

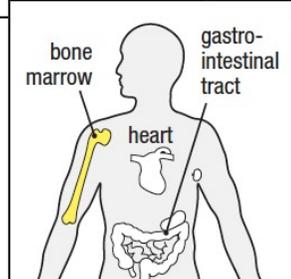
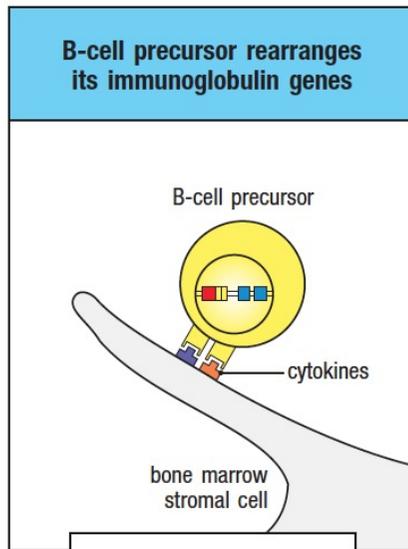
Corso di Immunologia - III anno
Prof. Paolini

Lezione 15/11/2024

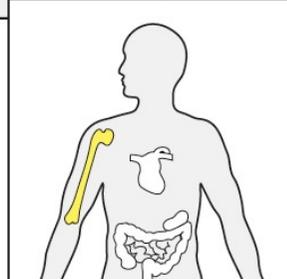
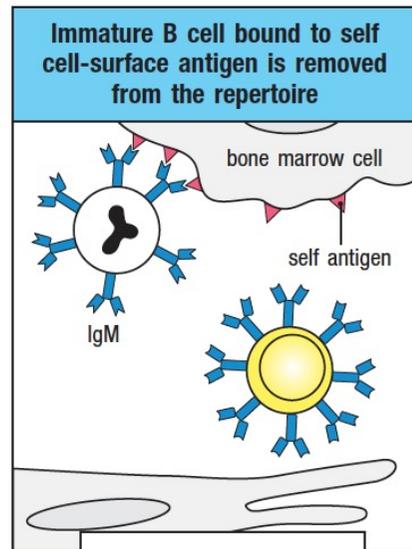
"La maturazione dei linfociti B"

Il materiale presente in questo documento viene distribuito esclusivamente ad uso interno e per scopi didattici.

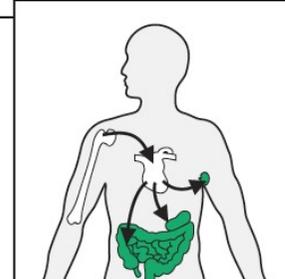
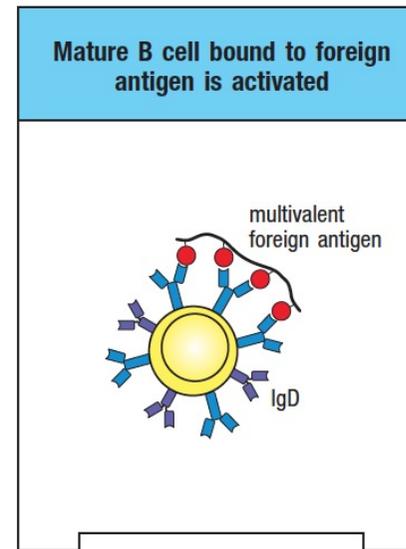
Lo sviluppo dei linfociti B è diviso in diverse fasi



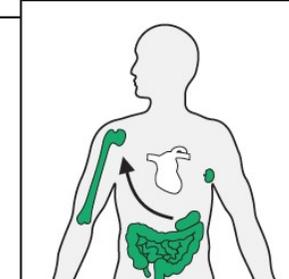
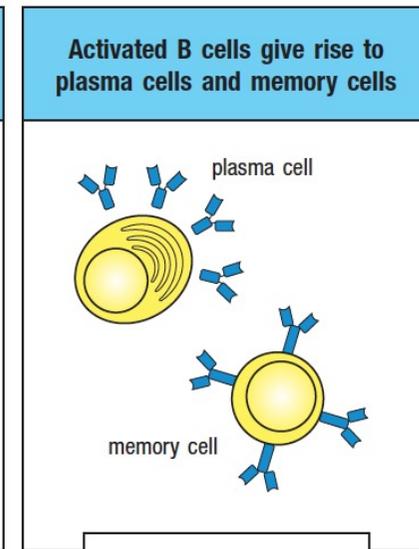
Generation of B-cell receptors in the bone marrow



Negative selection in the bone marrow

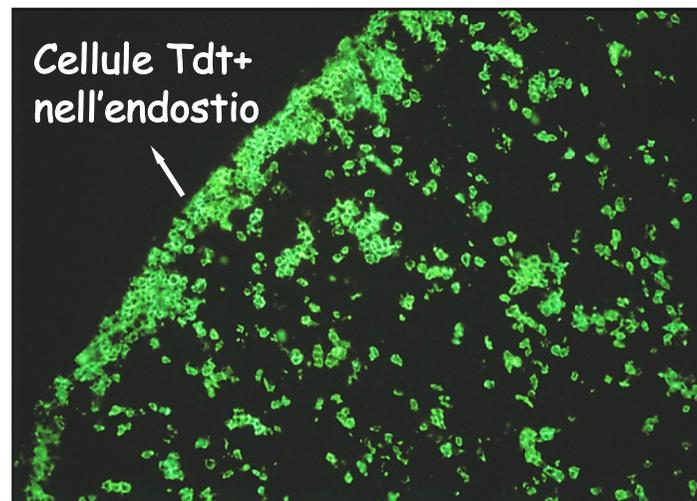
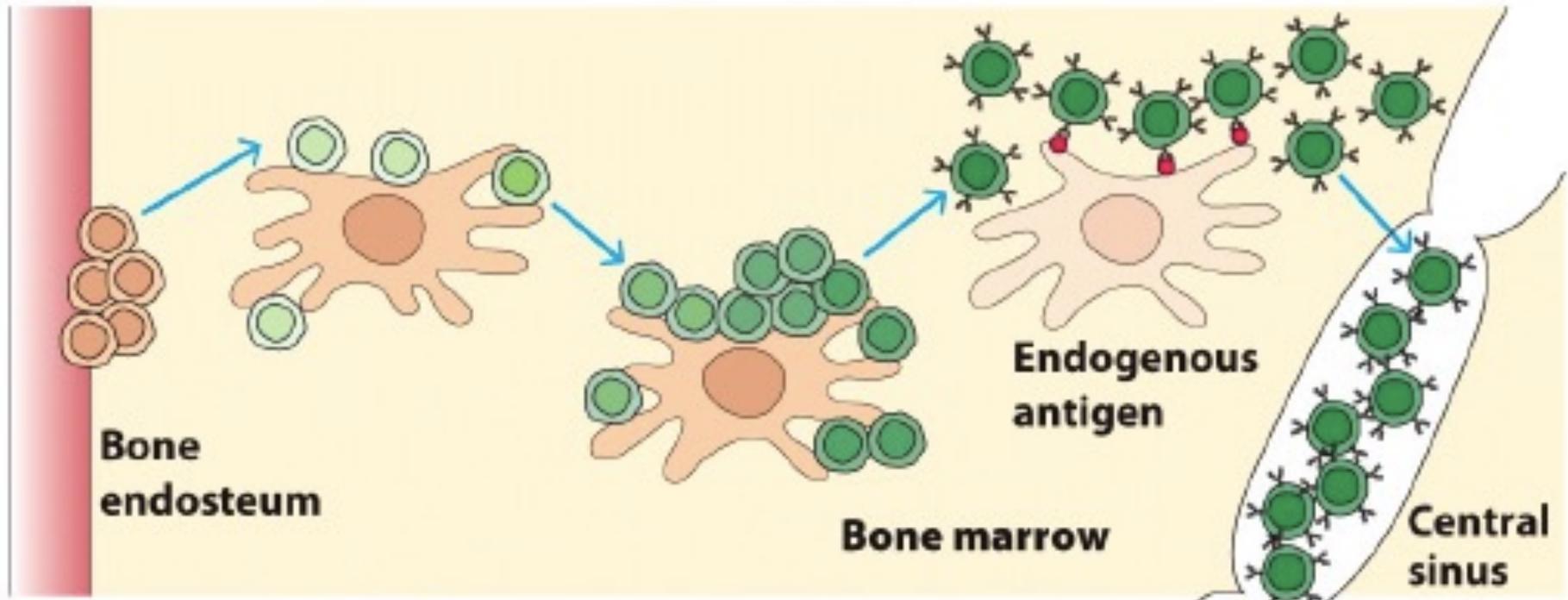


Migration of B cells through the circulatory system to lymphoid organs and B-cell activation

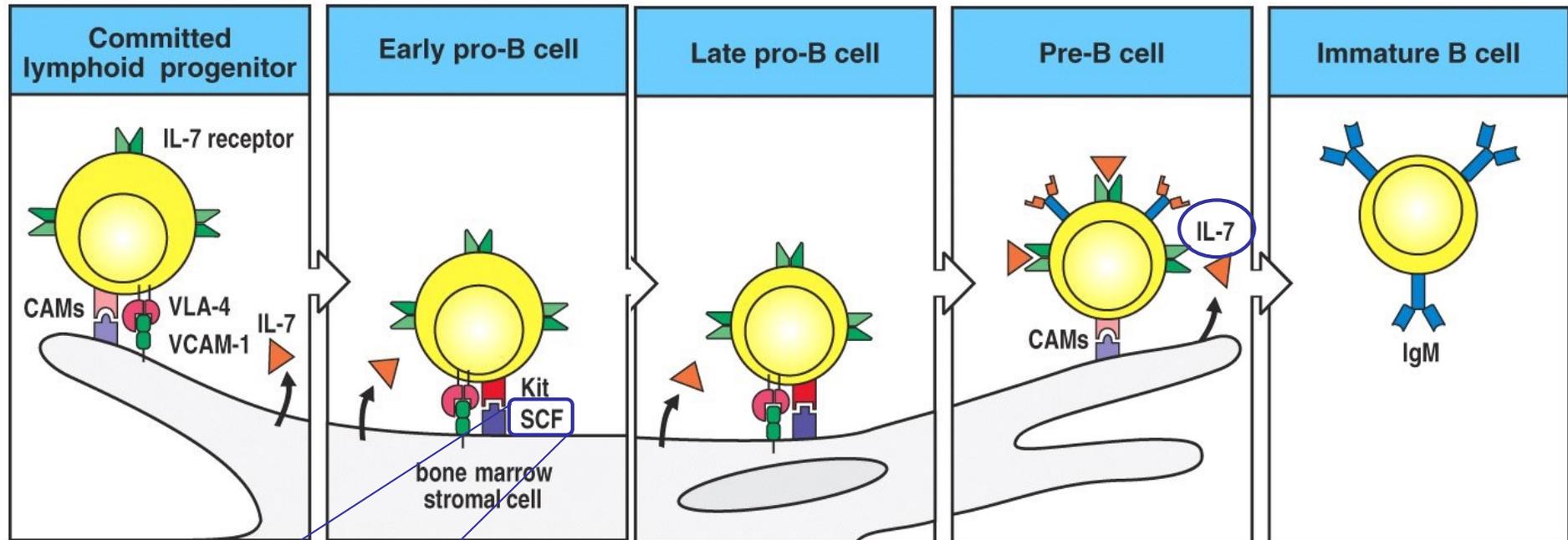


Antibody secretion and memory cells in bone marrow and lymphoid tissue

Durante la maturazione le cellule B migrano verso il seno centrale della cavità midollare



BONE MARROW STROMAL CELLS AFFECT THE EARLY STAGES OF B CELL DEVELOPMENT



SCF (Stem Cell Factor) o ligando di Kit

- Può essere rilasciato anche in forma solubile.
- Agisce su cellule staminali emopoietiche che esprimono il recettore Kit (CD117)
- Il recettore ingaggiato stimola la sopravvivenza cellulare e promuove la proliferazione dei progenitori dei linfociti B.

