:
 - Gli isotype switching sono tutti produttivi
 - Usano diversi segnali di ricombinazione ed enzimi
 - Avviene dopo la stimolazione antigenica e non durante lo sviluppo delle B-cells.
 - The switching process non è random –è' regolato da segnali esterni delle T cells.

La ricombinazione provoca il cambio di classe rimuovendo DNA

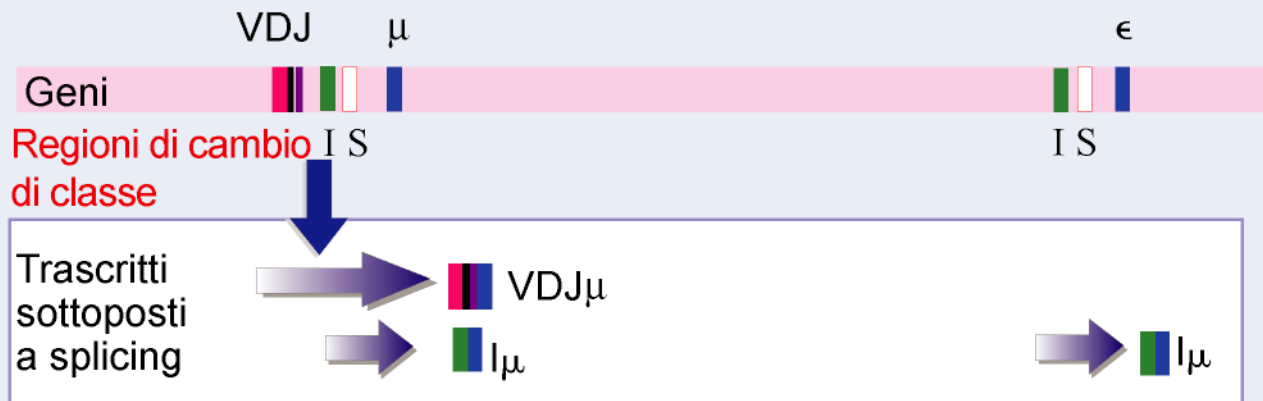


Isotype Switching Involves Recombination Between Specific Switch Signals

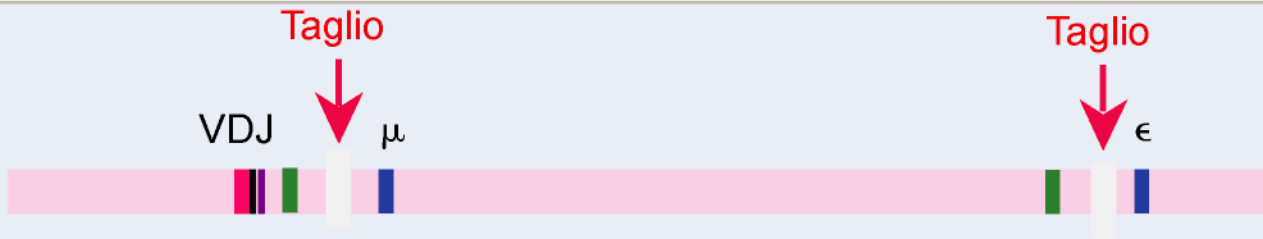


Il cambio di classe comporta espressione, taglio e unione

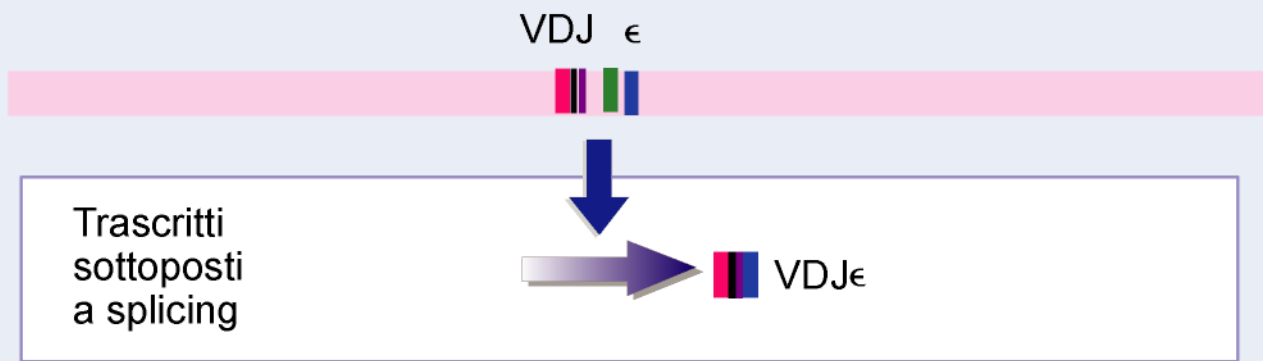
Espressione



Taglio



Unione



Lo splicing cambia gli esoni 3'

Il gene C_{μ} contiene 6 esoni



Stadio di membrana

L'RNA nucleare termina a M2

Gli esoni M1 ed M2 sono presenti nell'mRNA



Stadio di secrezione

L'RNA nucleare termina dopo l'esone 4

L'mRNA ha soltanto 4 esoni

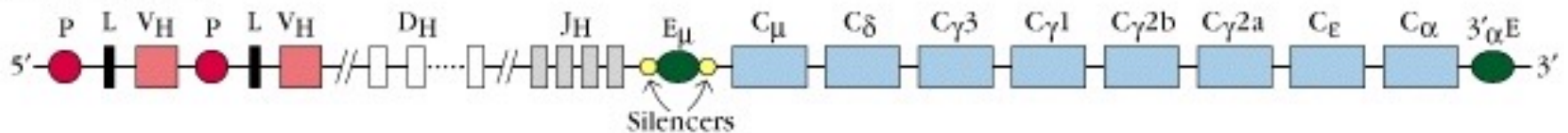


Regulation of Ig-Gene Transcription

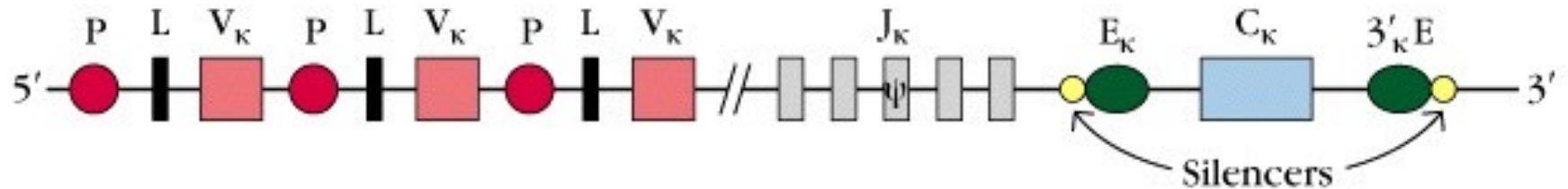
- Immunoglobulin genes are expressed only in B cells
- Genes are expressed at different rates during different stages of development
- Three major classes of cis regulatory sequences in DNA regulate transcription of Ig-genes
 - **Promoters** – short nucleotide sequences extending about 200 bp upstream from the start site, that promote initiation of RNA transcription – orientation dependent.
 - **Enhancers** – nucleotide sequences situate some distance upstream or downstream from a gene that activate transcription from the promoter sequence in an orientation-independent manner
 - **Silencers** – nucleotide sequences that down-regulate transcription, operating in both directions over a distance

Promoters, Enhancers and Silencers in H-Chain

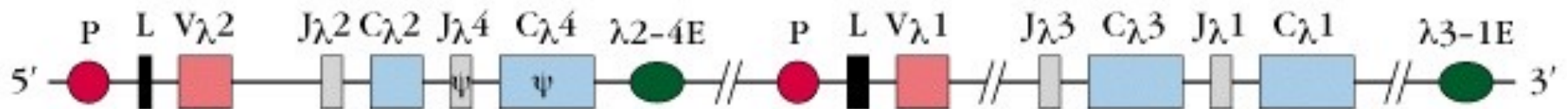
(a) H-chain DNA



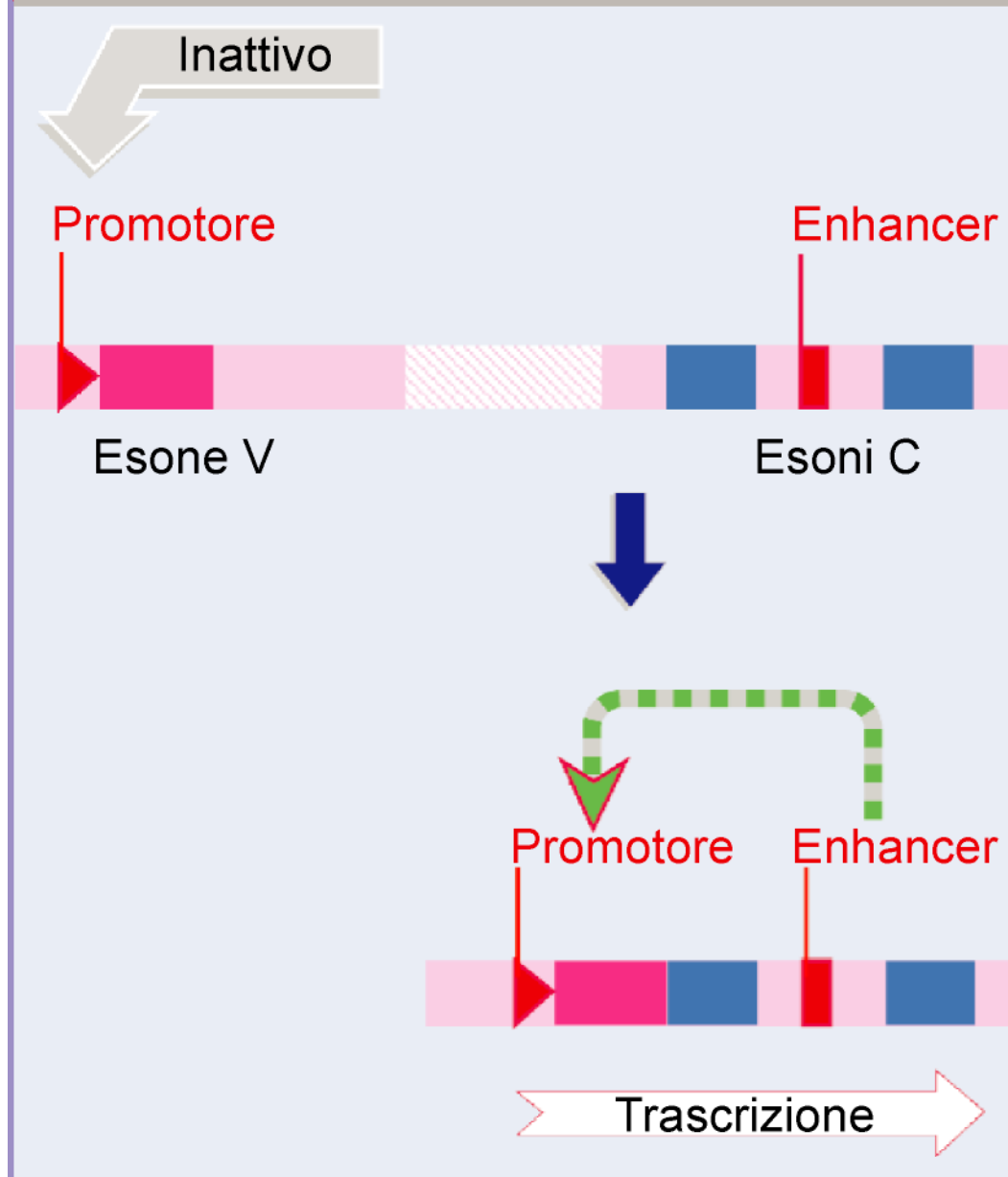
(b) κ-chain DNA



(c) λ-chain DNA

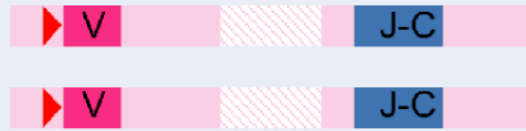


La ricombinazione attiva un promotore di un gene V

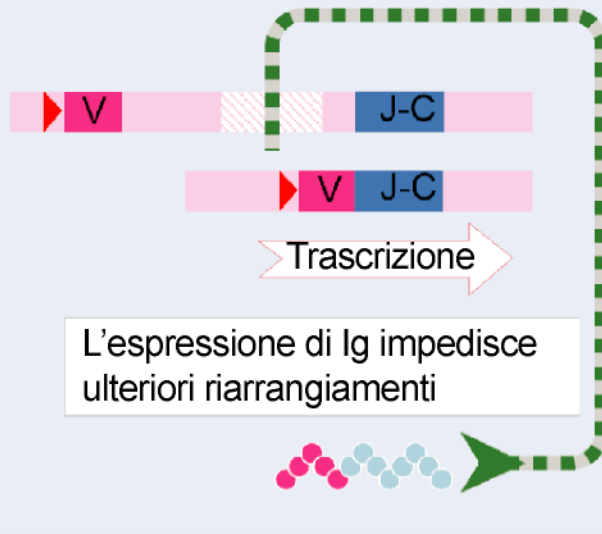


L'esclusione allelica limita il riarrangiamento riuscito a un solo allele

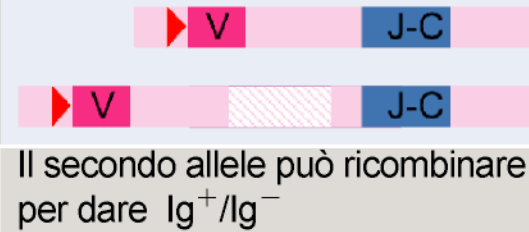
Geni della linea germinale (Ig^0/Ig^0)