INTERLEUCHINA 7

Fonte: cellule stromali del midollo osseo e del timo

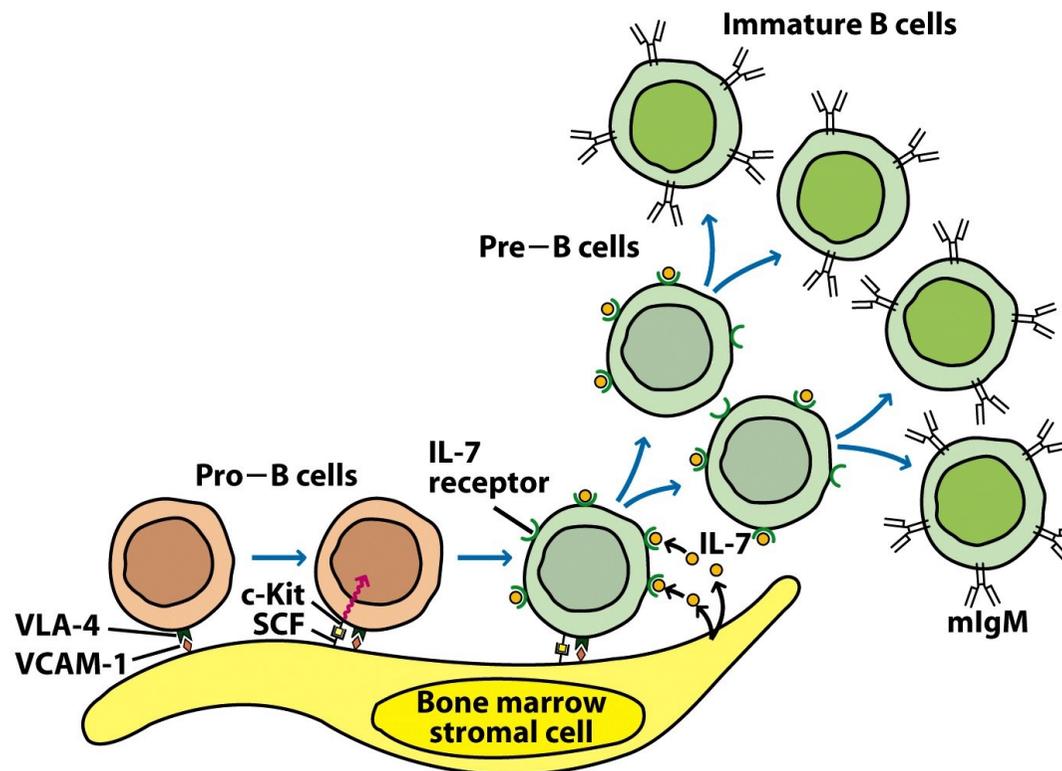
Azione principale: proliferazione dei precursori linfoidi

INTERLEUCHINA 7

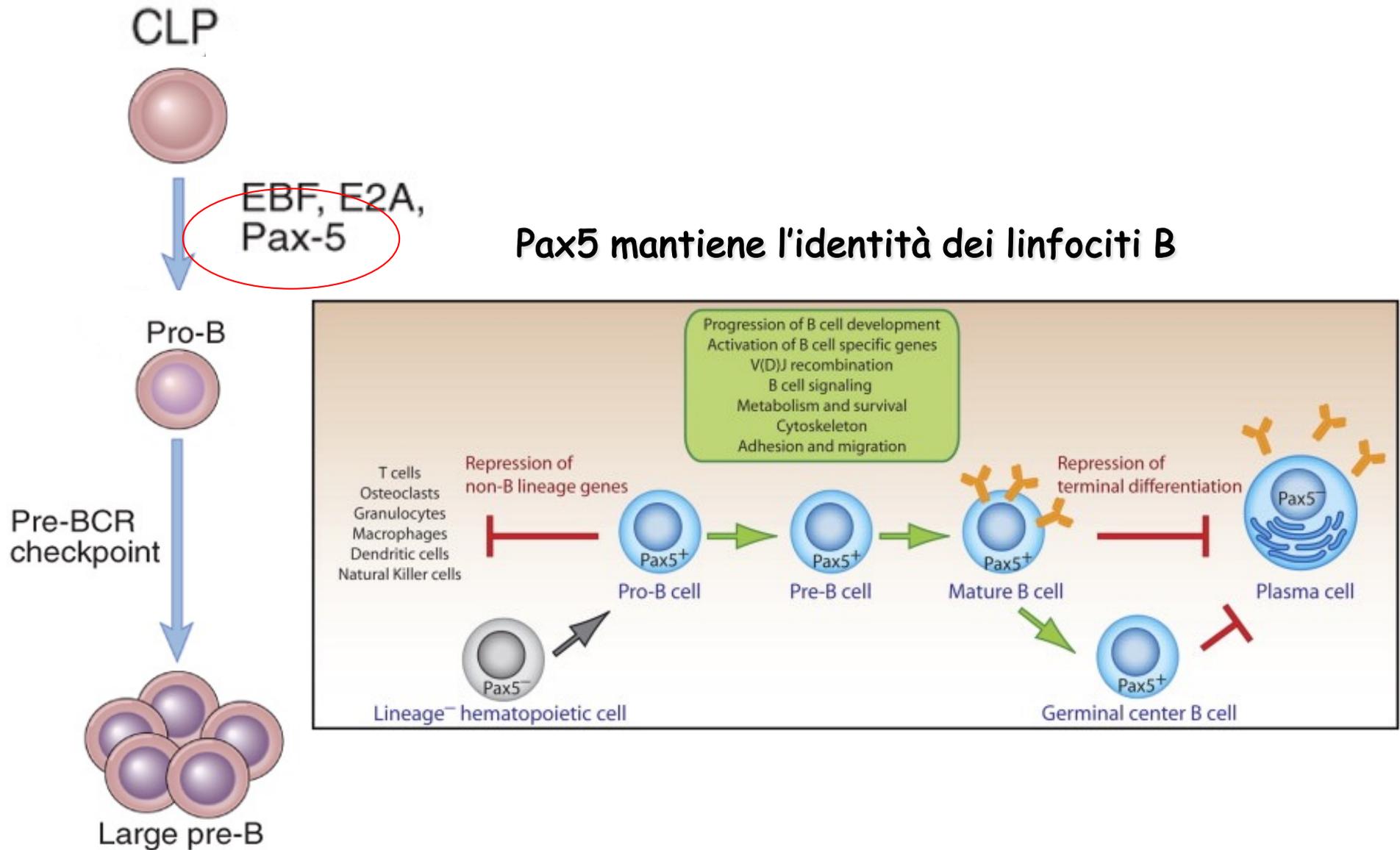
Fonte: cellule stromali del midollo osseo e del timo

Cellule bersaglio: timociti immaturi (CD4-CD8-)
precursori dei linfociti B

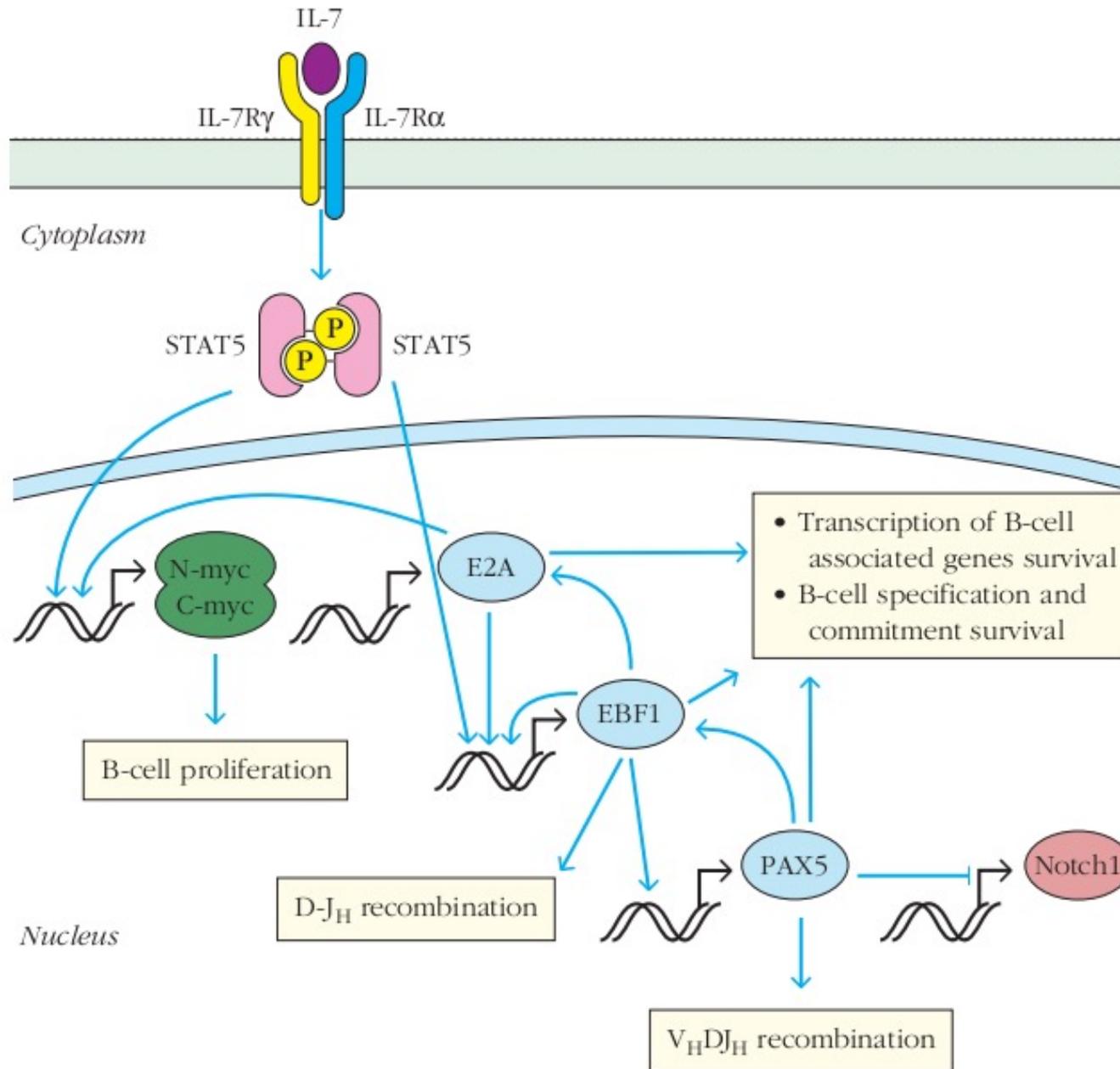
Azione principale: proliferazione dei precursori linfoidi



Control of B cell development by transcriptional factors

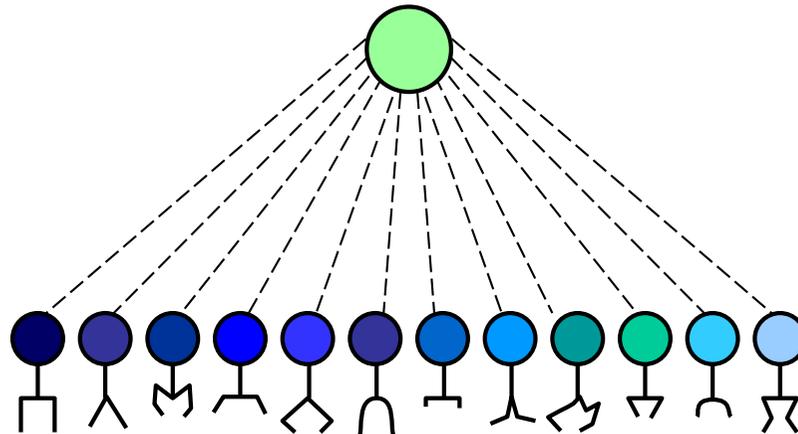


Transcription Factors in B Cell Development



Fase 1: LA GENERAZIONE DELLE DIVERSITA' DEGLI ANTICORPI

ORGANI LINFATICI
PRIMARI: GENERAZIONE
DELLE DIVERSITA'



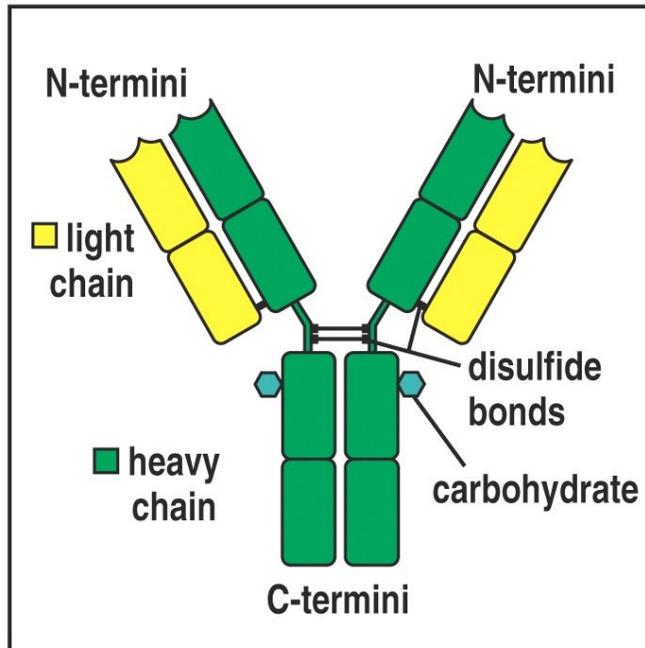
PRECURSORE STAMINALE

GENERAZIONE "CASUALE" DI UN
VASTO REPERTORIO DI RECETTORI
DI MEMBRANA TRA LORO DIVERSI

I meccanismi con cui si genera il repertorio degli anticorpi sono analoghi a quelli che generano il repertorio dei TCR.

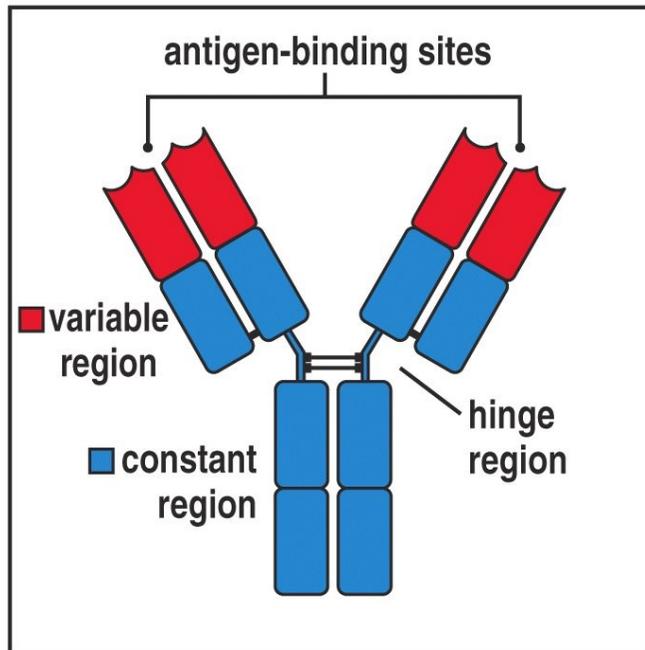
In entrambi i casi le catene polipeptidiche sono codificate da più segmenti genici situati sullo stesso cromosoma, che per divenire geni funzionali devono subire eventi di ricombinazione.