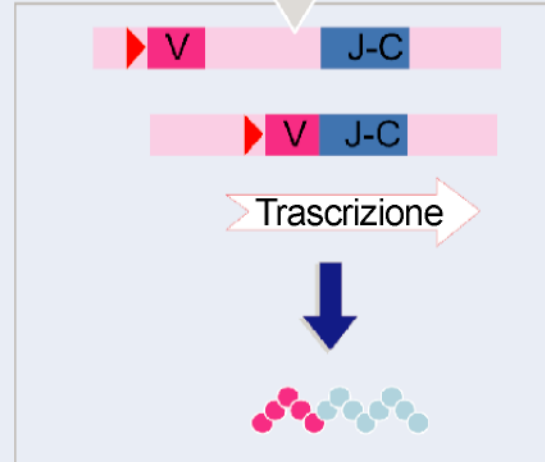
Il riarrangiamento produttivo dà Ig^0/Ig^+



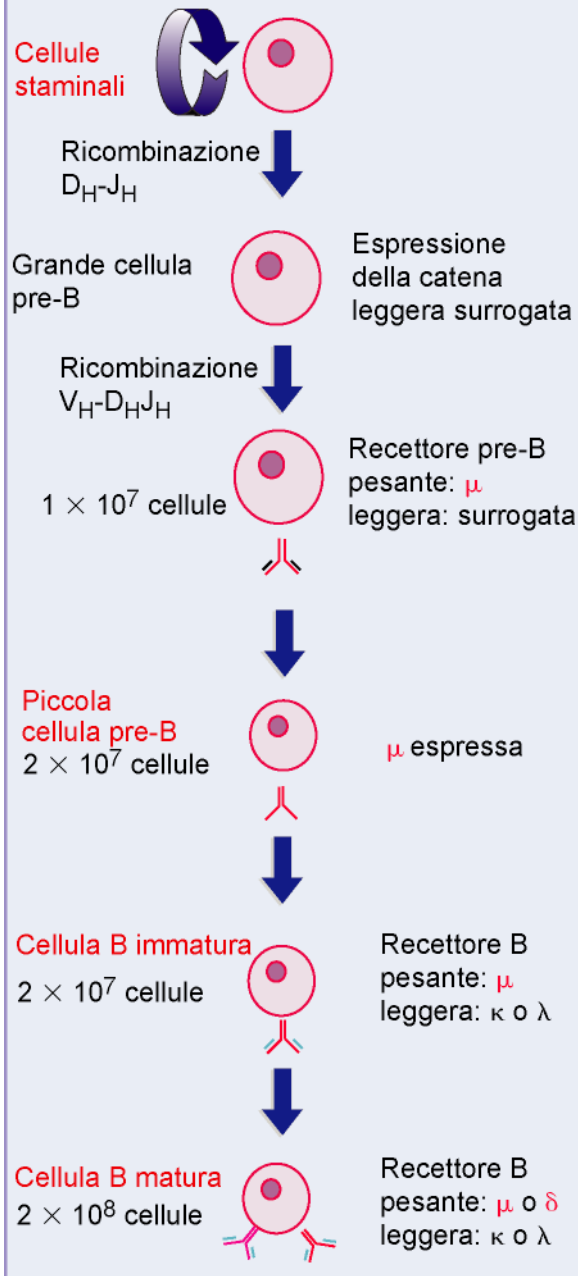
Il riarrangiamento non produttivo dà Ig^0/Ig^-

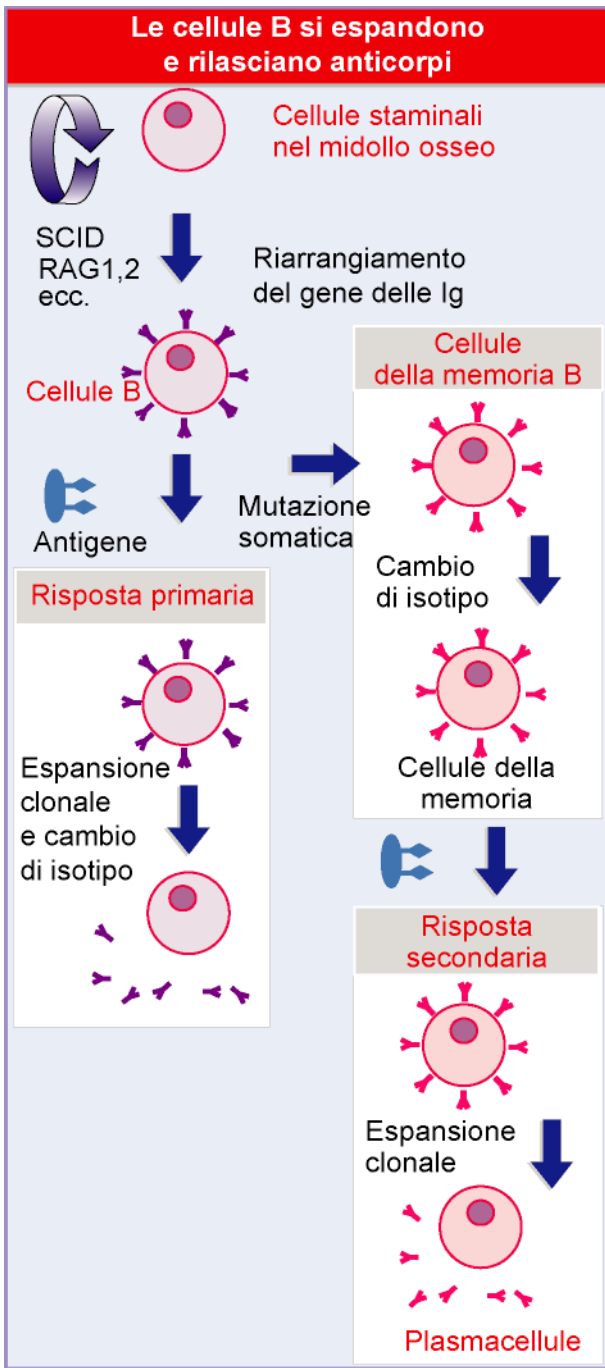


Il secondo allele può ricombinare per dare Ig^+/Ig^-

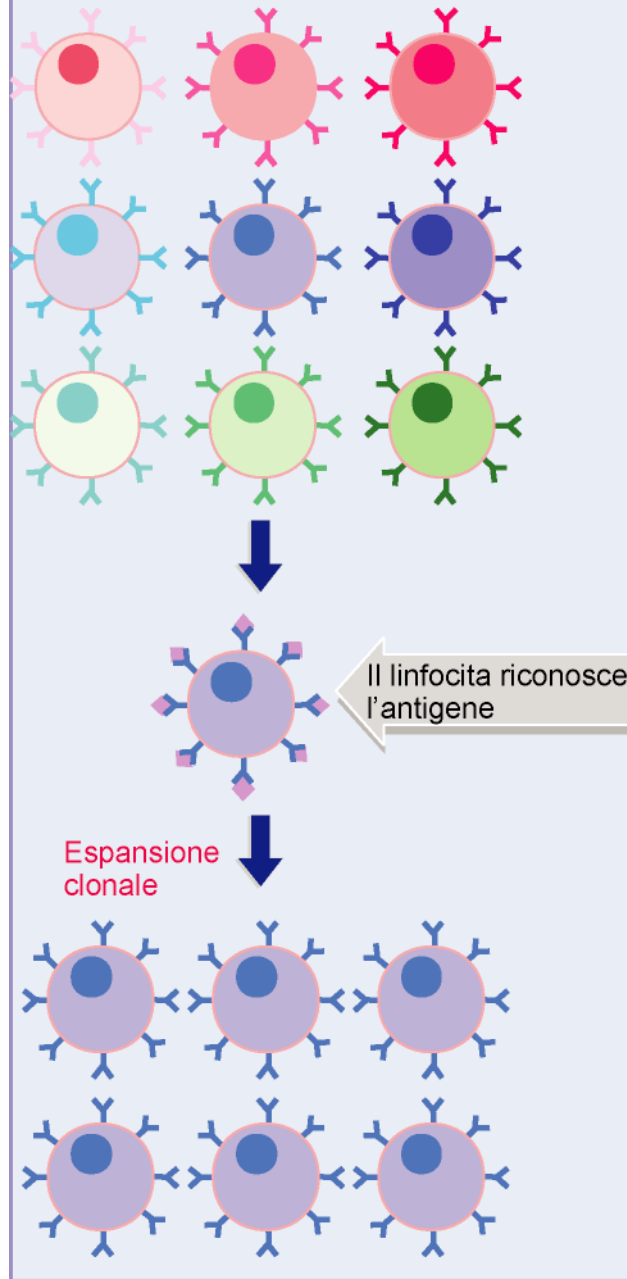


**Nello sviluppo delle cellule B
esistono stadi specifici**





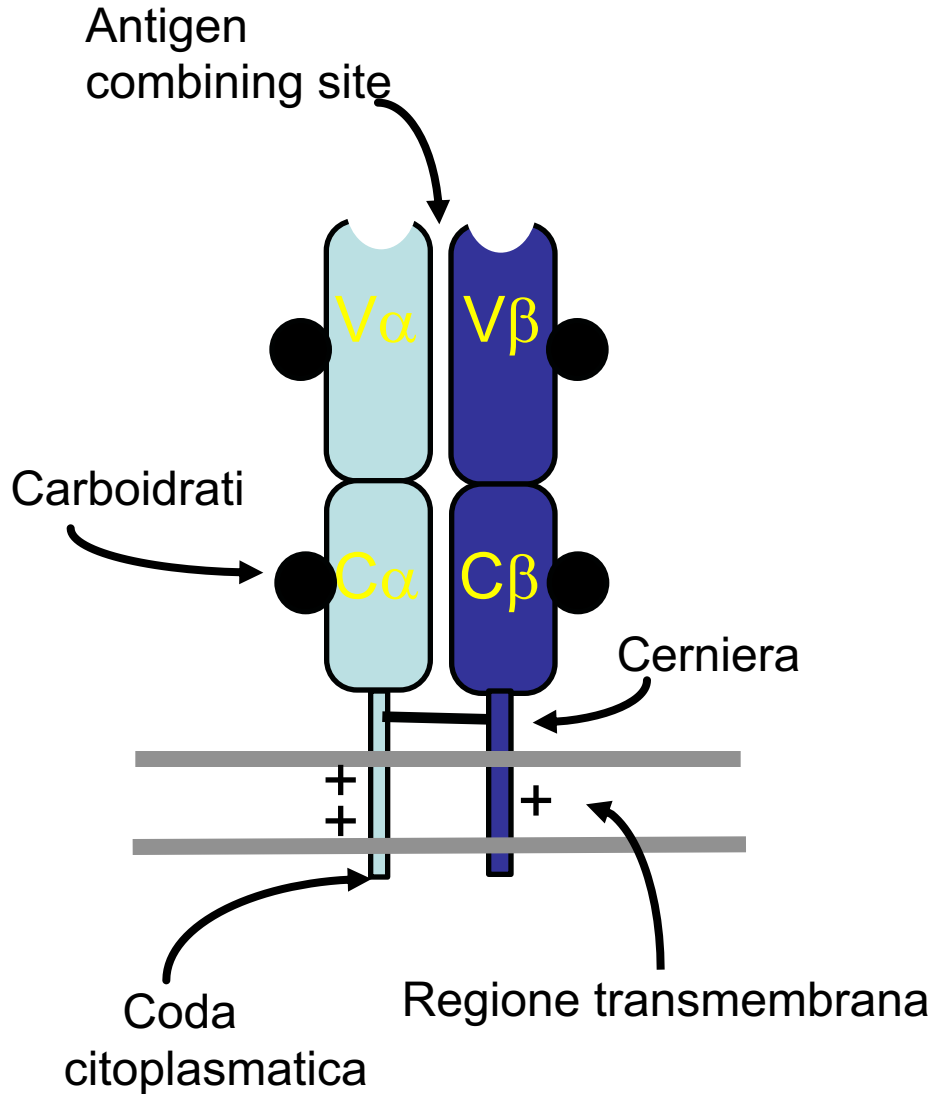
Il riconoscimento dell'antigene scatena l'espansione clonale



Antigen Receptor delle T Cell

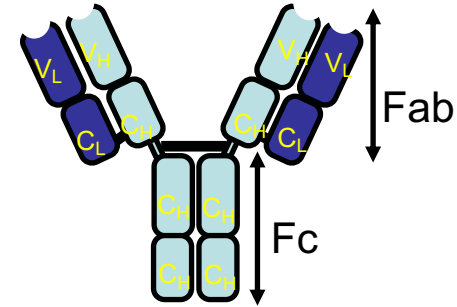
TCR

Il recettore della cellula T: TcR



Mai secreto

Resembles an Ig Fab fragment



Domain structure: Ig gene superfamily

Monovalente

Non ci sono regioni costanti alternative

Eterodimerica, catene legate da ponti S-S

Coda intracitoplasmatica corta

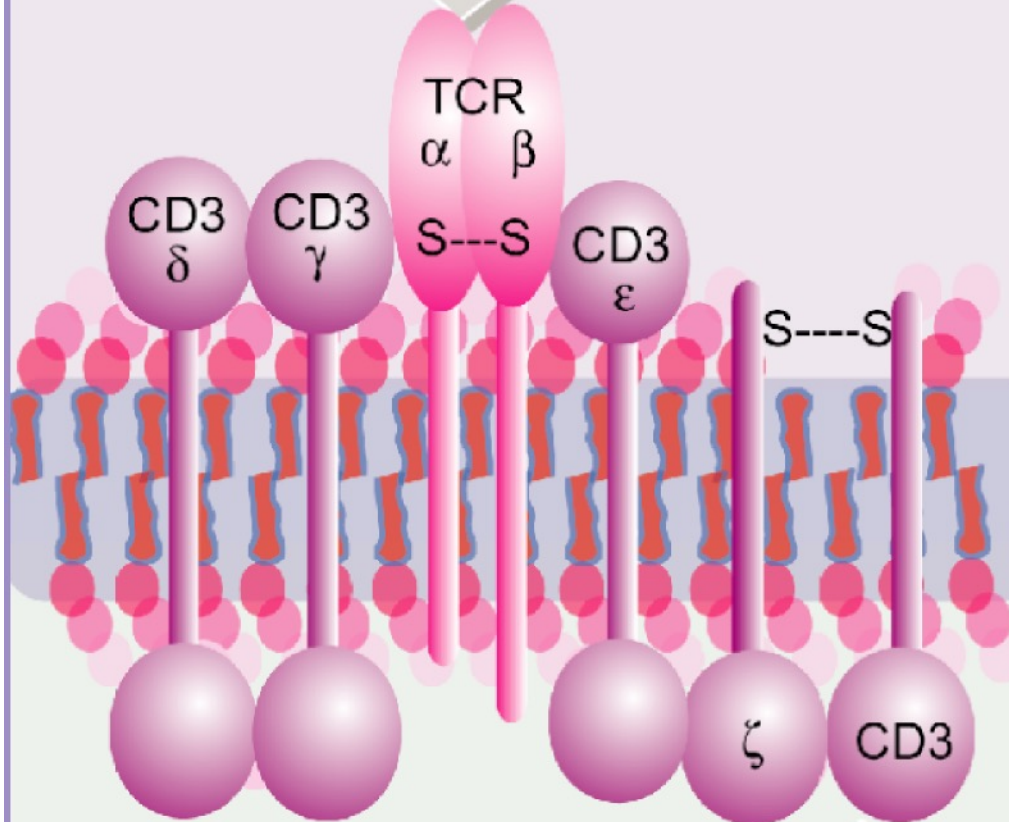
AA carichi positivamente nella regione TM