La struttura delle immunoglobuline



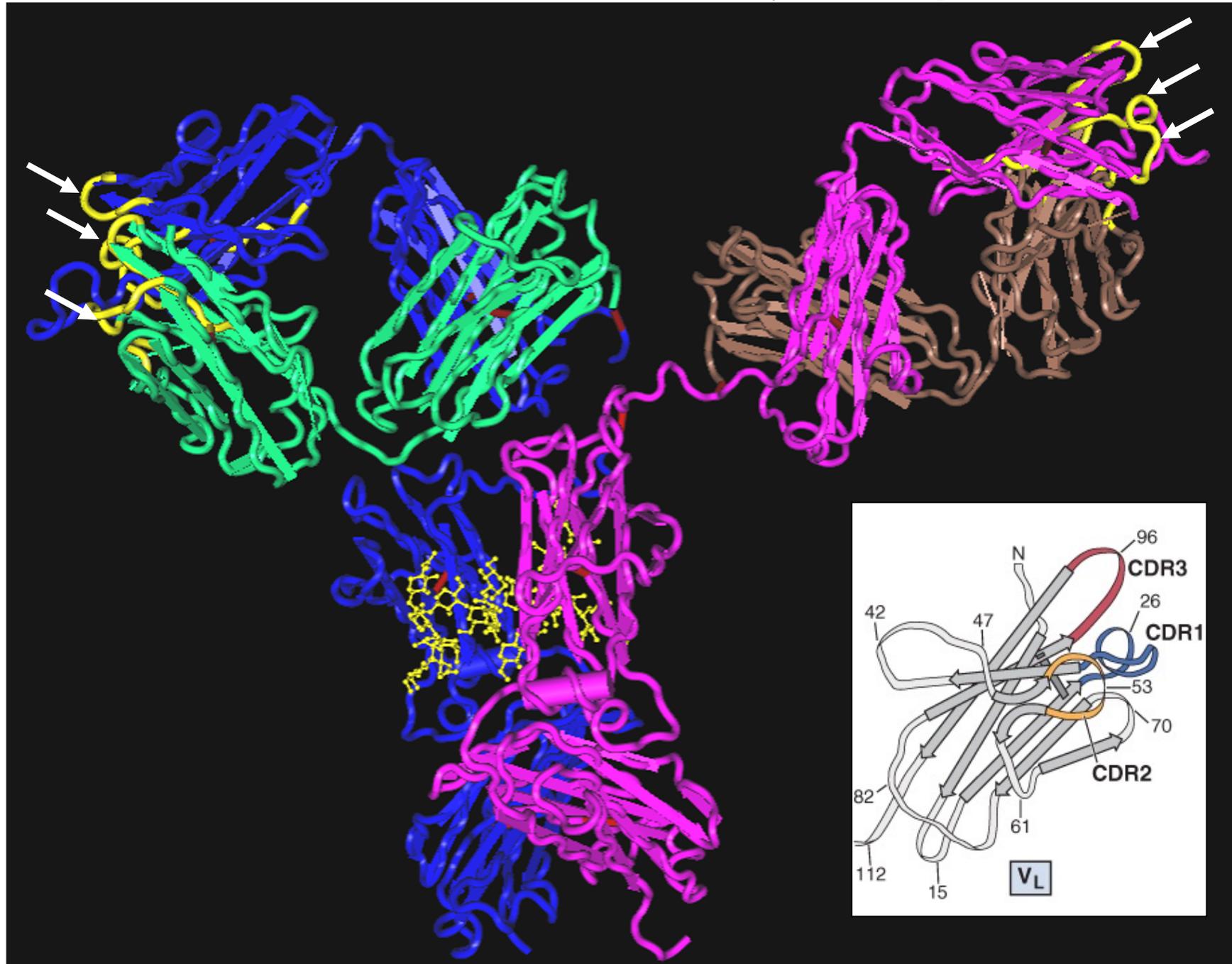
Gli anticorpi sono costituiti da due tipi di catene polipeptidiche: leggere (gialle) e pesanti (verdi)

MW: 150 KD, L: ~25 KD, H: ~50 KD

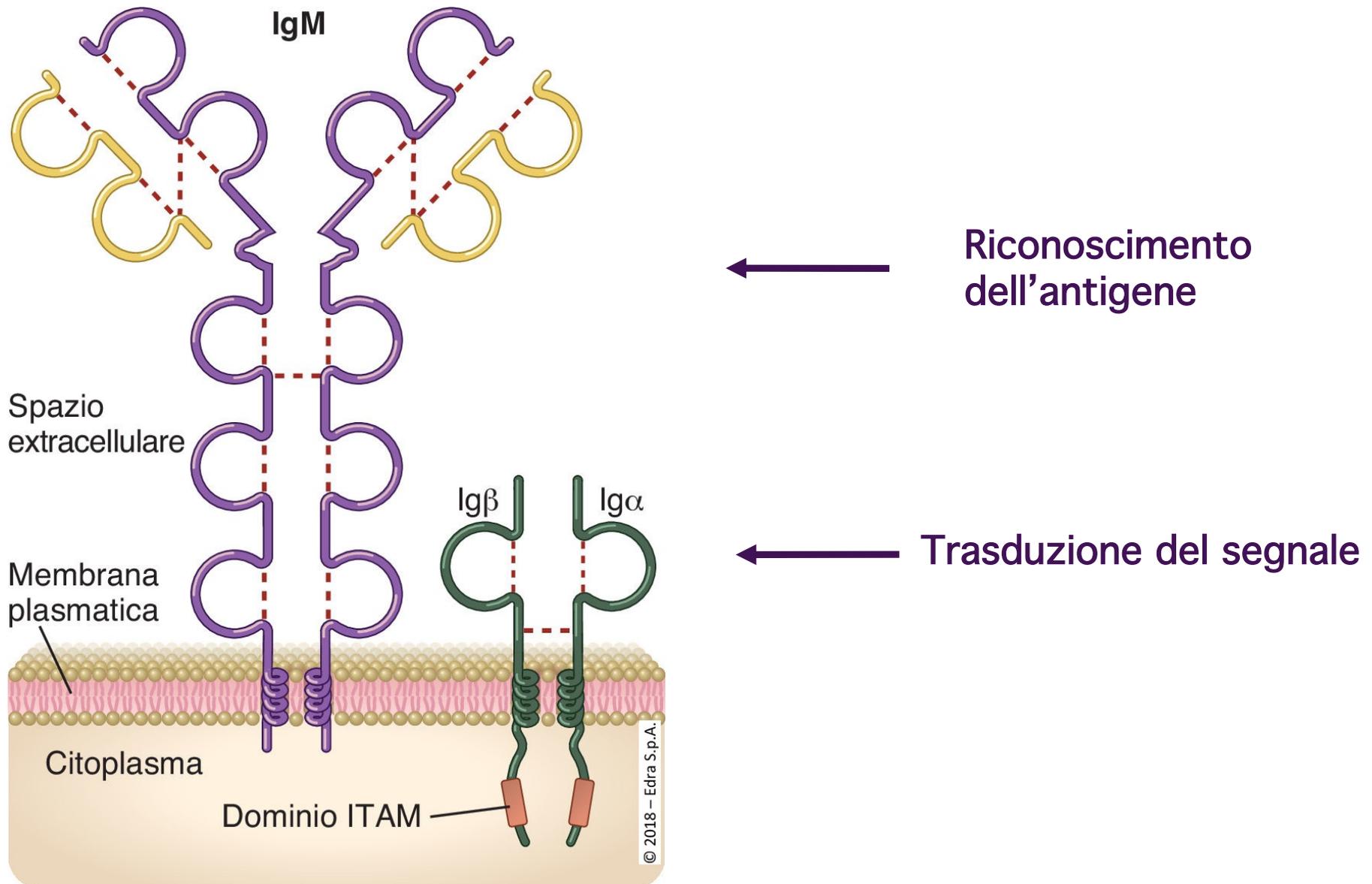


Ogni catena è formata da una regione variabile (rossa) e una regione costante (blu)

Le regioni ipervariabili (CDR) dei domini V_H e V_L si dispongono in modo da formare il sito combinatorio per l'antigene

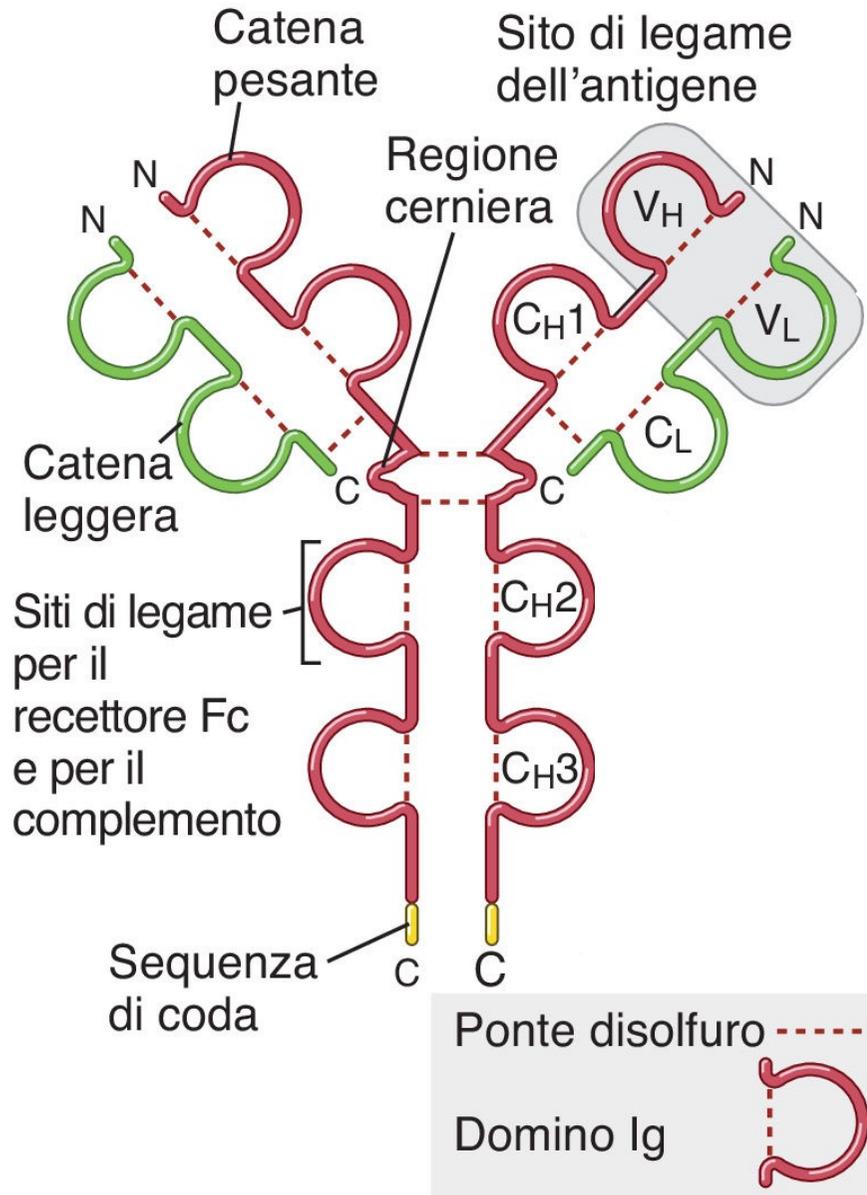


Il complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B → BCR



La struttura delle immunoglobuline

A IgG secreta



2 tipi di catene leggere
 $\kappa-\lambda$

5 tipi di catene pesanti
 $\mu-\gamma-\alpha-\delta-\epsilon$



5 classi di Ig
IgM-IgG-IgA-IgD-IgE

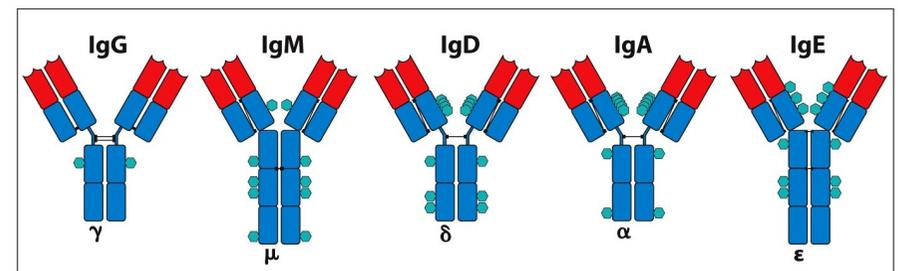
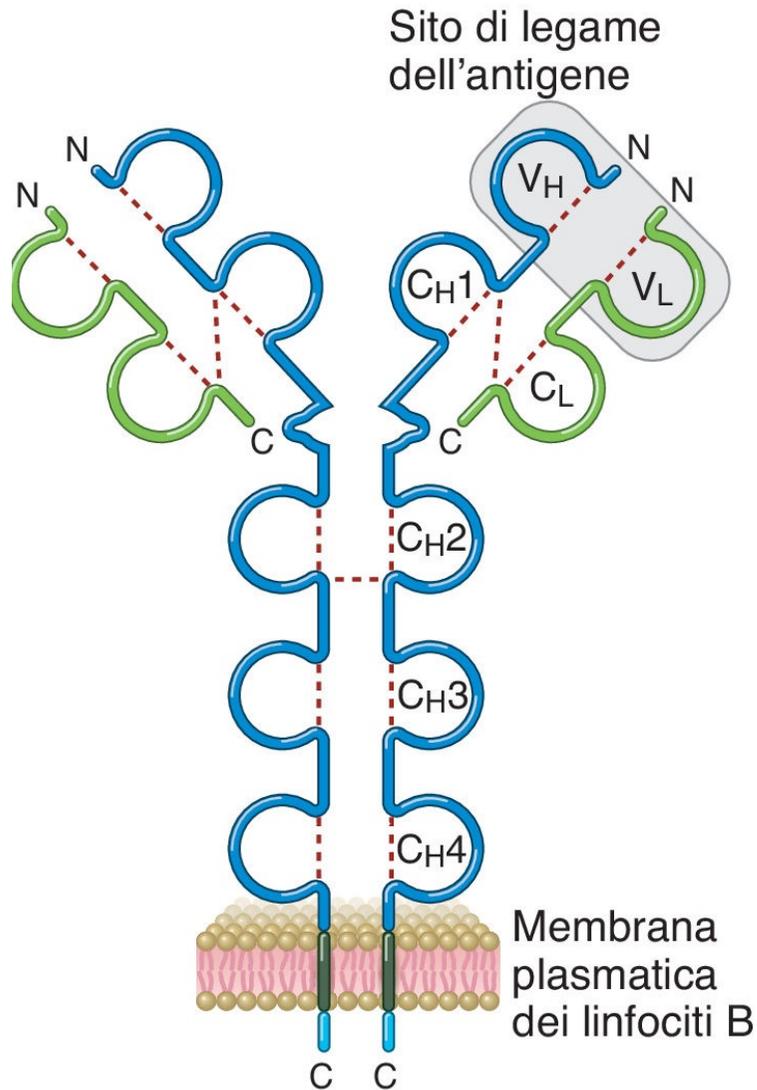


Figure 4.5 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

OGNI CATENA POLIPEPTIDICA DEL BCR E' CODIFICATA DA PIU' SEGMENTI GENICI !