Il sito di legame dell'antigene è formato dalle regioni giustaposte Vα e Vβ

30,000 identical specificity TcR per cell

Il TCR si unisce a un complesso di segnalazione

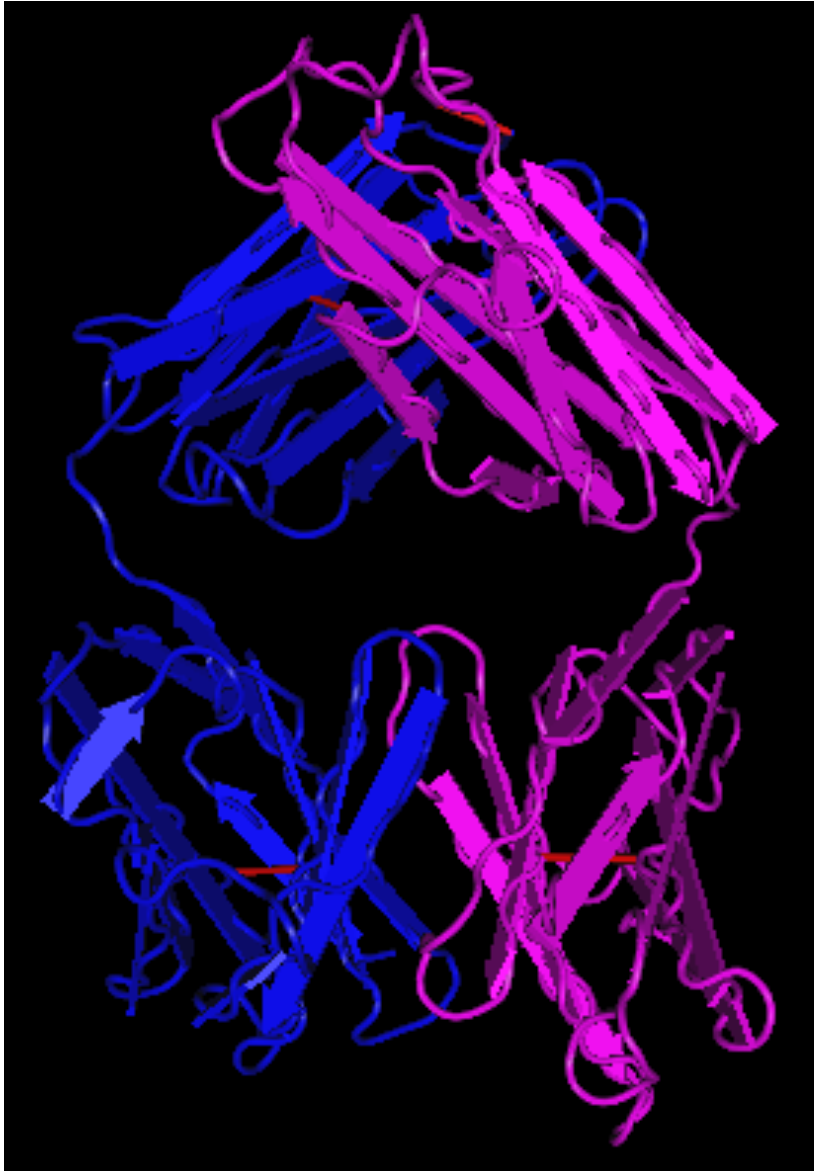
La regione V del TCR riconosce l'antigene



Citosol

La catena ζ è l'effettore

C_H C_L V_H V_L of Ig

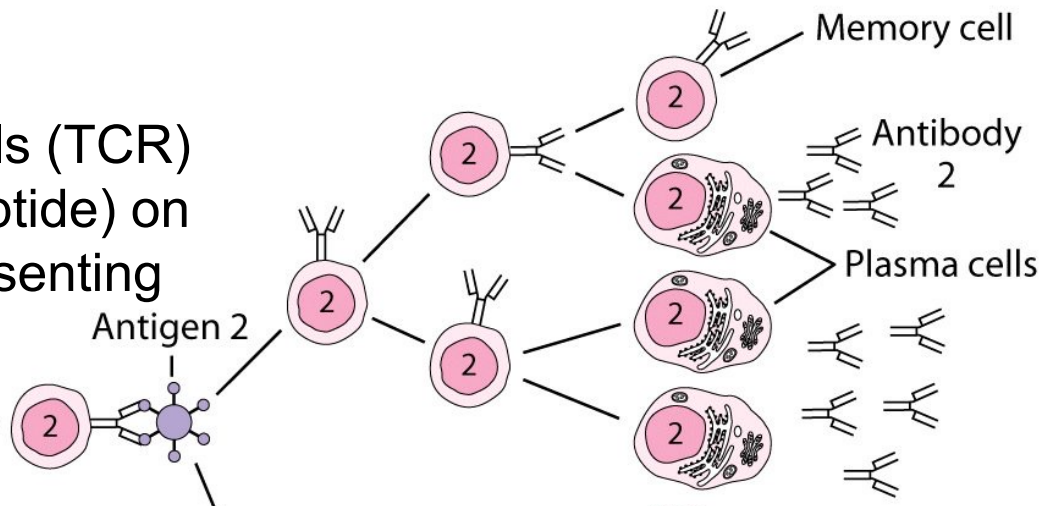







$C\beta$ $C\alpha$ $V\beta$ $V\alpha$ of the TcR

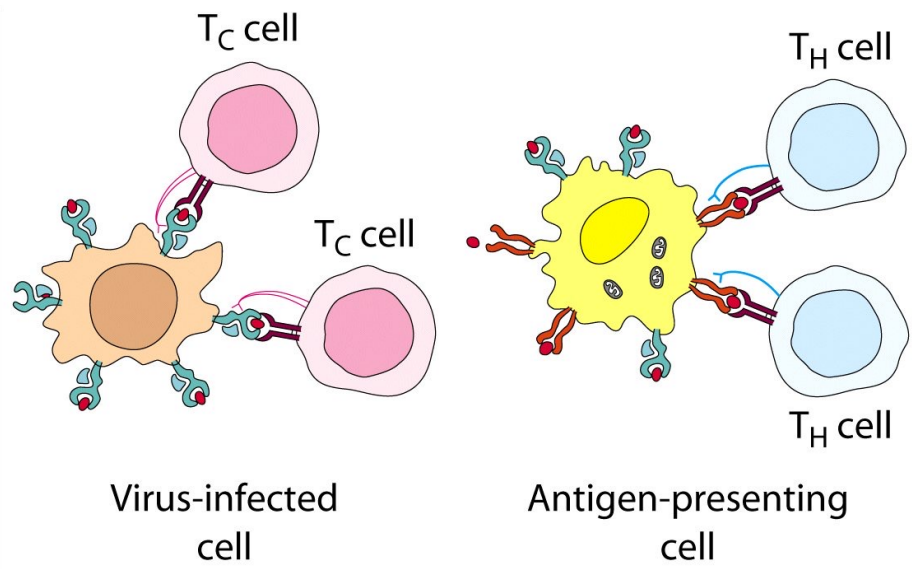


The antigen receptor of B cells (antibody) binds directly to antigen. Antibody exists in both a transmembrane receptor and secreted form.

The antigen receptor of T cells (TCR) binds processed antigen (peptide) on the surface of an antigen presenting cell. TCR exists only as transmembrane form.



- Antigenic peptide
-  Class I MHC
-  Class II MHC
-  T cell receptor
-  CD8
-  CD4



Il recettore delle cellule T lega frammenti dell'antigene

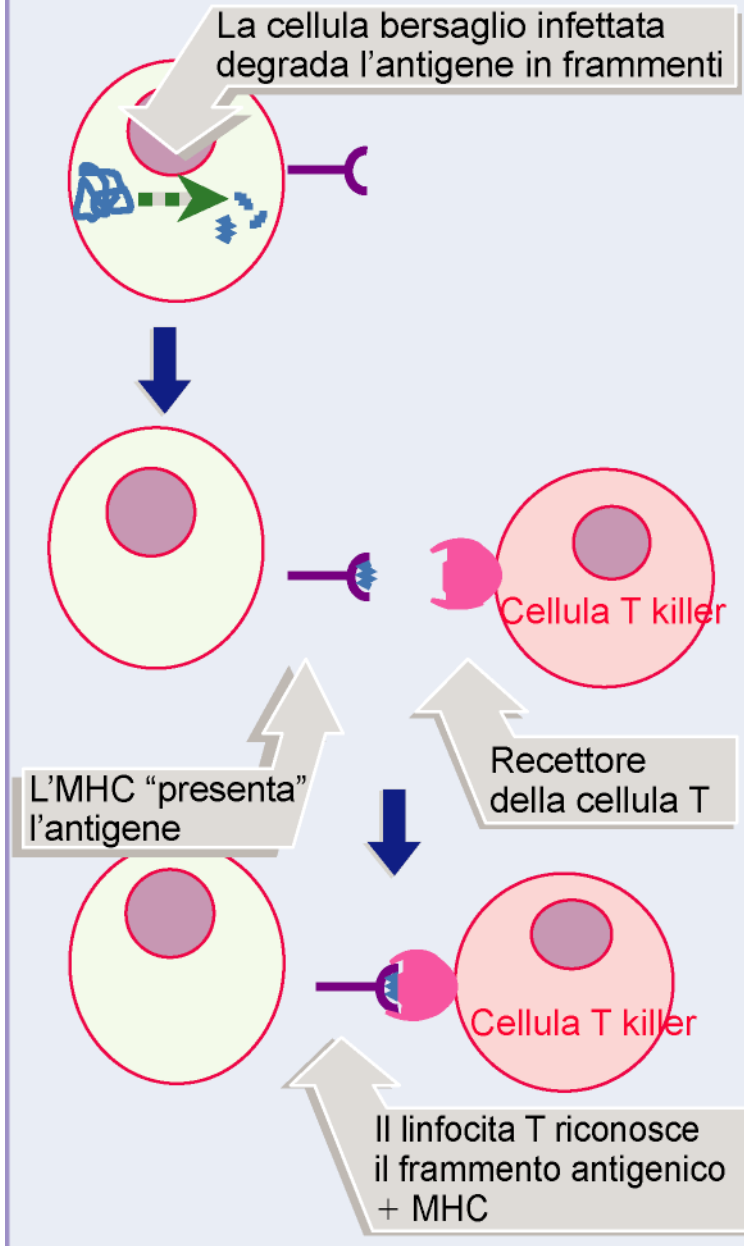


TABLE 4-2**Comparison of antigen recognition by T cells and B cells**

Characteristic	B cells	T cells
Interaction with antigen	Involves binary complex of membrane Ig and Ag	Involves ternary complex of T-cell receptor, Ag, and MHC molecule
Binding of soluble antigen	Yes	No
Involvement of MHC molecules	None required	Required to display processed antigen
Chemical nature of antigens	Protein, polysaccharide, lipid	Mostly proteins, but some lipids and glycolipids presented on MHC-like molecules
Epitope properties	Accessible, hydrophilic, mobile peptides containing sequential or nonsequential amino acids	Internal linear peptides produced by processing of antigen and bound to MHC molecules

Table 4-2
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Generazione della diversità nel TcR

COMBINATORIAL DIVERSITY

Multiple germline segments

In the human TcR

Variable (V) segments: $\sim 70\alpha$, 52β

Diversity (D) segments: 0α , 2β

Joining (J) segments: 61α , 13β

La necessità di avere l'appaiamento tra catene α e β a formare il sito di legame raddoppia il potenziale di diversità