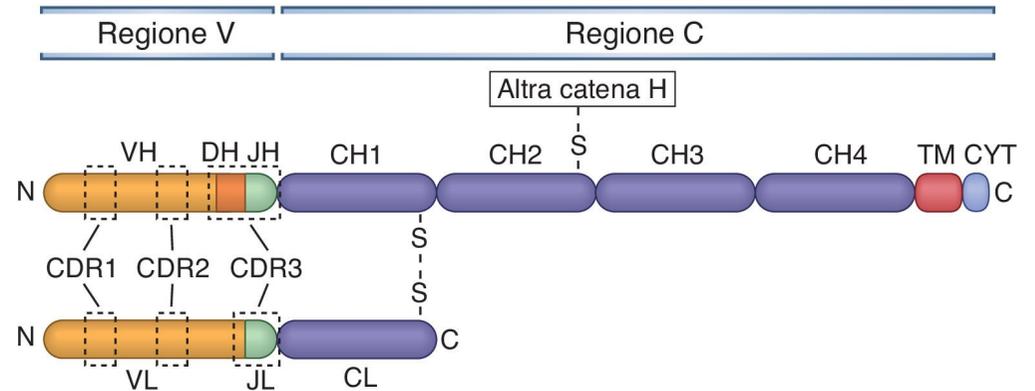
IgM di membrana



Ig

Catena pesante delle Ig (μ) (forma di membrana)

Catena leggera delle Ig



La **regione V** è codificata da tre diversi segmenti genici:

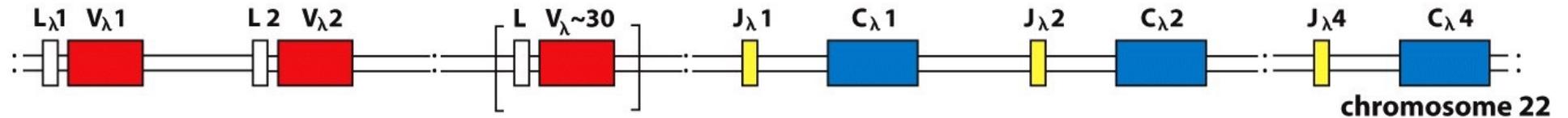
V = Variabilità
D = Diversità
J = Giunzione

Segmenti genici non omologhi spazialmente separati vengono riavvicinati mediante rottura del DNA e nuova ricucitura.

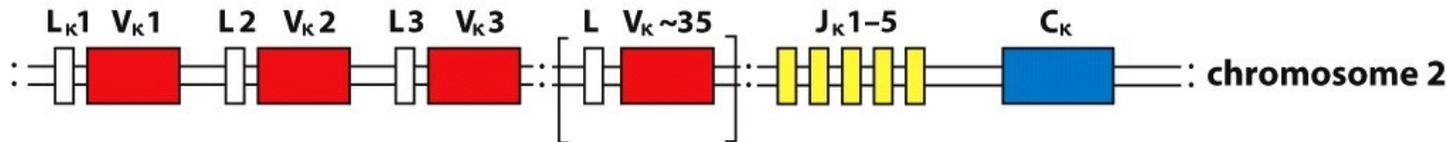
L'organizzazione dei loci delle catene del BCR (catene pesanti e leggere)

Immunoglobulin heavy- and light-chain loci

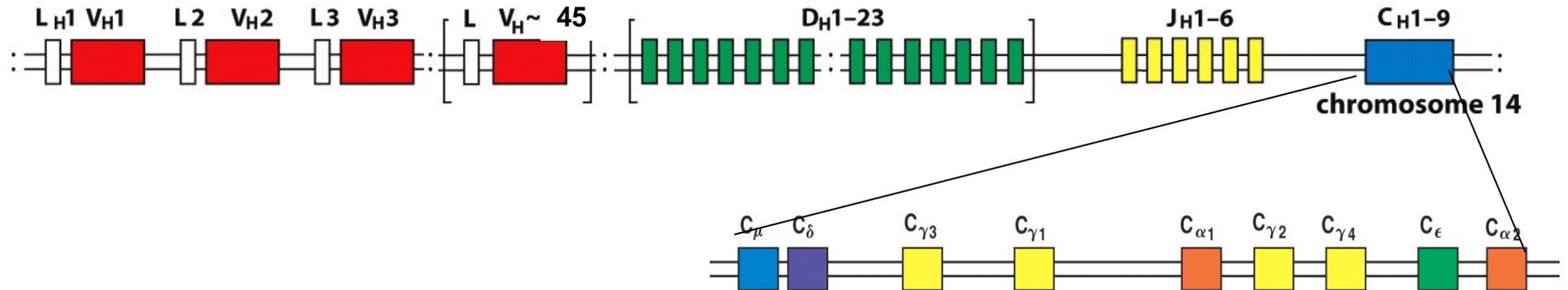
λ light-chain locus



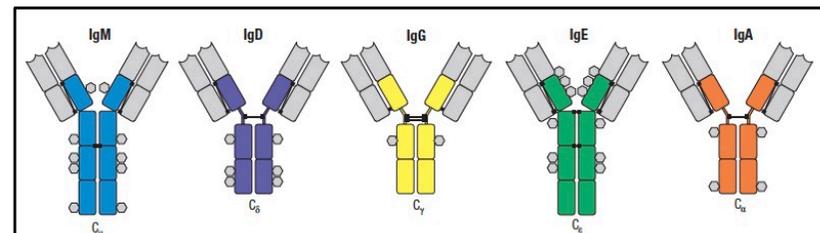
K light-chain locus



heavy-chain locus



5 tipi di catene pesanti
in base al gene C:
 μ - γ - α - δ - ϵ



DNA Rearrangement Removes Sequences Between V, D and J Segments

RNA Splicing Removes Sequences Between J and C Segments

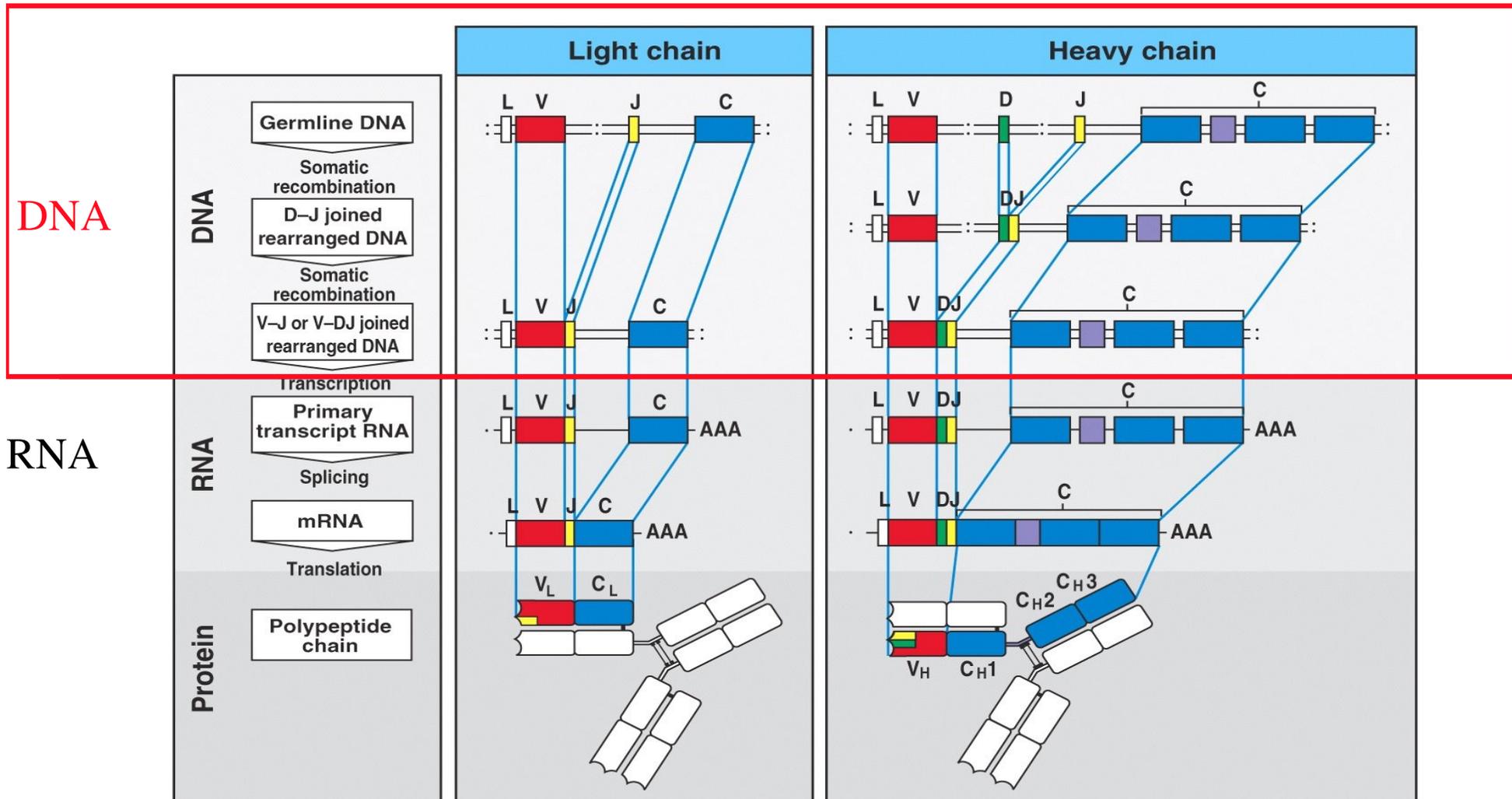
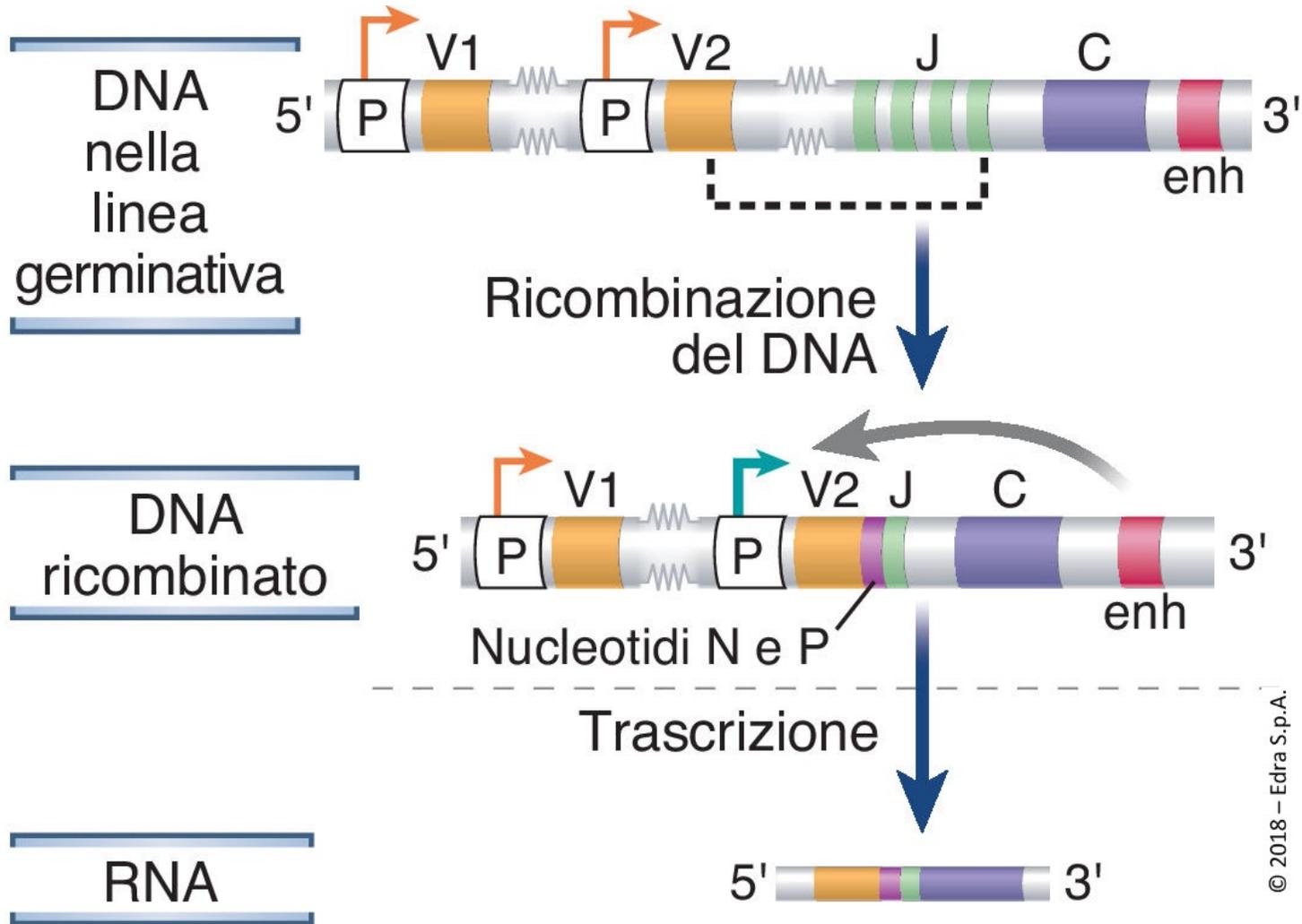
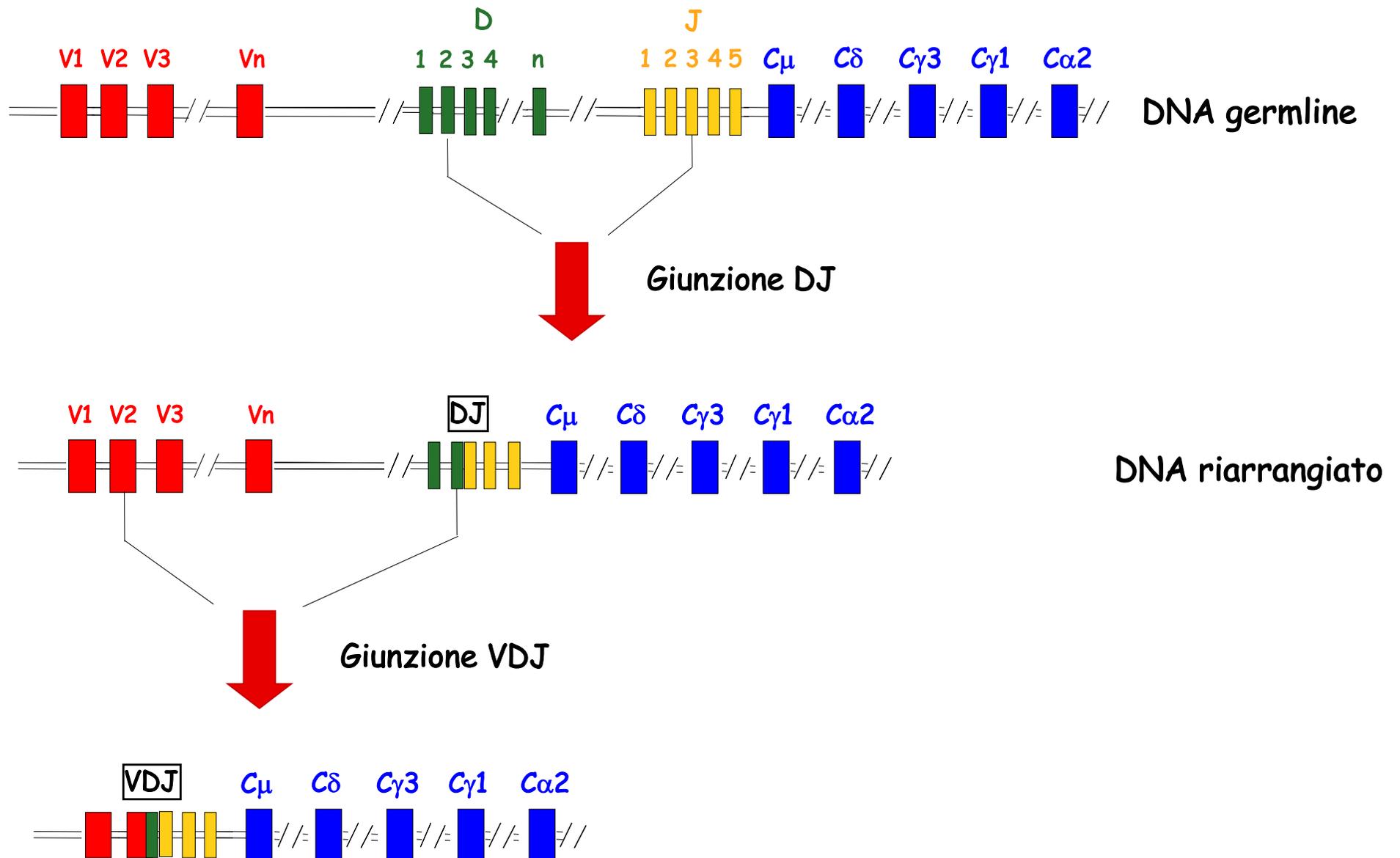


Figure 4-2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

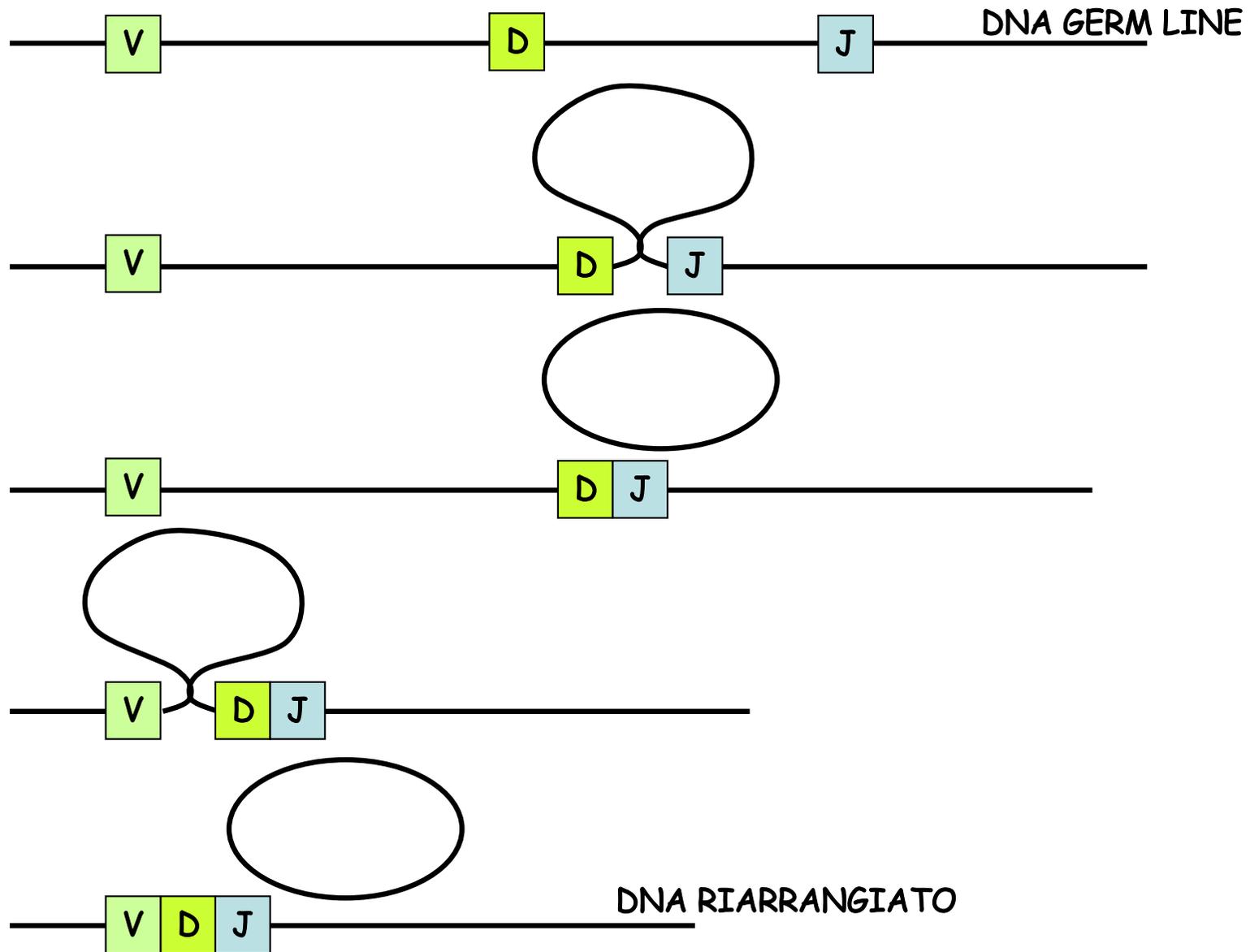
Regolazione trascrizionale dei geni per le Ig



I primi eventi di riarrangiamento iniziano nel locus genico della catena pesante



I primi eventi di ricombinazione iniziano nel locus della catena pesante
a livello dei segmenti genici D-J



La ricombinazione è promossa dagli enzimi **RAG**
(Geni Attivanti la Ricombinazione) o ricombinasi VDJ

Il riarrangiamento è promosso da SEQUENZE SEGNALI DI RICOMBINAZIONE (RSS) che fiancheggiano i singoli segmenti genici

RSS= heptamer, spacer and nonamer

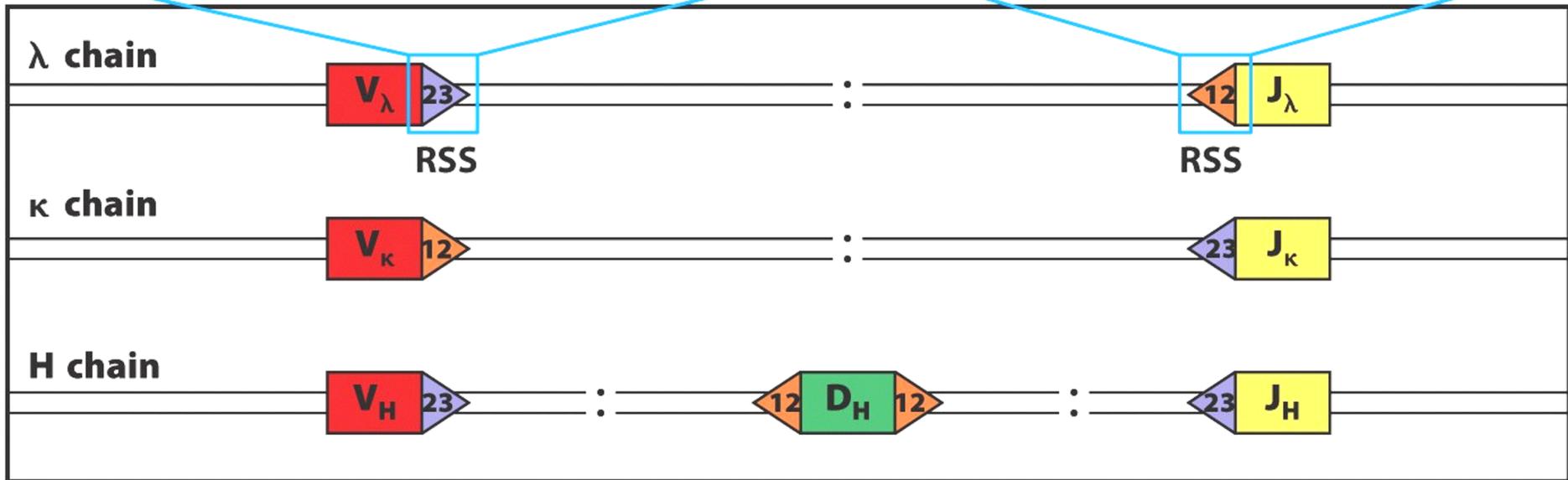


Figure 4-5 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

La regola di giunzione 12/23 assicura che il riarrangiamento V-D-J avvenga nell'ordine corretto