DIVERSITA' GIUNZIONALE

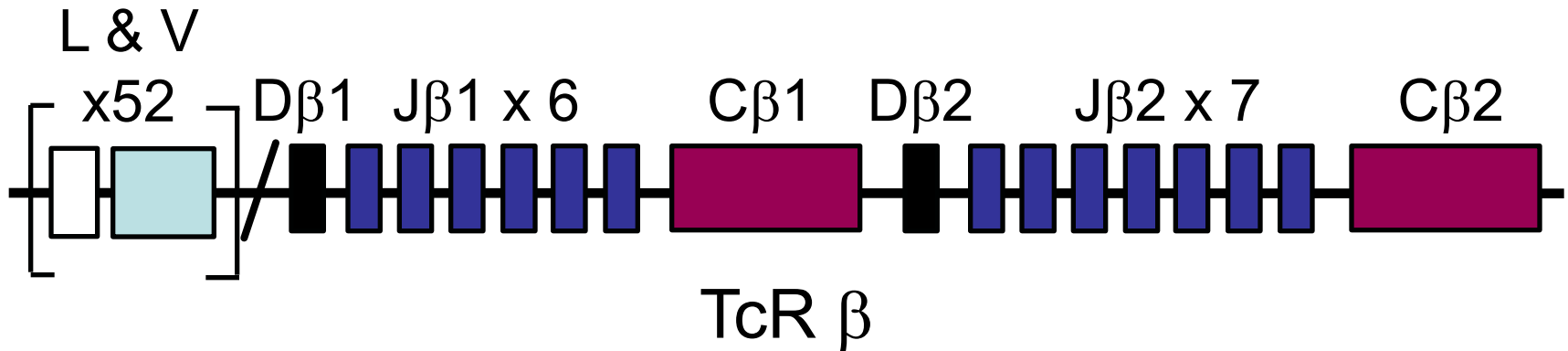
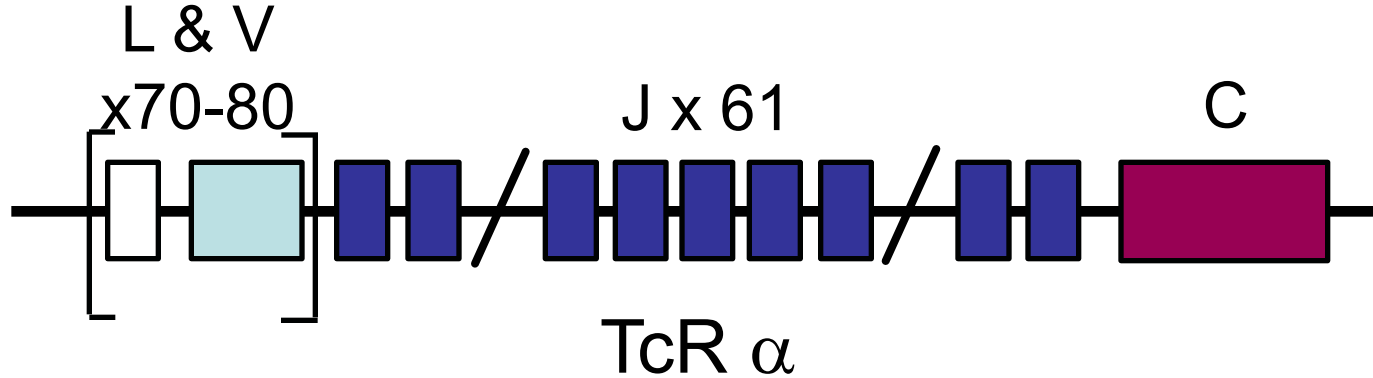
Aggiunta di nucleotidi che non necessitano di templatato (N) e oalindromici (P) Addition of non-template encoded (N) and palindromic (P) alle giunzioni imprecise tra gli elementi V-D-J

NON C'E' SOMATIC MUTATION NEL TcR

Ci sono anche linfociti che non hanno TCR $\alpha\beta$ ma TCR $\gamma\delta$

Il TCR $\gamma\delta$ è strutturalmente molto simile all' $\alpha\beta$, ma non utilizza [CD4](#) e [CD8](#) come co-recettori, per cui i linfociti T $\gamma\delta$ sono CD4⁻ e CD8⁻. Questa sottoclasse di linfociti, negli animali, è preponderante a livello epiteliale, nell'uomo però anche nella mucosa intestinale, che ne è particolarmente ricca, assommano a non più del 15% del totale, mentre sono il 10% dei linfociti T totali.

Organisation of TcR genes



TcR genes segmented into V, (D), J & C elements
(**VARIABLE, DIVERSITY, JOINING & CONSTANT**)

Closely resemble Ig genes (α ~IgL and β ~IgH)

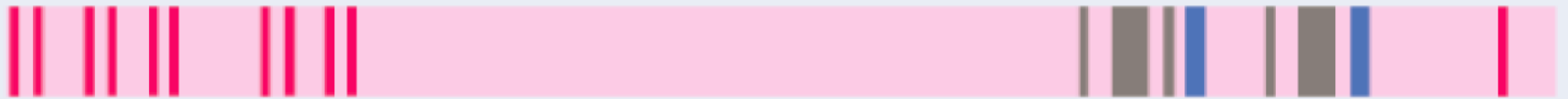
This example shows the mouse TcR locus

Il TCR β è simile nell'uomo e nel topo

Organizzazione del topo
e dell'uomo

V
<60

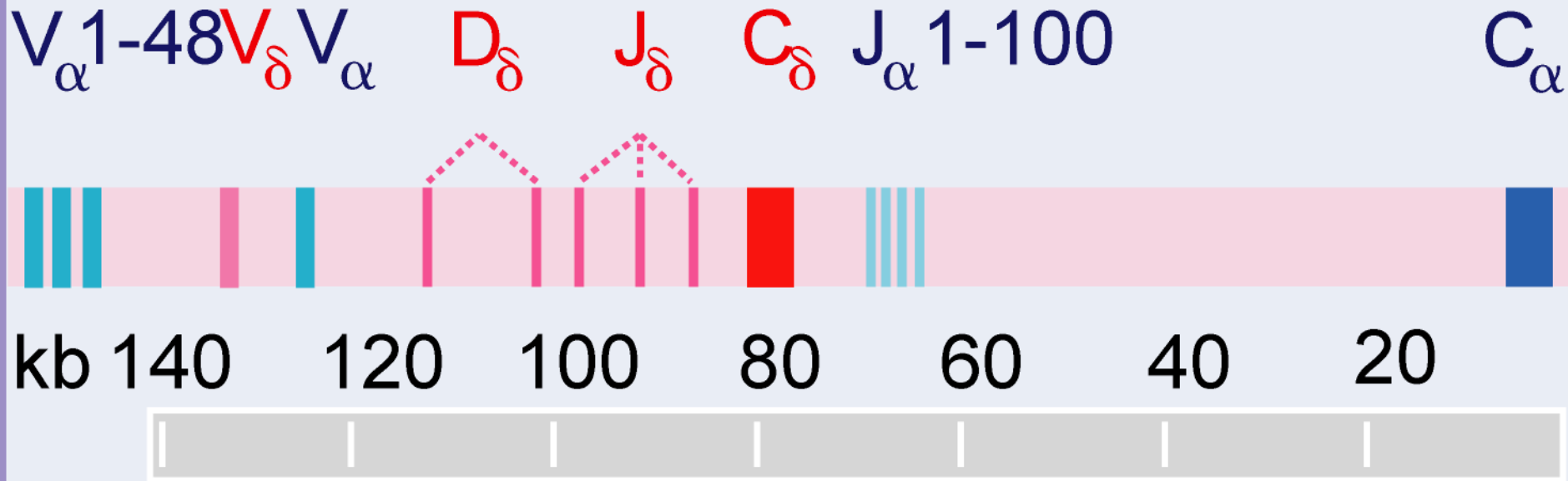
$\beta 1$		$\beta 2$		V
D	J	D	J	V
1	6	1	7	1