Le sequenze segnali RSS guidano la ricombinazione

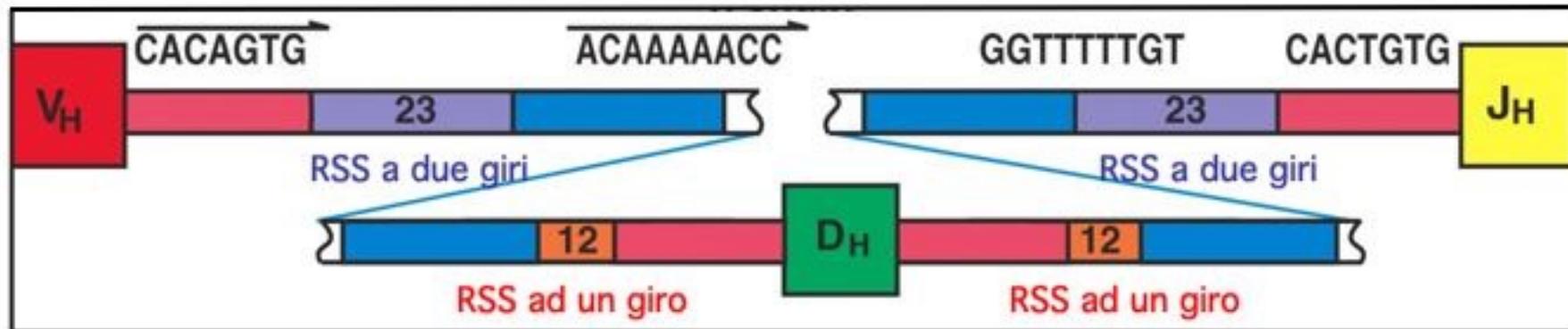
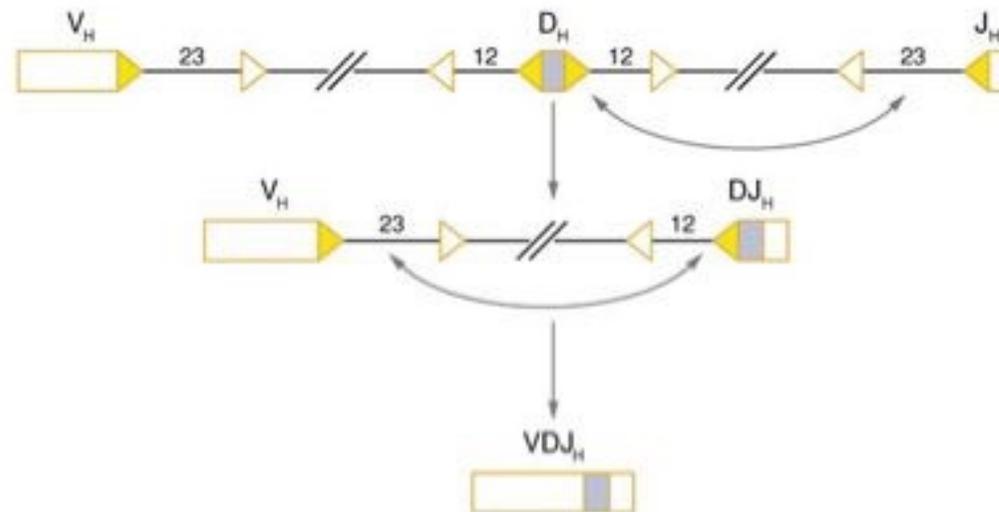
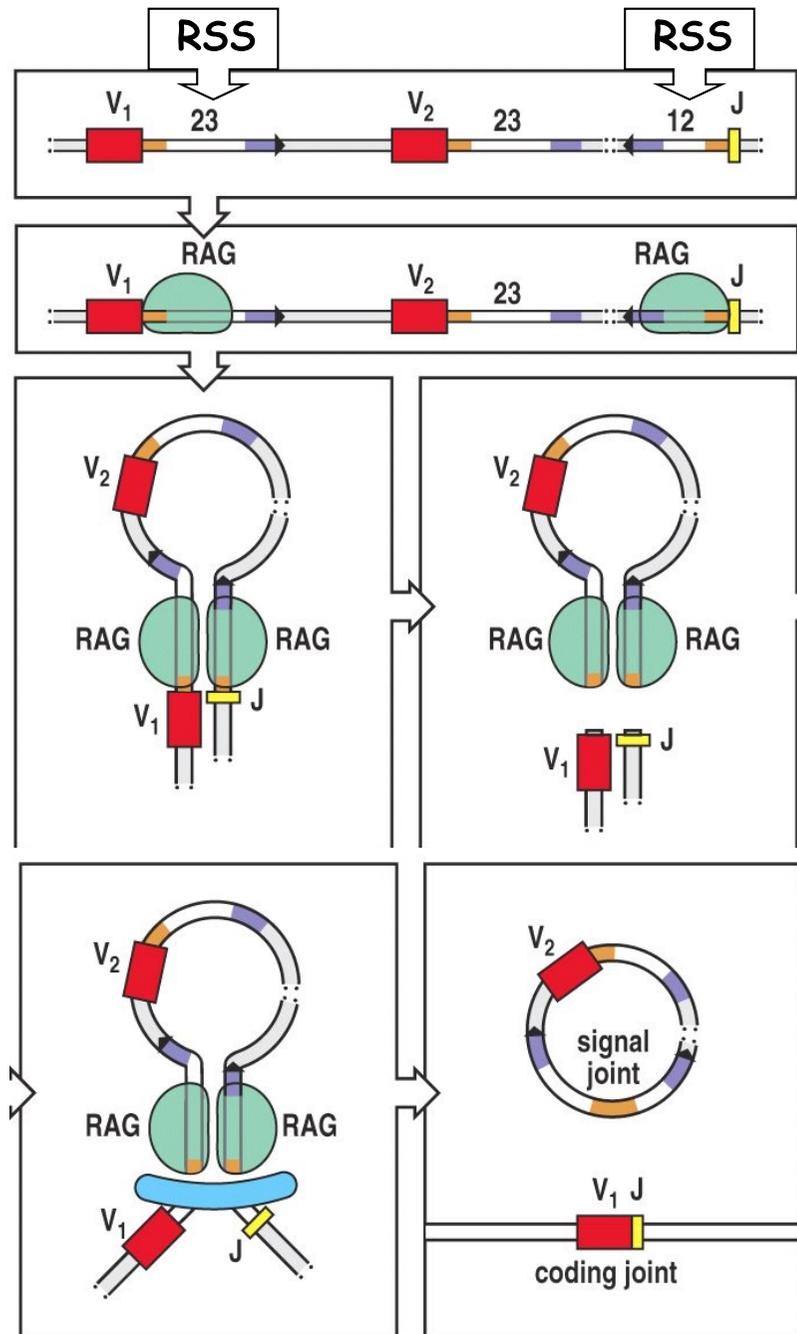


Figure 4-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

La regola del 12/23 promuove la ricombinazione tra segmenti genici diversi



Le ricombinasi **RAG1/RAG2** riconoscono le sequenze RSS e guidano il riarrangiamento genico

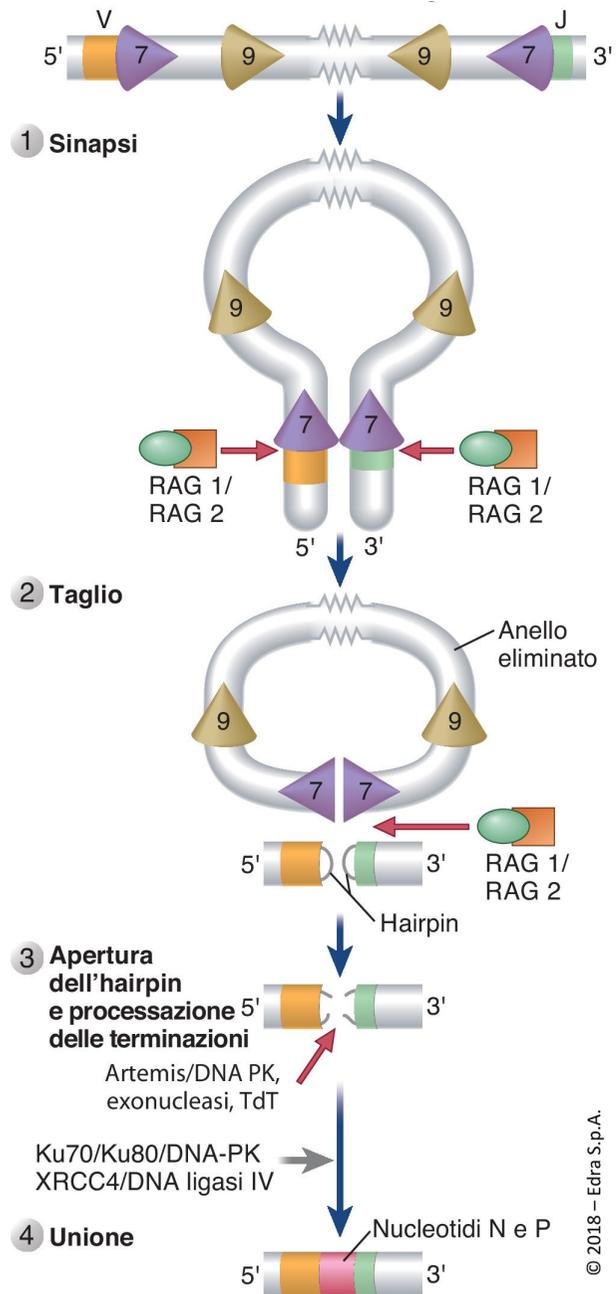


Le ricombinasi **RAG1/RAG2** promuovono l'avvicinamento dei geni scelti mediante appaiamento delle regioni omologhe delle RSS formando un'ansa di DNA intercalata tra esse

quest'ansa viene poi recisa per azione degli enzimi RAG dotati di attività endonucleasica.....

...e le estremità dei geni VJ vengono saldate ad opera di ligasi

La ricombinazione coinvolge enzimi linfocitari specifici ed enzimi ubiquitari che modificano il DNA



#1: Lymphocyte-Specific

Initiation of V(D)J rearrangement:
RAG-dependent cleavage

RAG1/RAG2 tagliano la doppia elica del DNA tra l'eptamero e il segmento genico scelto.

Le estremità codificanti si richiudono creando una struttura a forcina.

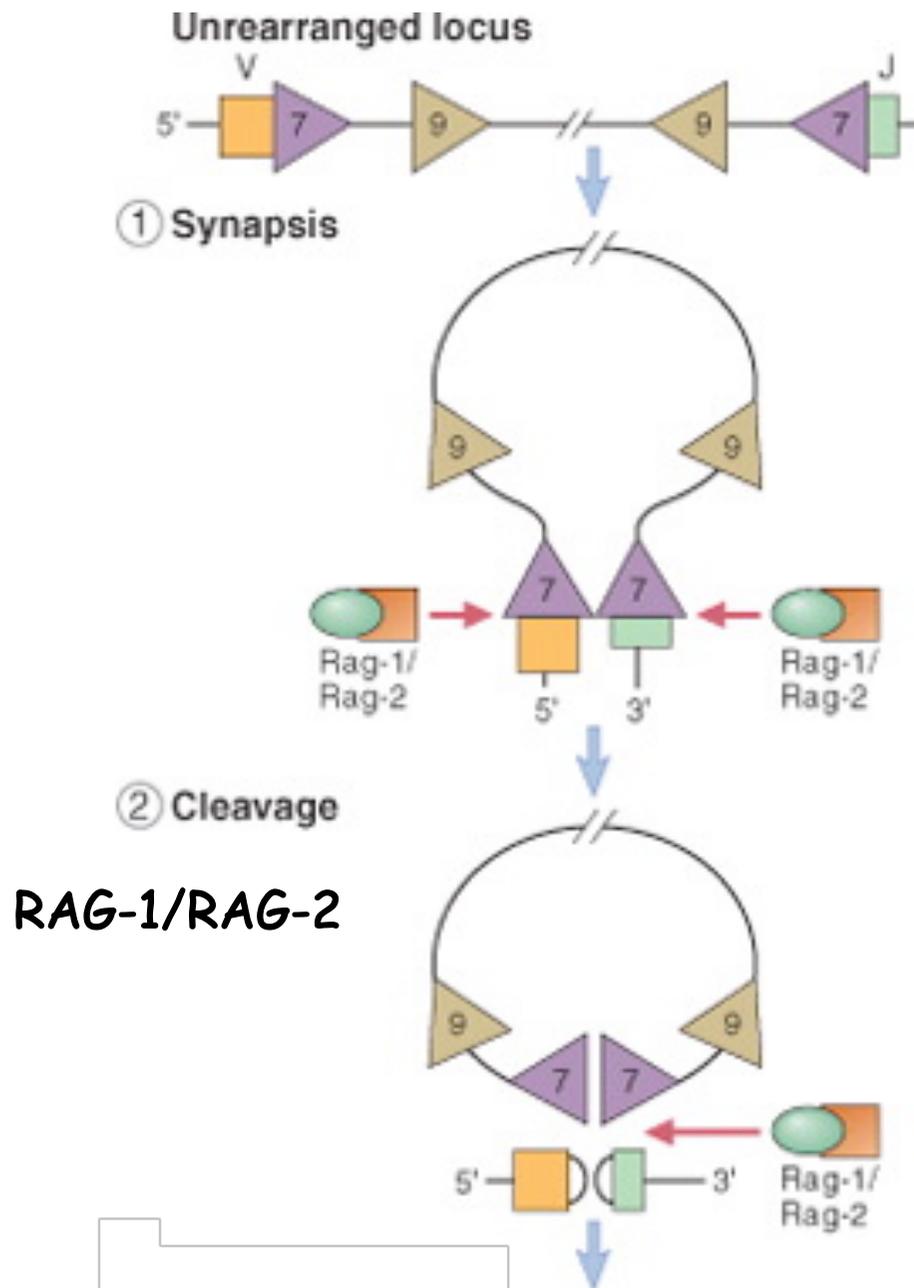
Le forcine vengono linearizzate da **Artemis** e modificate dall'aggiunta di nucleotidi P e N (TdT aggiunge nucleotidi N)

Le estremità vengono saldate ad opera di **DNA ligasi** complessate ad enzimi di riparo.