Totale β umane: 47 V, 2 D, 13 J

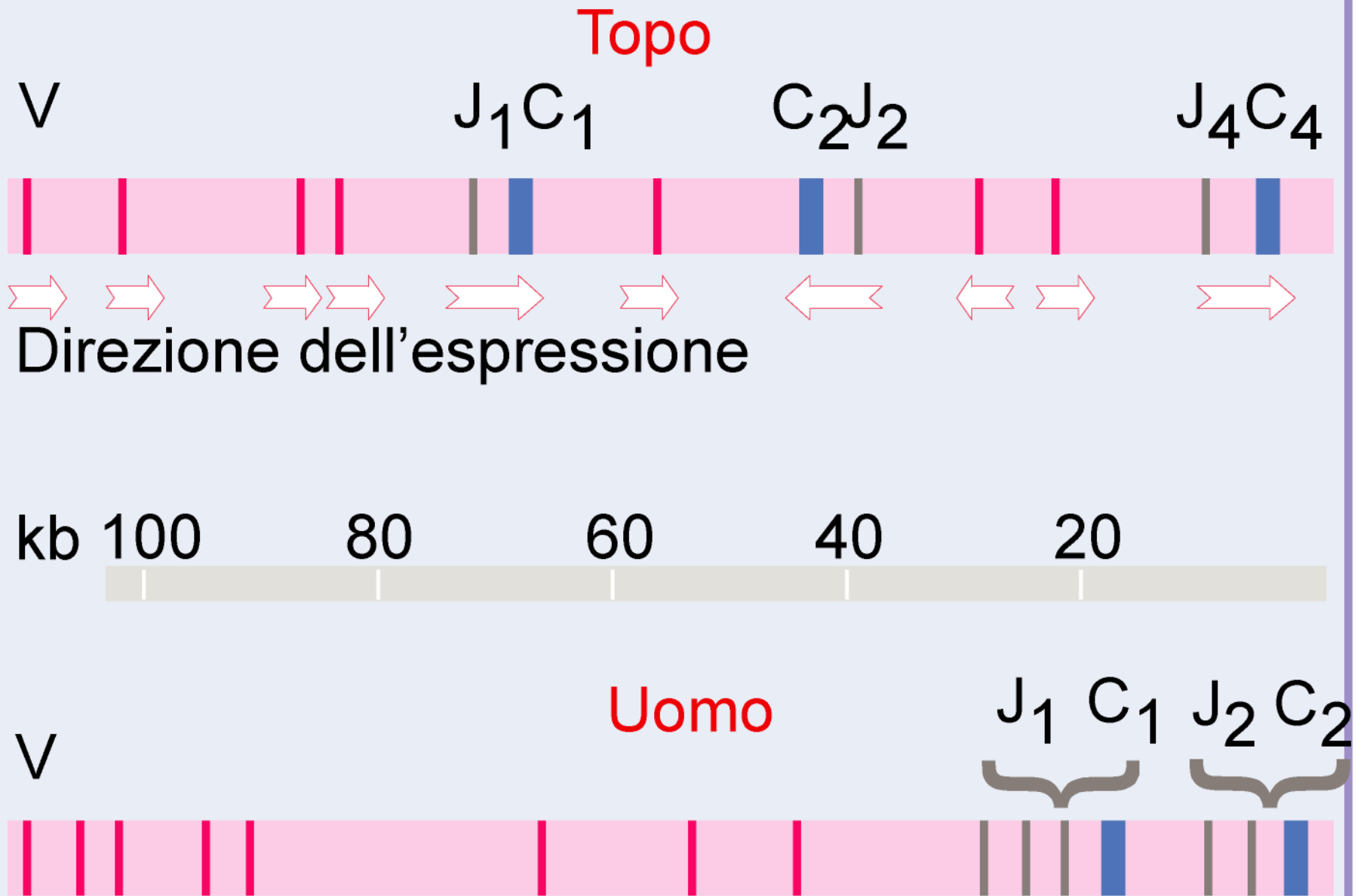
Il locus del TCR α ha geni α e δ

Organizzazione del topo e dell'uomo

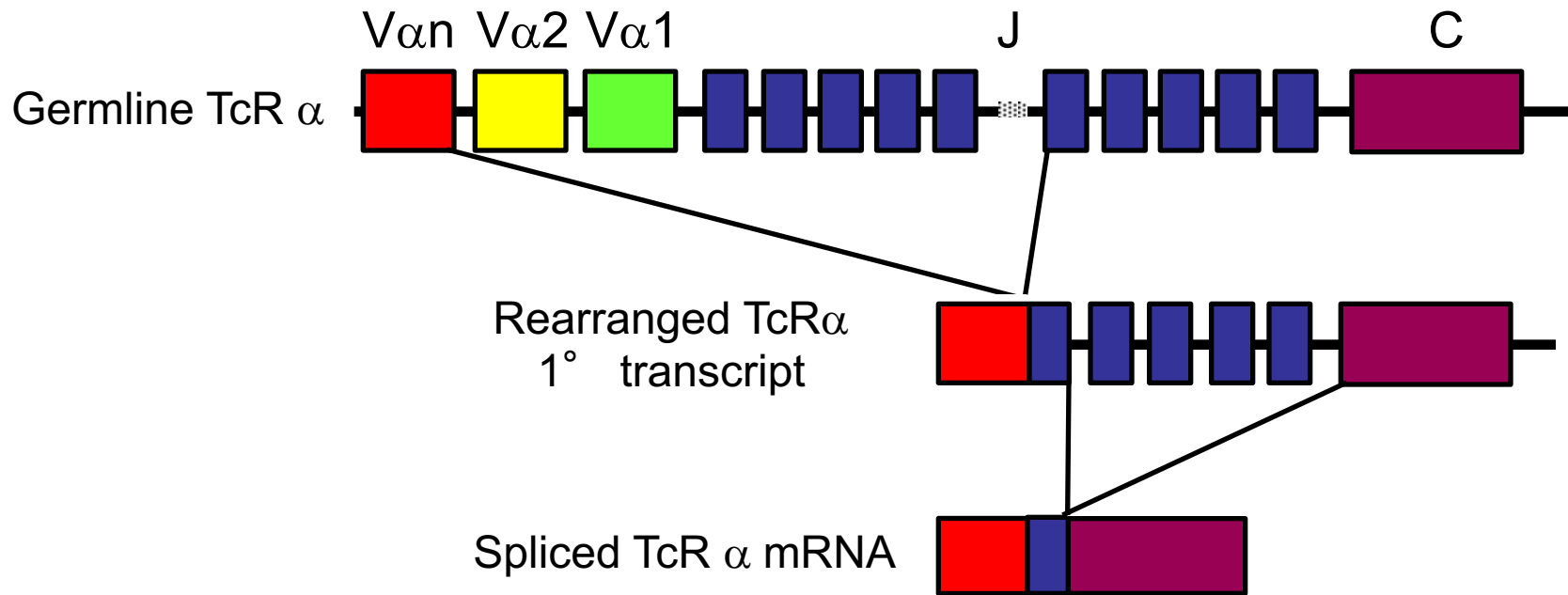


Totale α umane: 42 V 61 J

Il TCR γ ha meno diversità



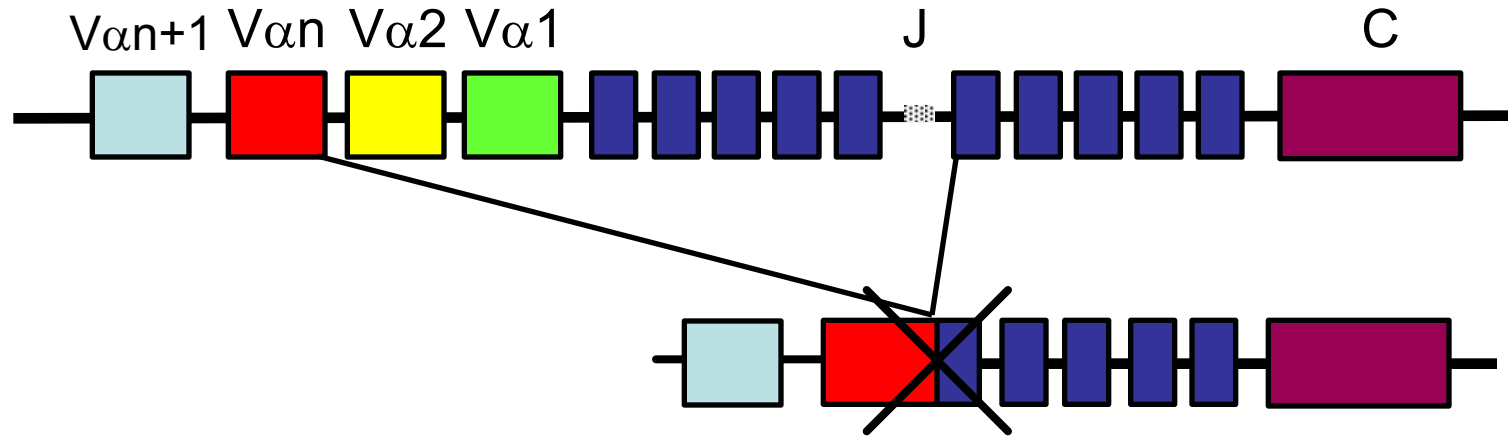
TcR α gene rearrangement by **SOMATIC RECOMBINATION**



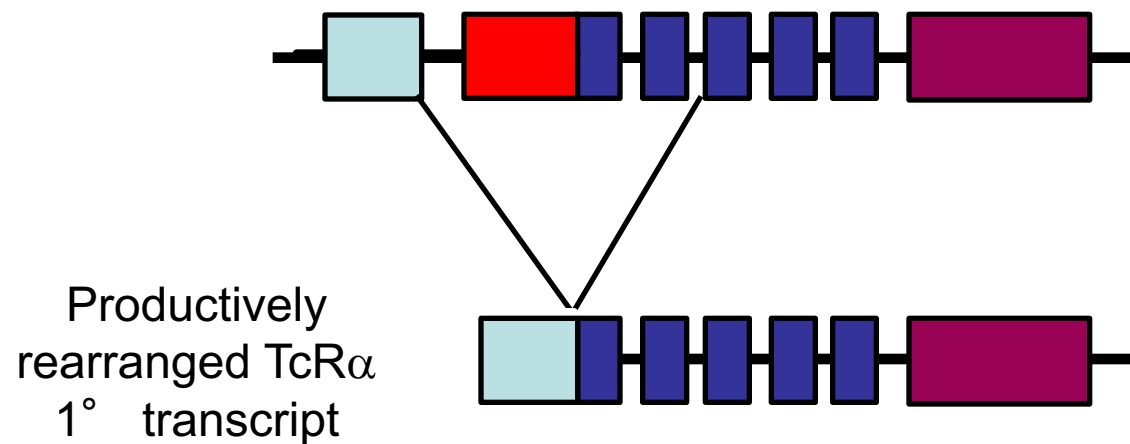
Rearrangement very similar to the IgL chains

TcR α gene rearrangement **RESCUE PATHWAY**

There is only a 1:3 chance of the join between the V and J region being in frame

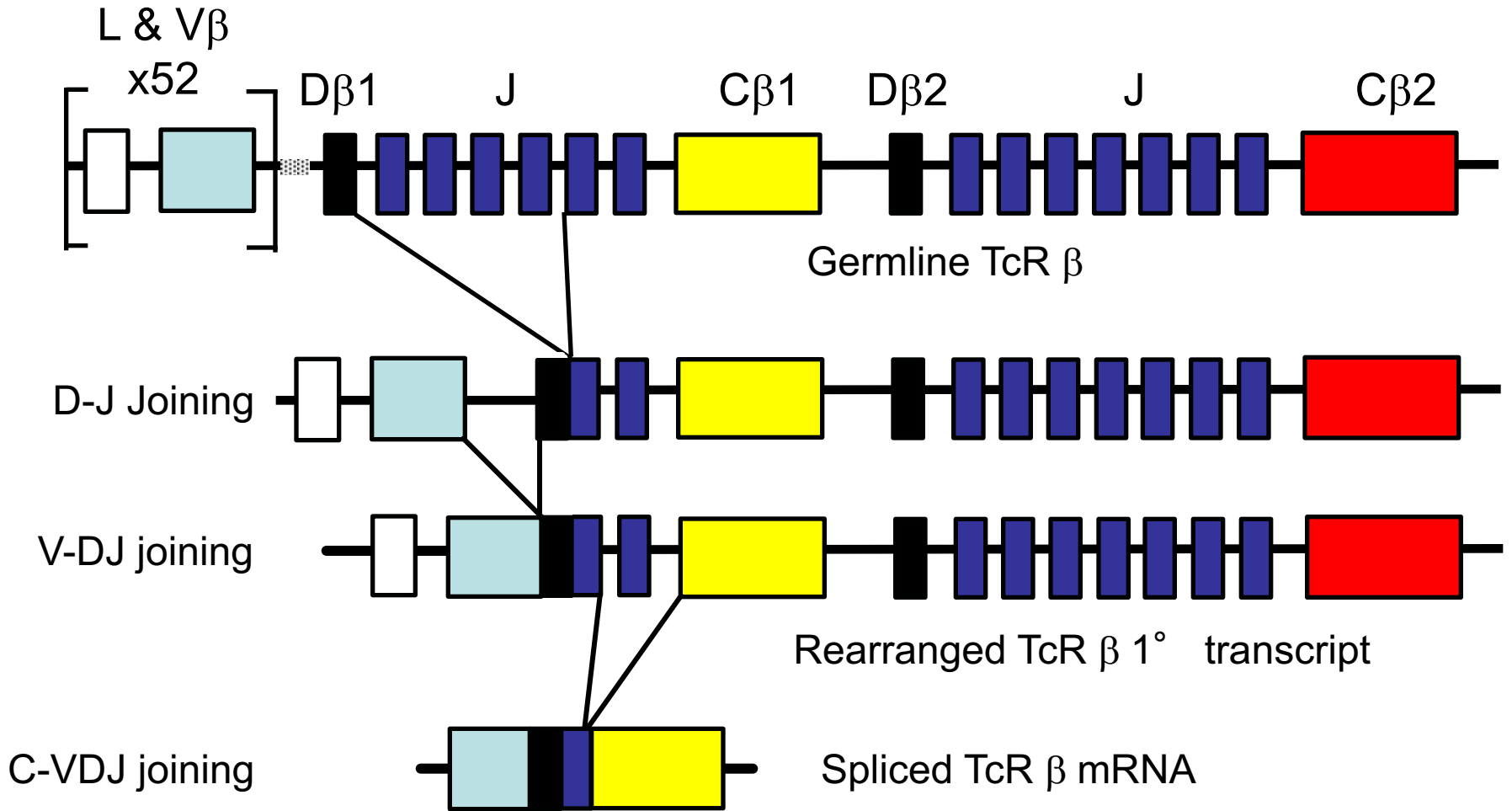


α chain tries for a second time to make a productive join using new V and J elements



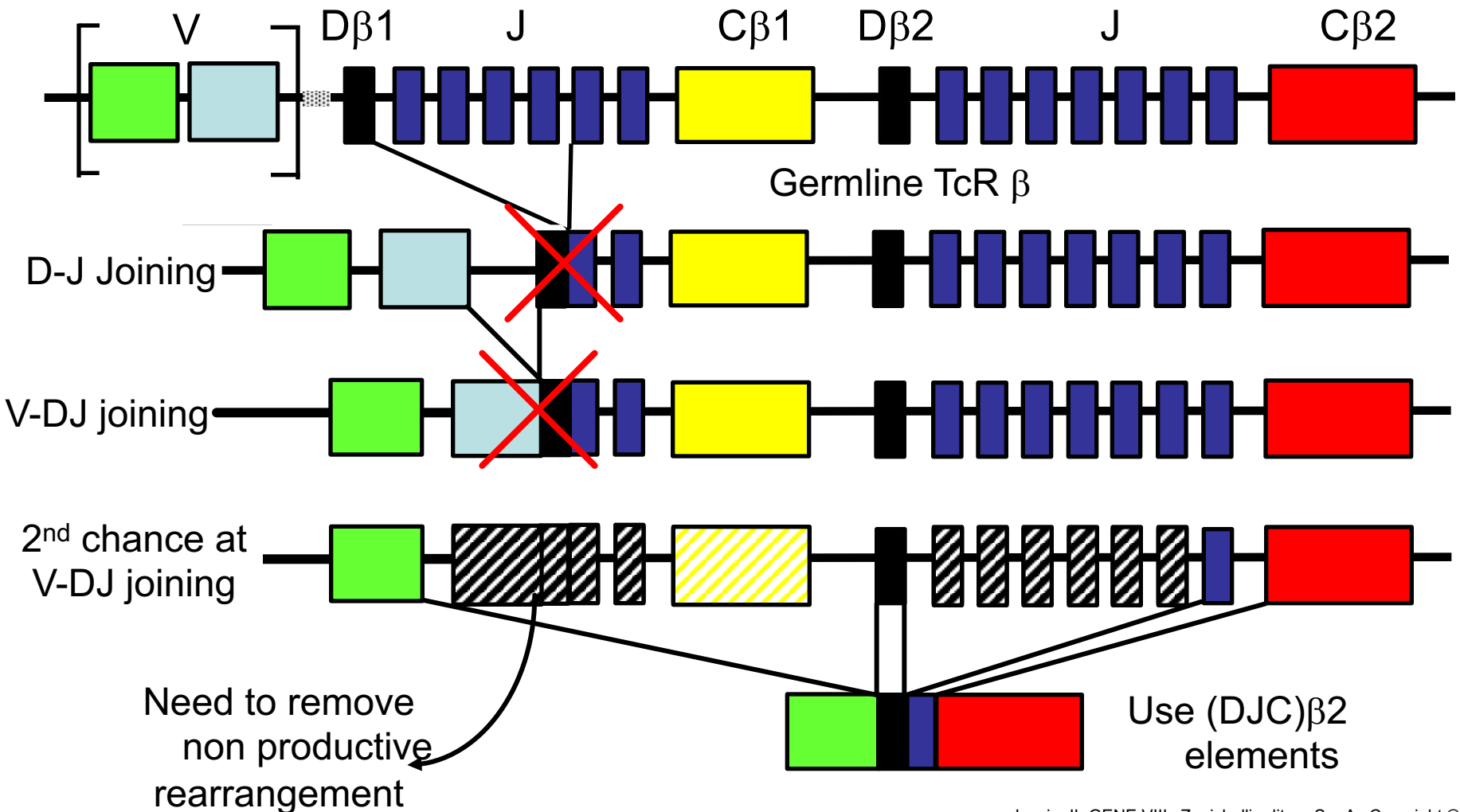
TcR β gene rearrangement

SOMATIC RECOMBINATION



TcR β gene rearrangement **RESCUE PATHWAY**

There is a 1:3 chance of productive D-J rearrangement and a 1:3 chance of productive V-DJ rearrangement
(i.e only a 1:9 chance of a productive β chain rearrangement)