#2: Constitutive

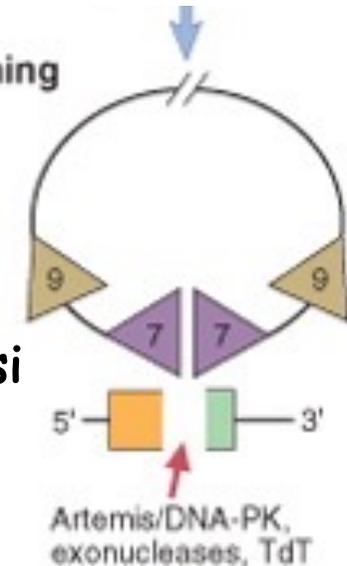
DNA non-homologous end-joining machinery

GLI ENZIMI COINVOLTI NEL RIARRANGIAMENTO DEI GENI Ig e TCR



③ **Hairpin opening and end-processing**

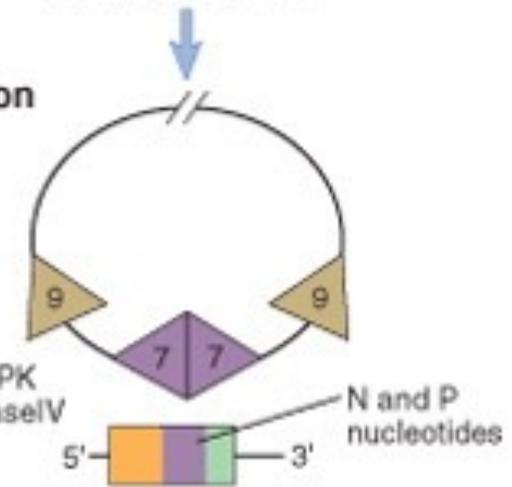
**Artemis,
DNA-PK
Esonucleasi
TdT**



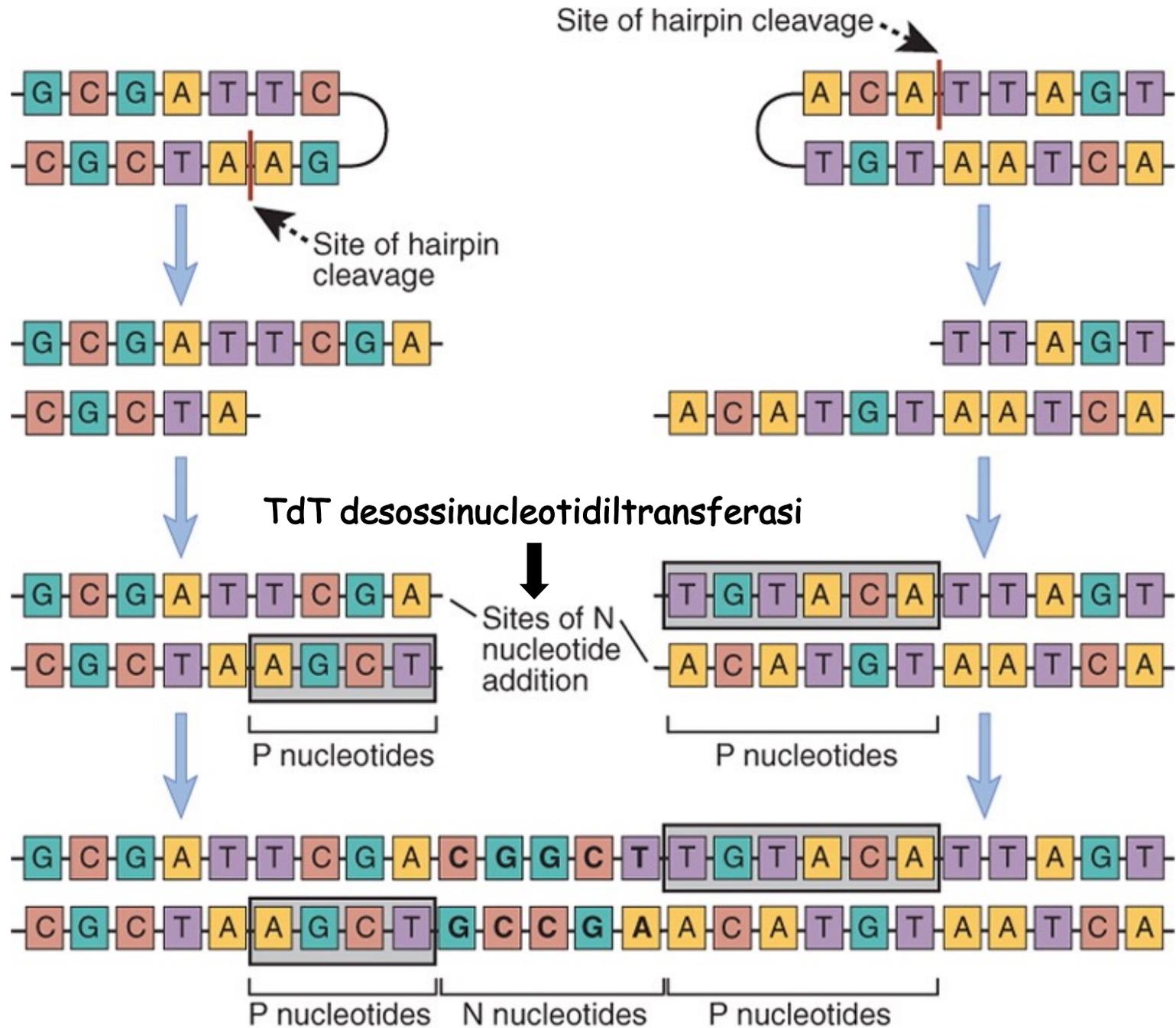
④ **Repair/ligation**

Ligasi

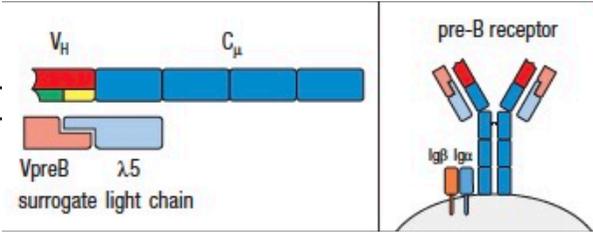
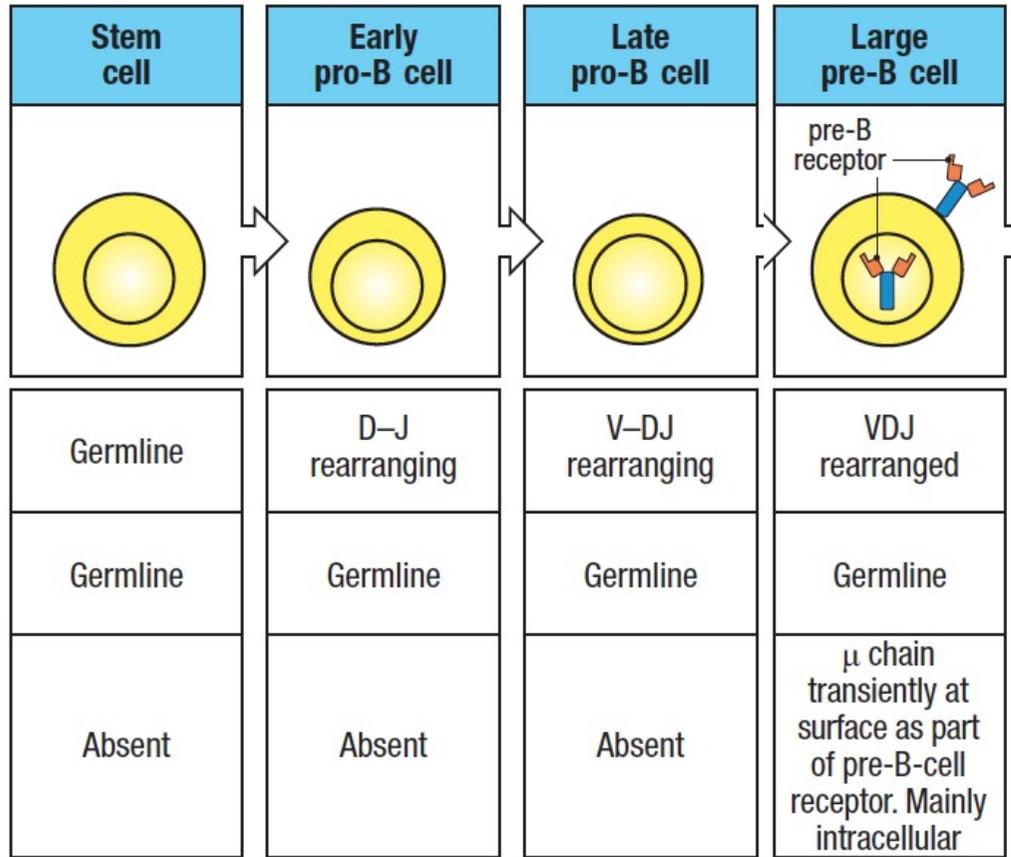
**Ku70/Ku80/DNA-PK
XRCC4/DNA LigaseIV**



LA DIVERSIFICAZIONE GIUNZIONALE: ruolo di TdT

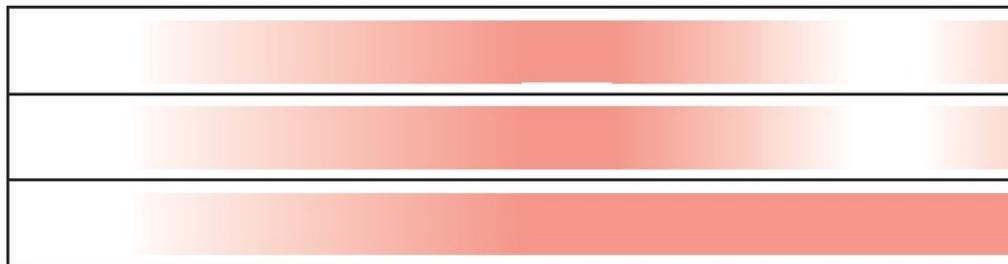


La maturazione dei linfociti B procede attraverso stadi definiti da eventi di riarrangiamento dei geni delle Ig

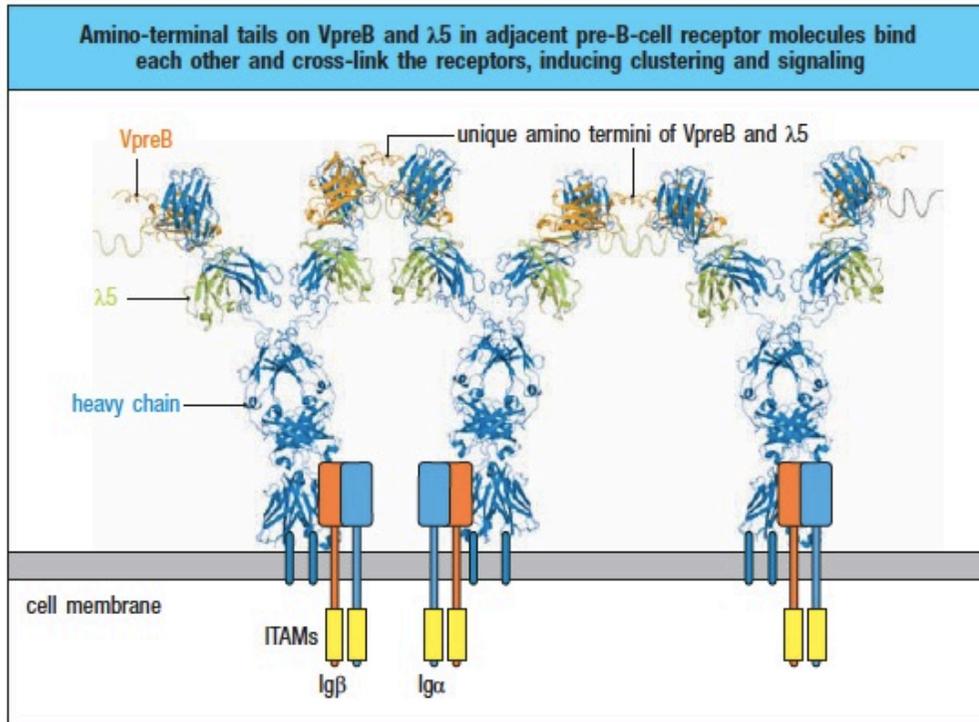


La catena pesante μ si associa ad un complesso di catene invarianti (VpreB- λ 5) per formare il pre-BCR

Protein	Function
RAG-1	Lymphoid-specific recombinase
RAG-2	
TdT	N-nucleotide addition



L'espressione del pre-BCR costituisce il primo "checkpoint" nella maturazione dei linfociti B