Nello sviluppo delle cellule T ci sono tre stadi

CD4⁻CD8⁻



Ricombinazione
mediata da RAG



Espressione
di TCR β



TCR β si lega
a una catena α
surrogata



Espressione
di preTCR α



Espressione
di CD4 e CD8



CD4⁺
CD8⁺

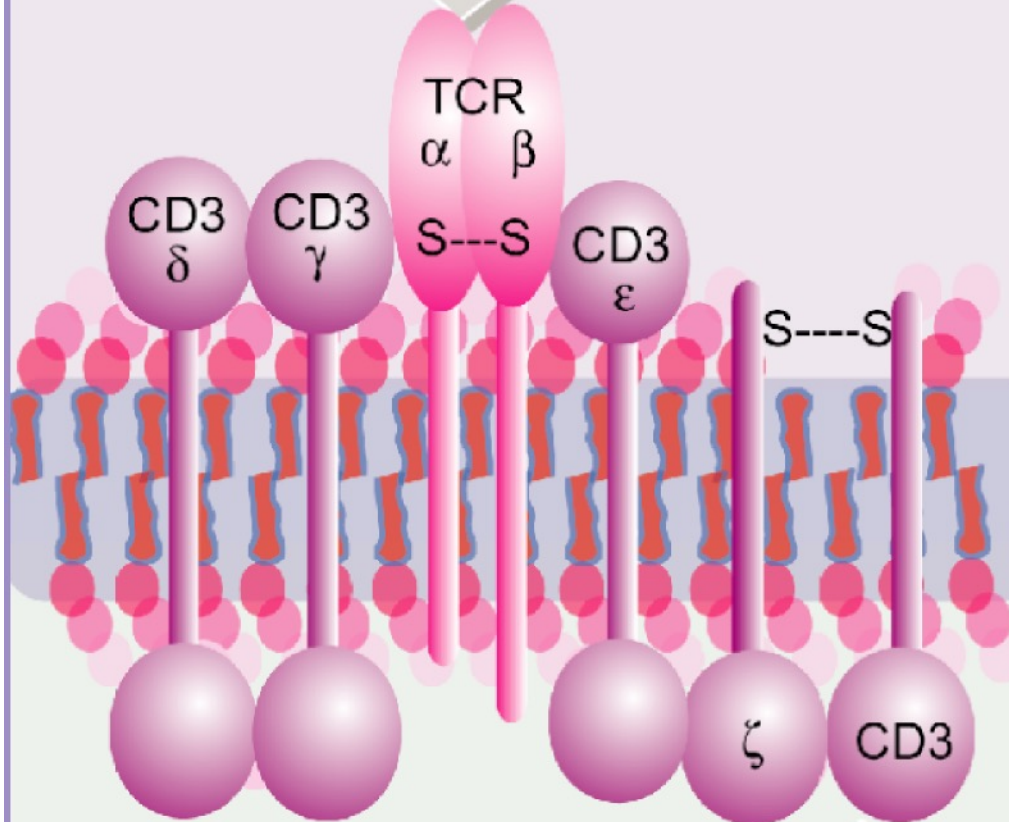


Espressione
di TCR β



Il TCR si unisce a un complesso di segnalazione

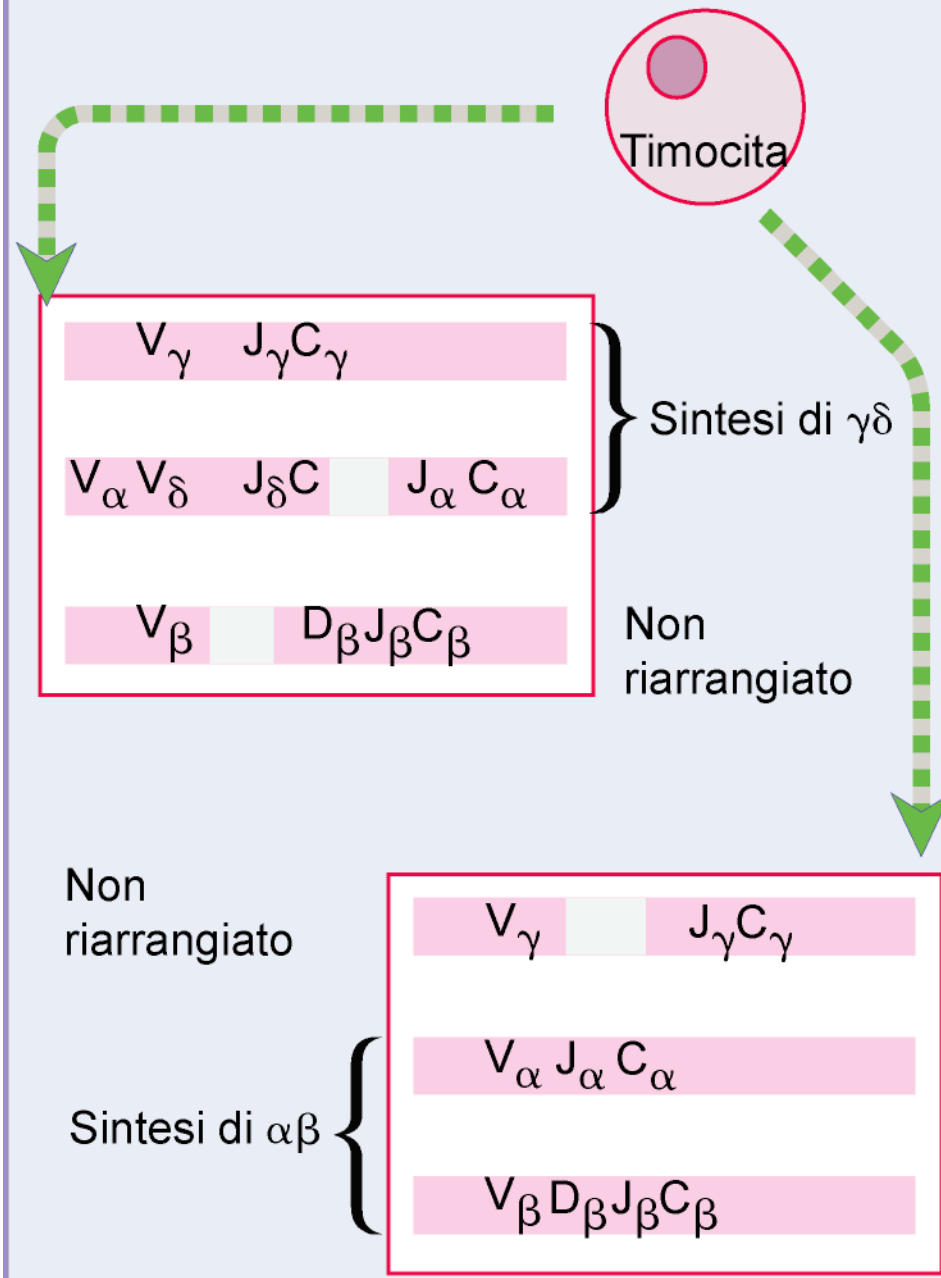
La regione V del TCR riconosce l'antigene



Citosol

La catena ζ è l'effettore

Ci sono due tipi di recettori delle cellule T

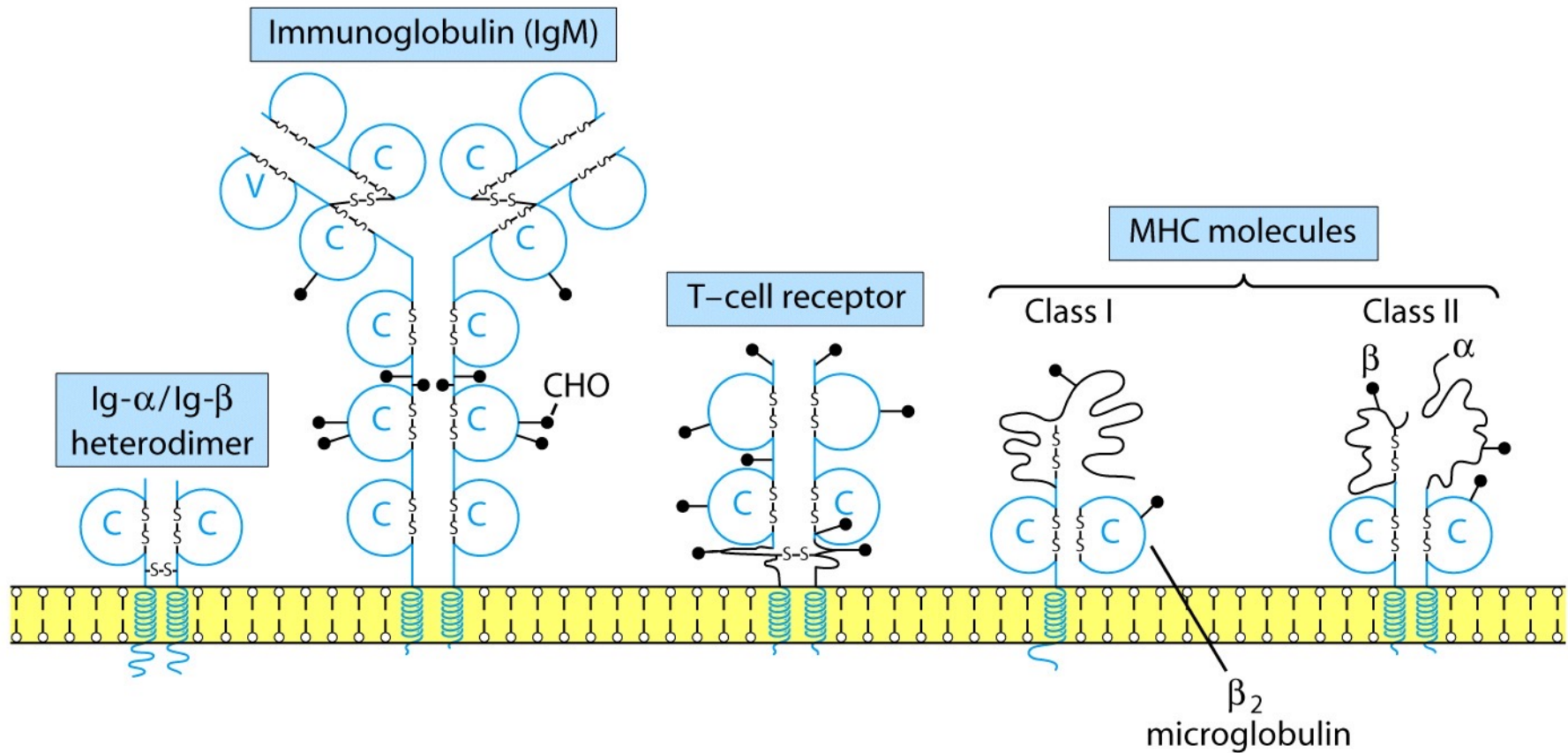


Le MHC, Major Histocompatibility Complex o HLA, Human leukocyte antigen

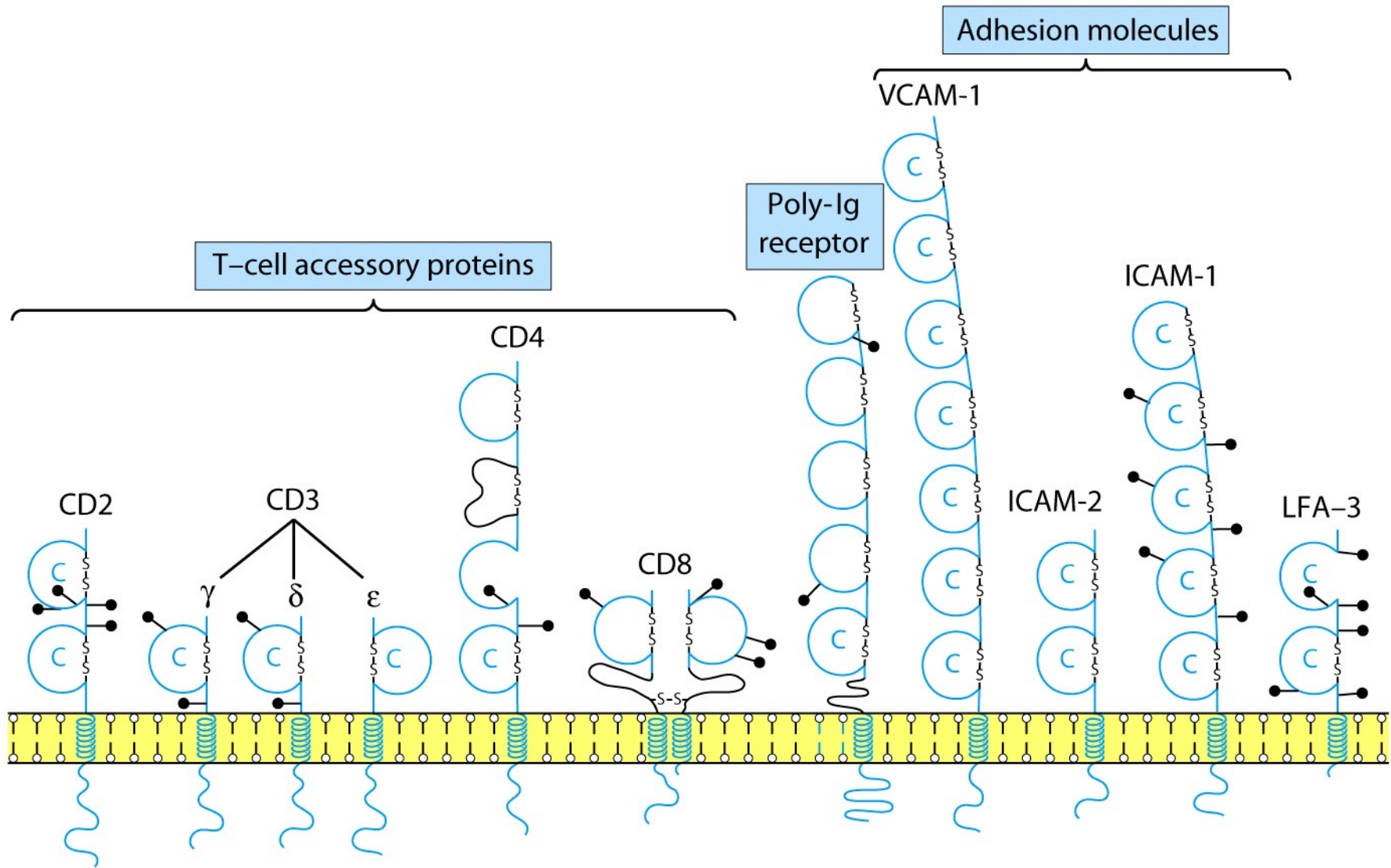
Le famiglie multigeniche

- **Famiglie multigeniche:** set di geni che derivano dalla duplicazione e variazione da un gene ancestrale. Questi geni possono essere raggruppati insieme sullo stesso cromosoma, oppure dispersi su più cromosomi.
- Es: hemoglobins, immunoglobulins, T cell receptors, histocompatibility antigens, actins, tubulins, histones, ribosomal RNA, and transfer RNA genes, to mention a few.
- Le Ig' s e le MHC sono anche parte di una **supergene families**.
- **Multigene families:** gruppi di geni con sequenze omologhe e funzioni simili.
- **Supergene-families:** gruppo di geni che hanno un'origine comune ma funzioni non relate. (e.g. MHC vs. CD4)

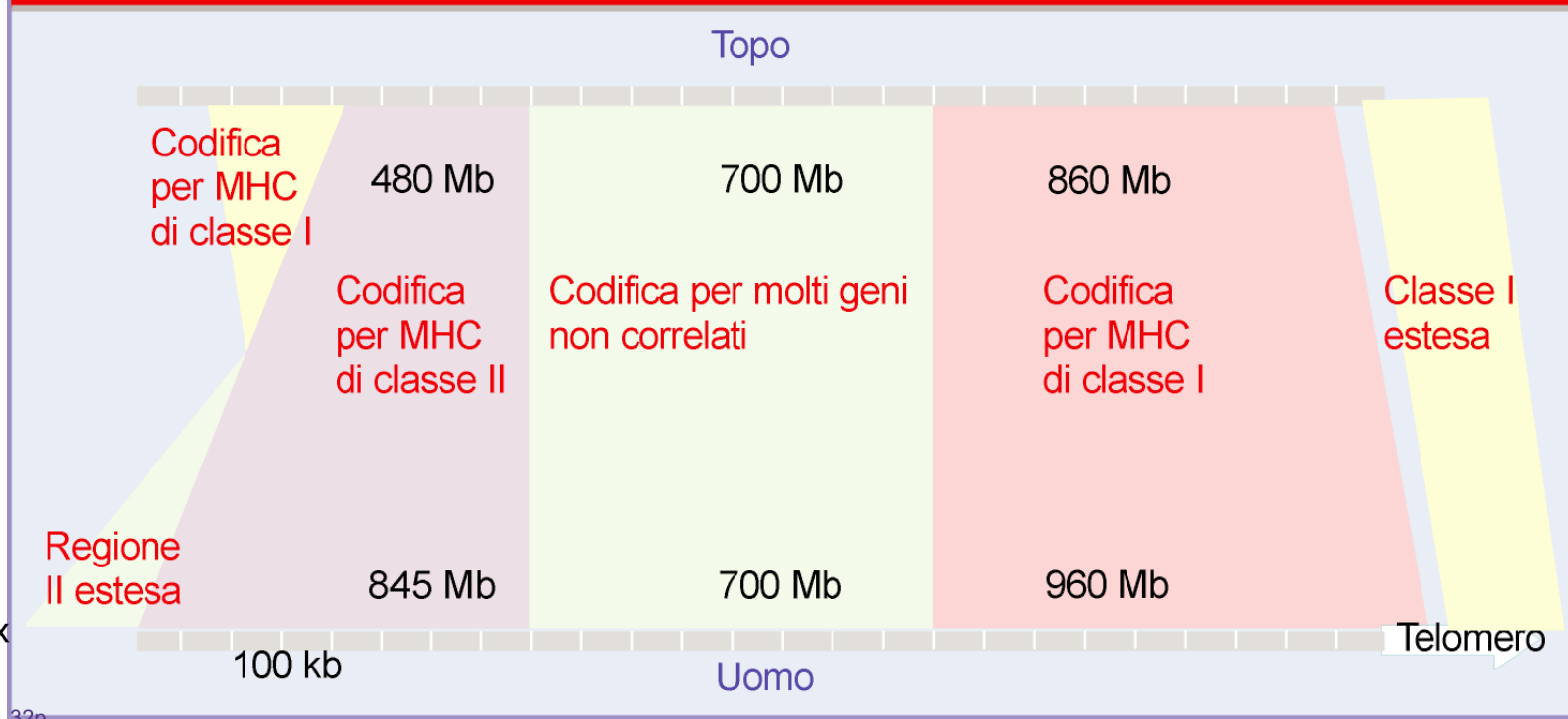
Some Members of the Ig-Supergene Family



Some Members of the Ig-Supergene Family



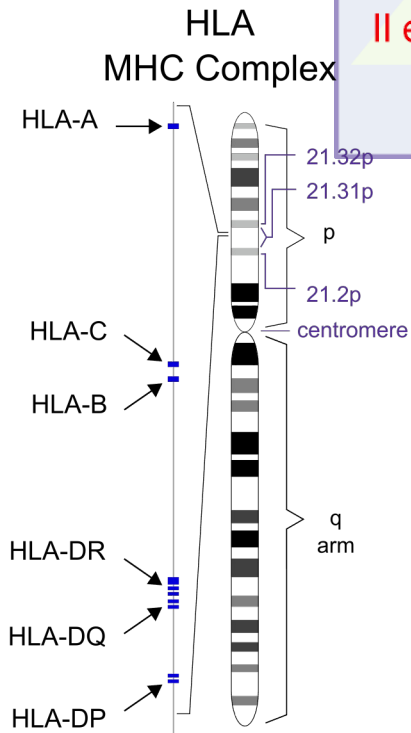
Le proteine MHC sono codificate nei mammiferi da regioni omologhe molto lunghe



Cromosoma 6 uomo
Cromosoma 17 topo

MHC di classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C)
MHC classe II (HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR)

Più altre molecole

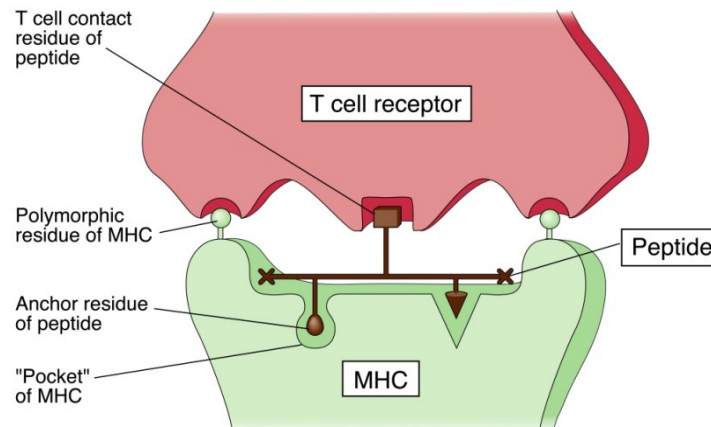


human chromosome 6

MHC & T cells

- T cells have a requirement to recognise both the ANTIGEN and the MHC molecule. This is because the molecular structure of the MHC-Antigen complex is arranged so that some of the polymorphic amino acids of the MHC molecule are in direct contact with the TCR
 - Therefore T cell recognition of antigen is said to be MHC 'restricted'.

T Cell recognition of a peptide-MHC complex



Antigen Processing and Presentation

- Fragmentation of protein into peptides
- Association of peptide with an MHC molecule
- Transport to cell surface for expression
- Different cellular pathways for association of peptide with MHC class I and class II molecules

MHC & Antigens

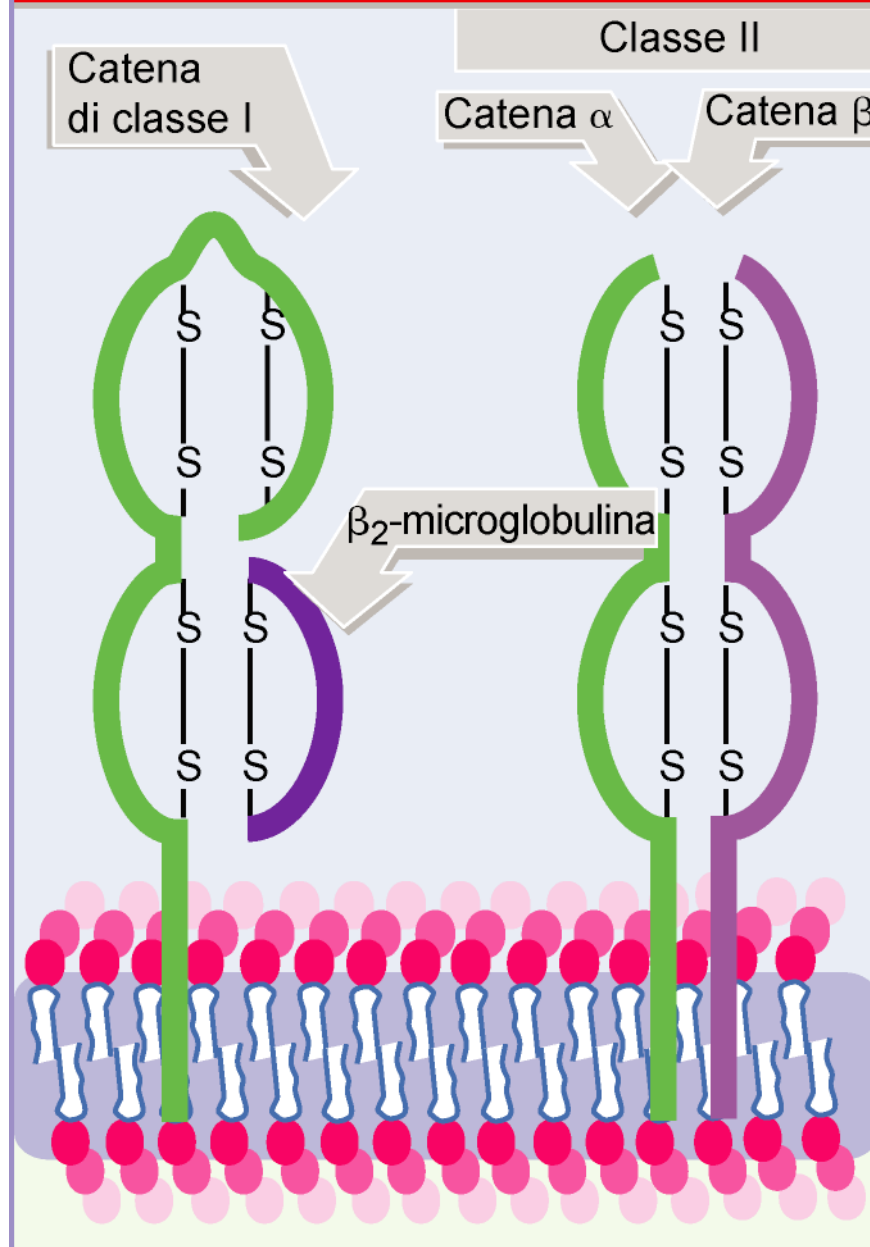
- MHC Class I

- present endogenously derived peptides.
- these can be either self or derived from viruses
- because MHC Class I is present on all cells any cell can interact with T cells if infected by a virus

- MHC Class II

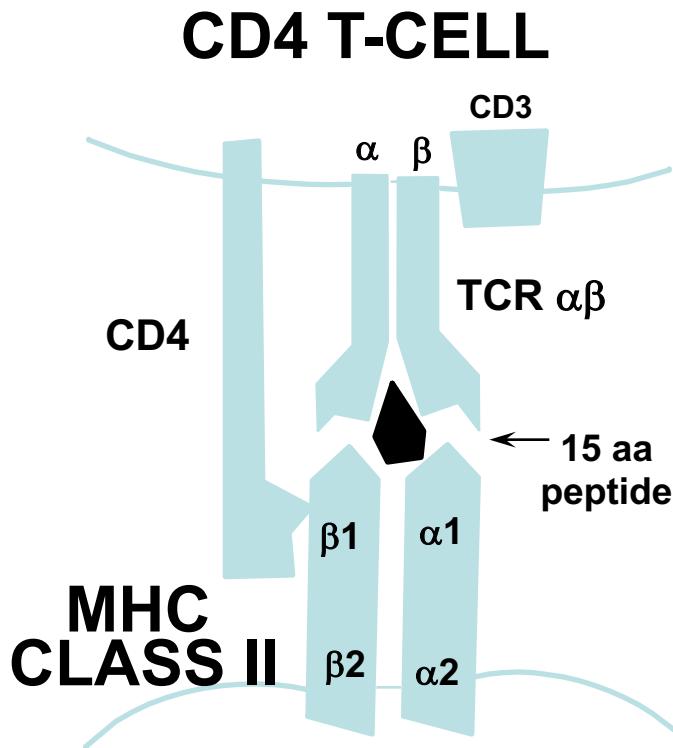
- present exogenous antigen which has been phagocytosed and processed.eg. Bacteria
- This is performed by professional antigen presenting cells eg macrophages

Le proteine MHC di classe I e II hanno strutture simili

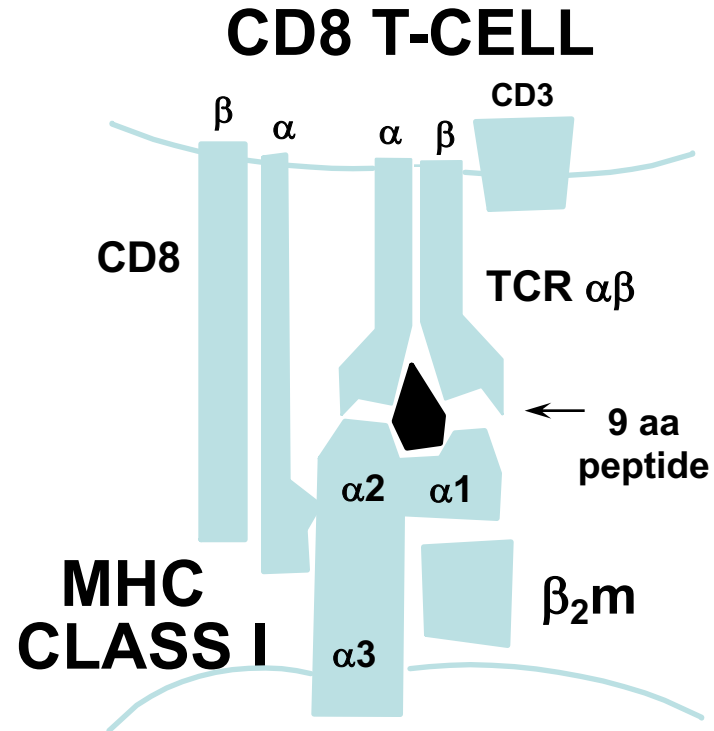


MOLECULES OF T LYMPHOCYTE RECOGNITION

- Major histocompatibility complex (MHC); human=Human Leukocyte Antigen (HLA); mouse=H-2
- Gorer and Snell identified a genetic basis for graft rejection and Snell named it histocompatibility 2 (H-2). Nobel prize awarded to Snell.
- Highly polymorphic genes organized in a complex on chromosome 6 (human) and 17 (mouse).
- Glycoproteins expressed on the surface of cells. MHC class I is composed of one polypeptide, non-covalently associated with β_2 microglobulin. MHC class II is composed of two polypeptides, referred to as α and β .



ANTIGEN PRESENTING CELL



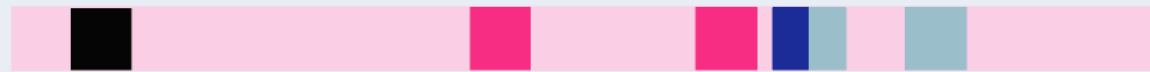
ANTIGEN PRESENTING CELL

Esoni dei geni MHC = domini proteici

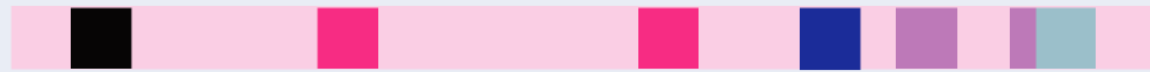
Classe I



Classe II α



Class II β



β -microglobulina



Esoni

Leader



Transmembrana



Non
tradotto



Extracellulare

Citoplasmatico

MHC Class I and Class II Proteins

- **Class I**

- Alpha Chain

- 3 External domains
- 1 Transmembrane
- 1 Cytoplasmic tail
- Encoded in MHC

- Beta-2 Microglobulin

- 1 External domain
- No transmembrane
- No Cytoplasmic tail
- Not encoded in MHC

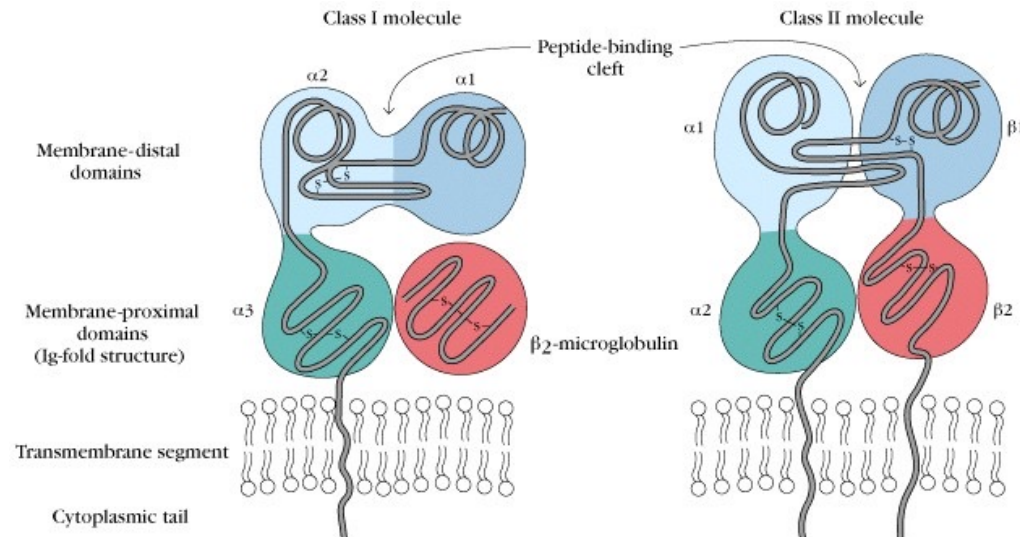
- **Class II**

- Alpha Chain

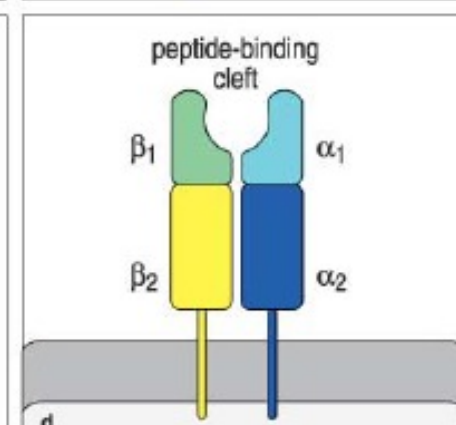
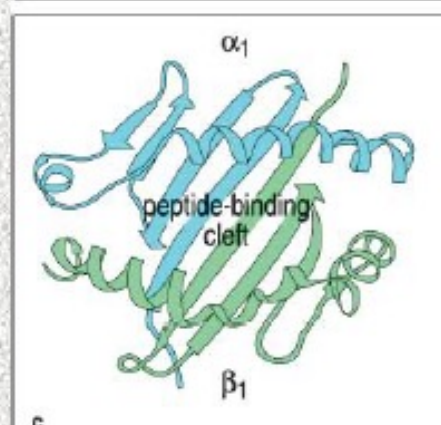
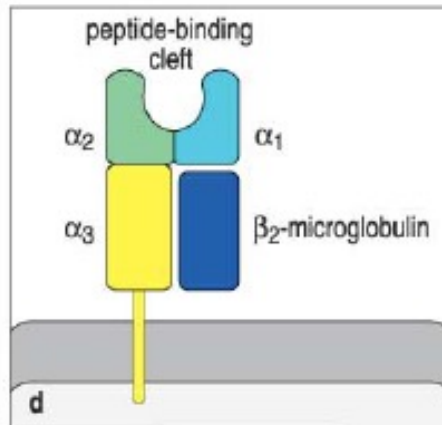
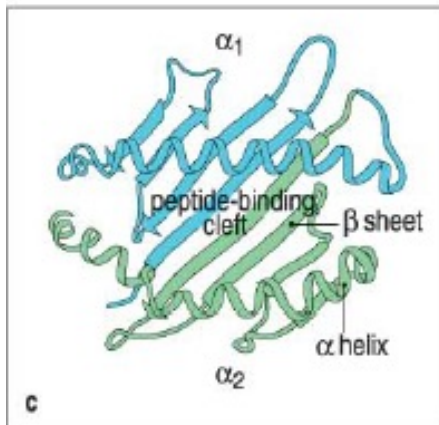
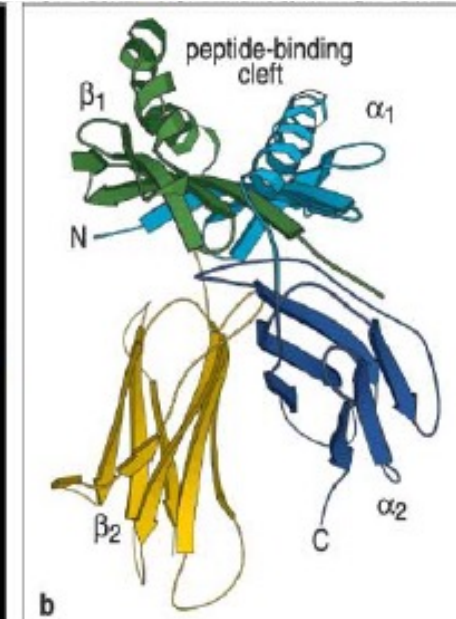
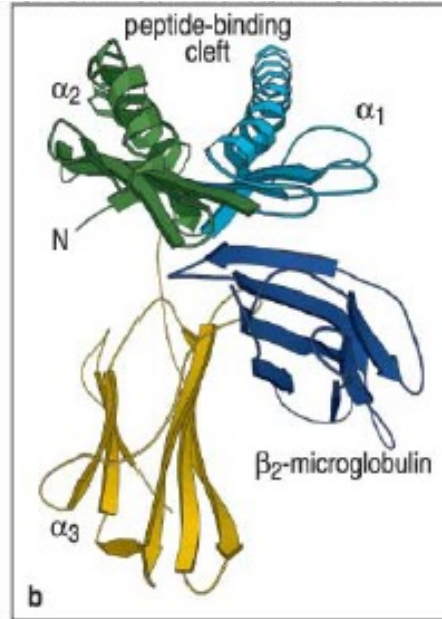
- 2 External domains
- 1 Transmembrane
- 1 Cytoplasmic Tail
- Encoded in MHC

- Beta Chain

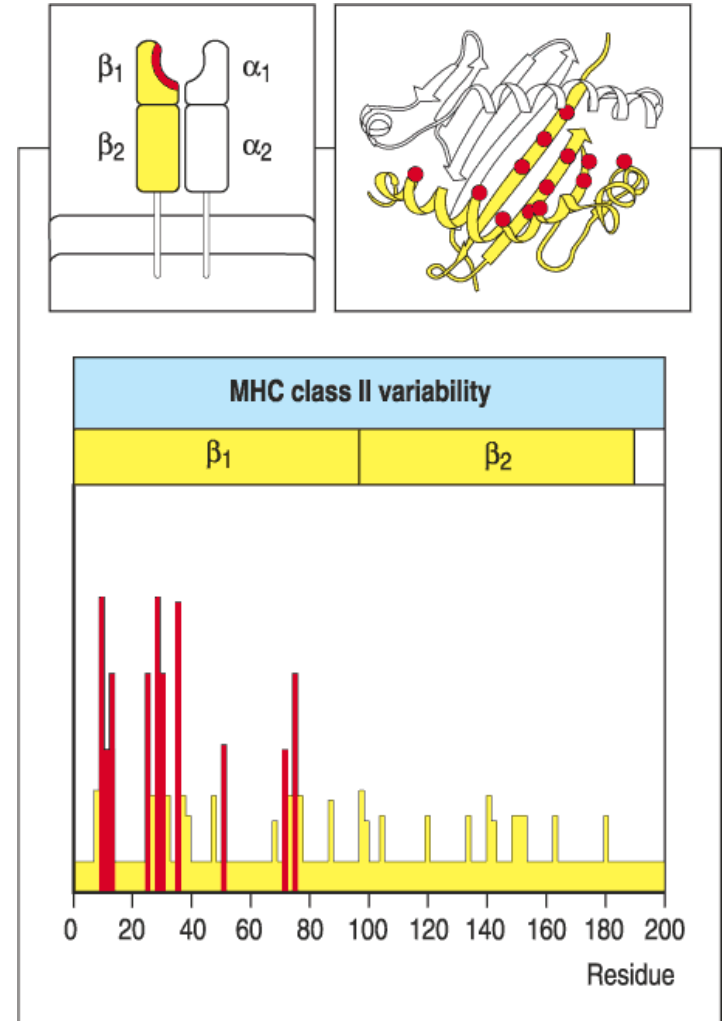
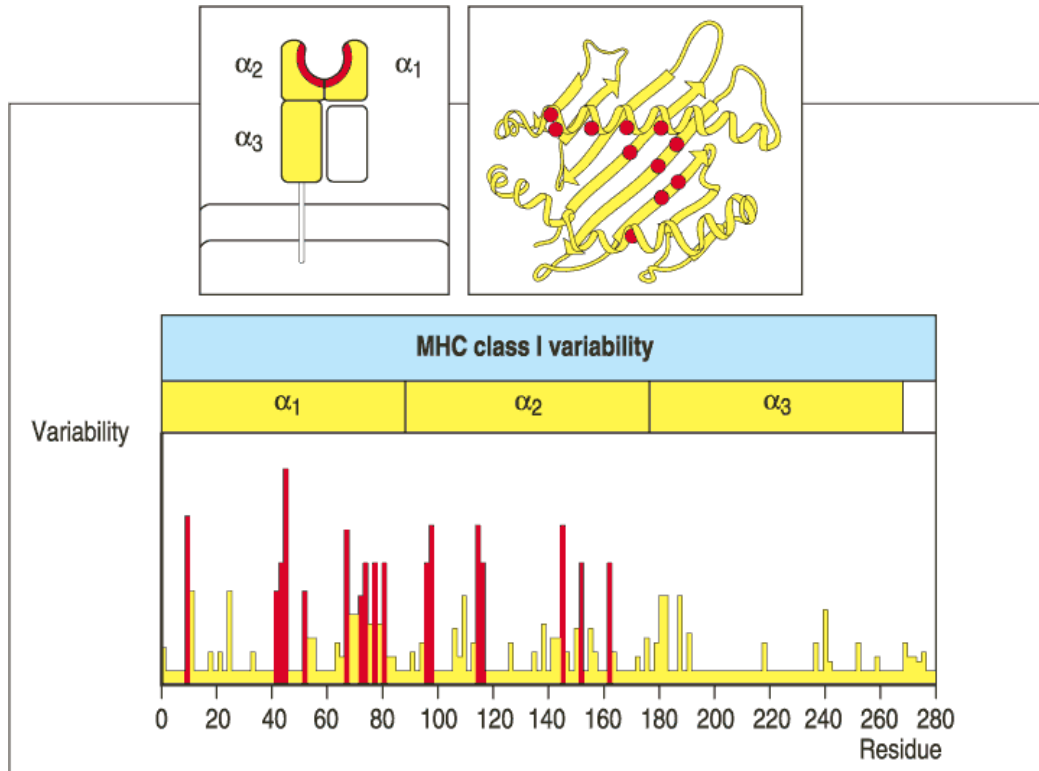
- 2 External domains
- 1 Transmembrane
- 1 Cytoplasmic Tail
- Encoded in MHC



MHC Class I and Class II Proteins



Allelic variation in MHC occurs at the peptide binding site and on the top/sides of the binding cleft



MHC polymorphism is a compromise

- More forms of MHC (either I or II) increases the number of different abnormal or foreign components (mostly proteins) that can be presented to T lymphocytes, so more MHC polymorphism is good.
- More forms of MHC (either I or II) increases the number of developing T lymphocytes that are deleted during development because of excessive reaction to self antigens, so too much polymorphism is bad.
- About 3 loci appears to be an effective compromise.