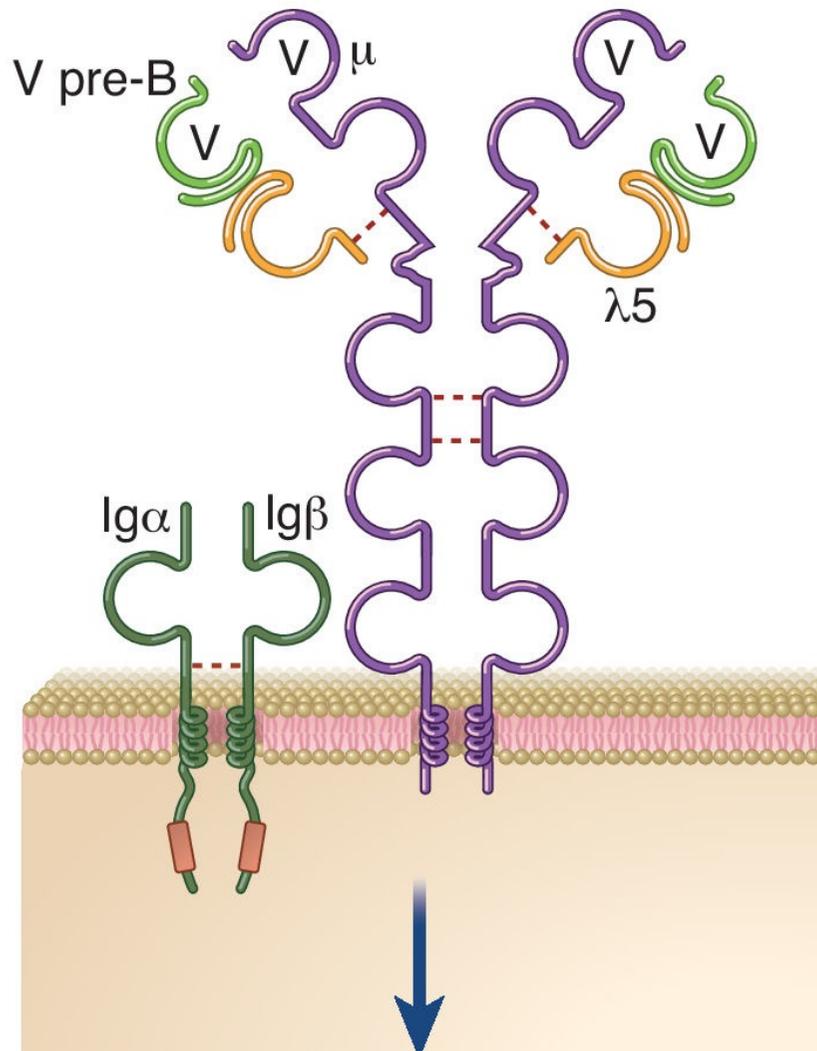
Le regioni aminoterminali della catena surrogato VpreB e $\lambda 5$ interagiscono tra loro favorendo la formazione spontanea di dimeri di pre-BCR



Il segnale intracellulare viene trasdotto dalla **tirosino-chinasi Bruton (Btk)**

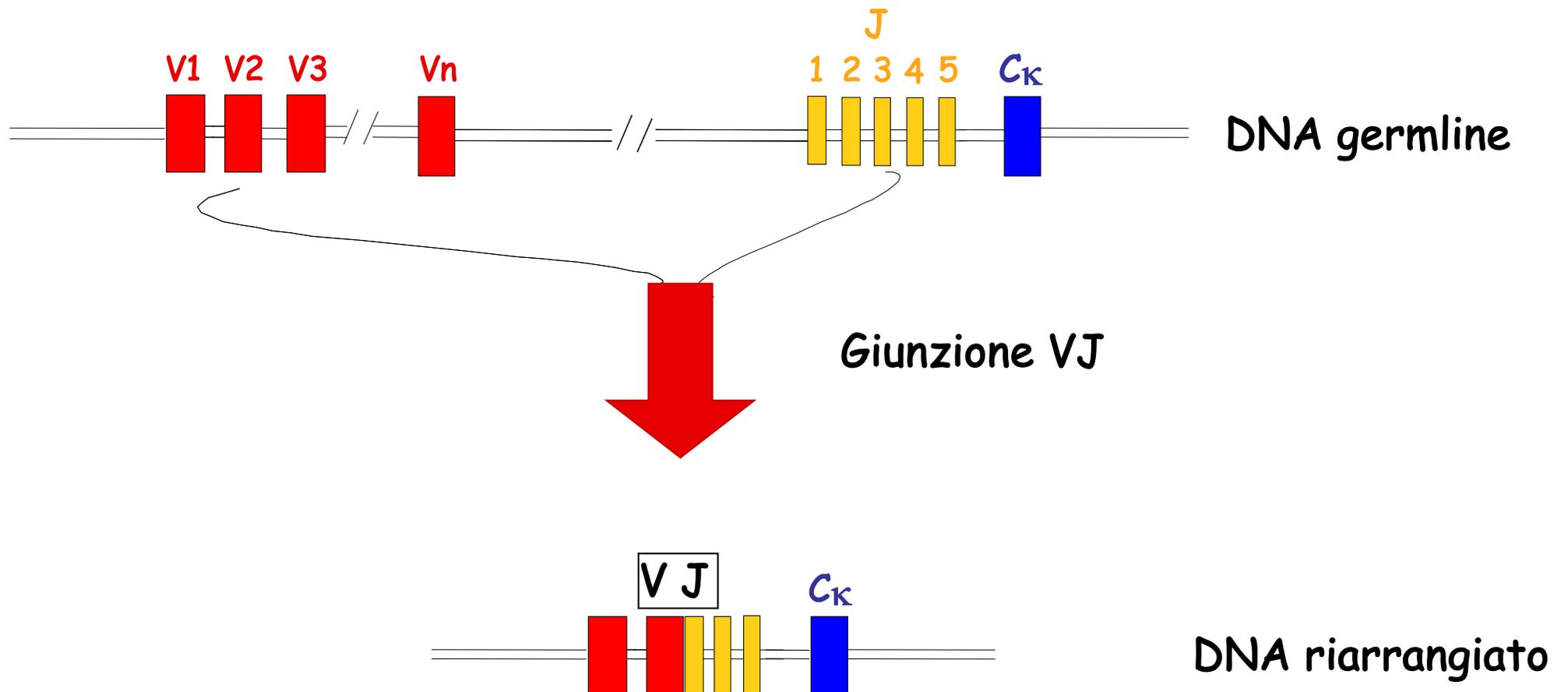
La chinasi Btk genera segnali richiesti per il progredire della maturazione

Il segnale propagato dalla **tirosino-chinasi Bruton Btk** induce:

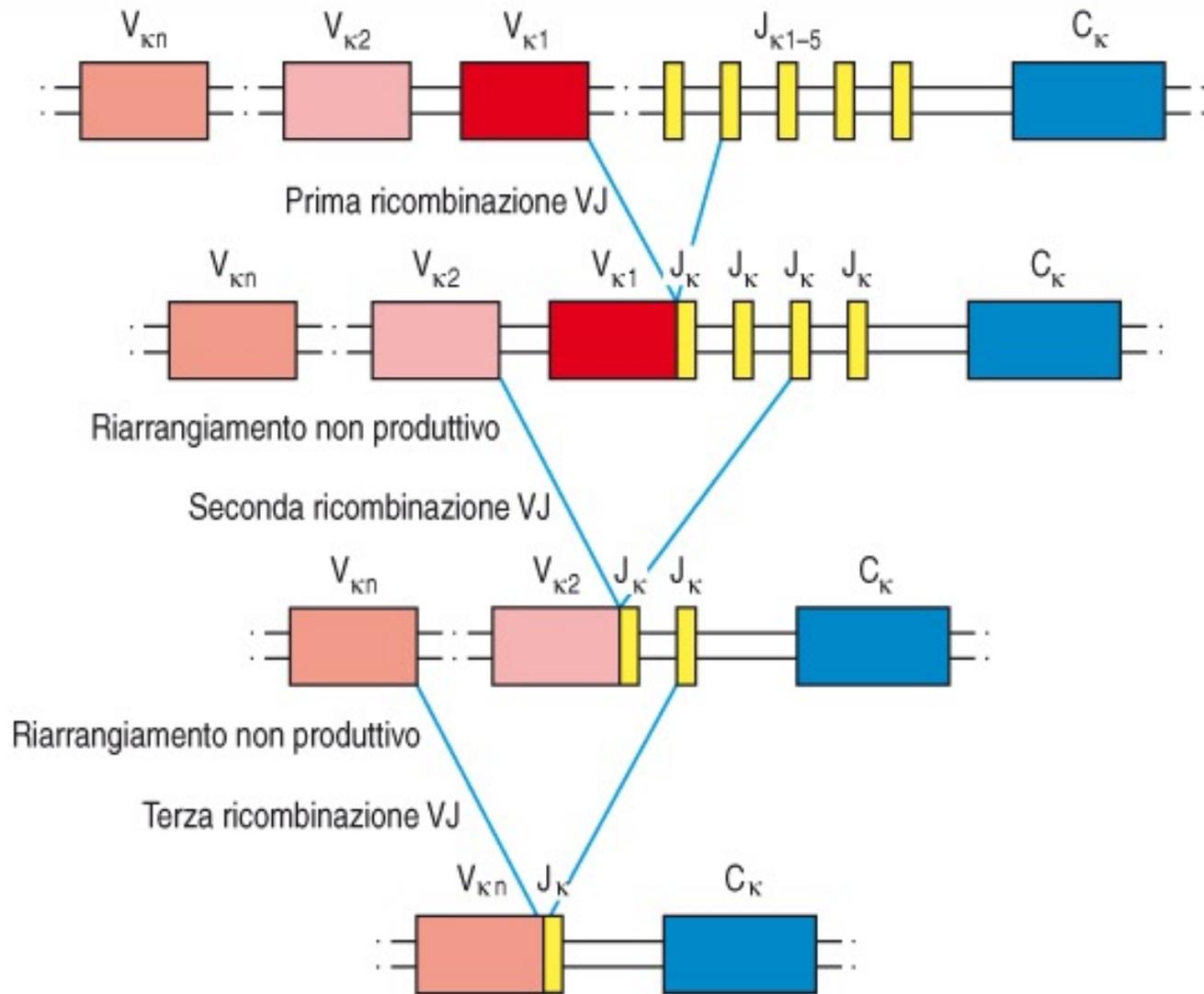


- **Inibizione della ricombinazione della catena H (esclusione allelica)**
- **Sopravvivenza e proliferazione dei linfociti pre-B**
- **Stimolazione della ricombinazione della catena leggera κ**
- **Blocco della trascrizione della catena leggera sostitutiva**

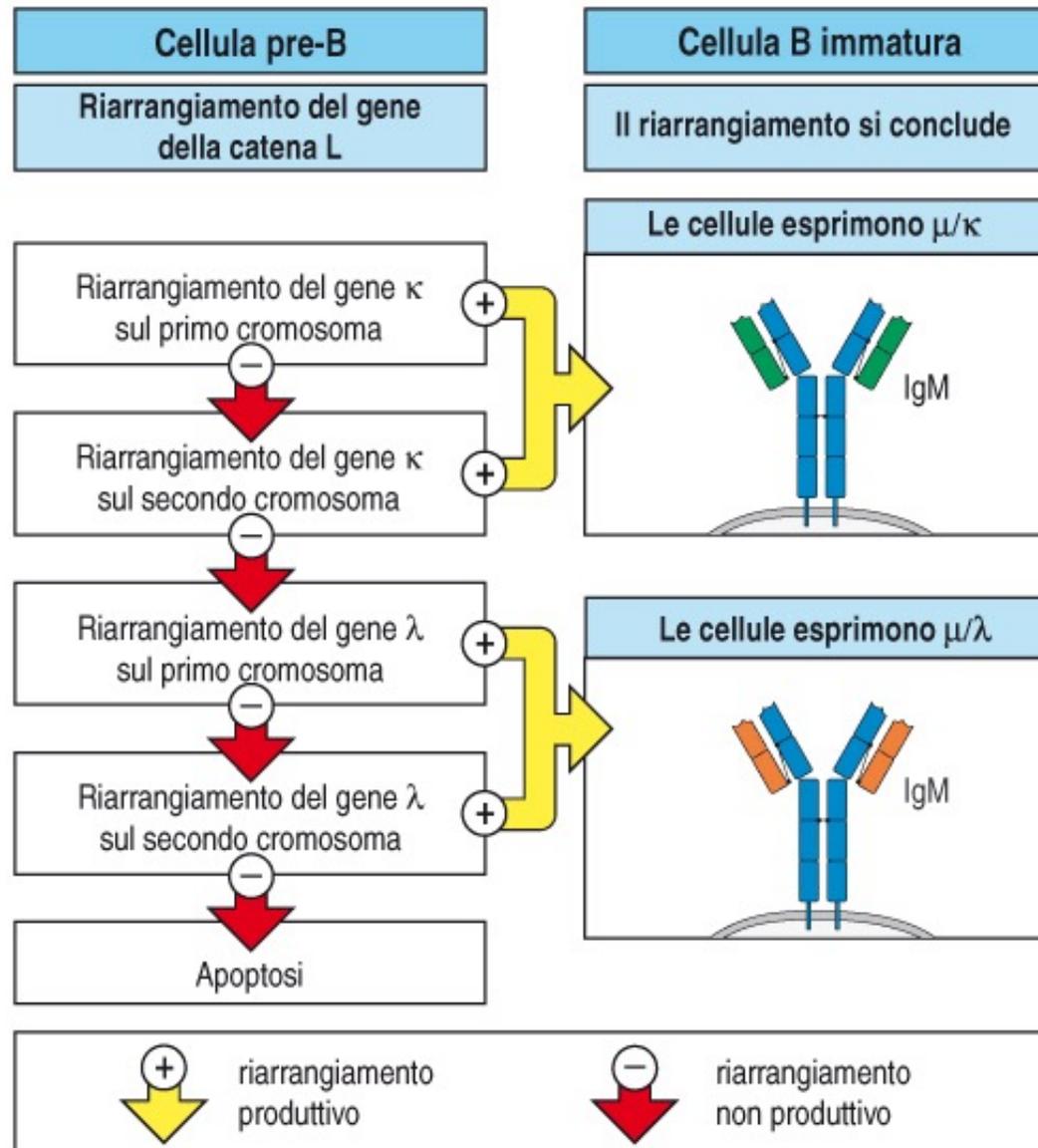
IL RIARRANGIAMENTO DELLA CATENA LEGGERA κ



Ai loci della catena leggera sono ammessi riarrangiamenti ripetuti



Il riarrangiamento produttivo dei geni della catena leggera nella cellula pre-B consente l'espressione in membrana dell' **IgM**



Fattori che contribuiscono alla diversità delle Ig

DIVERSITA' COMBINATORIALE

- Geni multipli per la regione variabile V, D, J
(scelta casuale di uno solo dei segmenti V, D e J)
- Associazione combinatoriale delle catene H e L

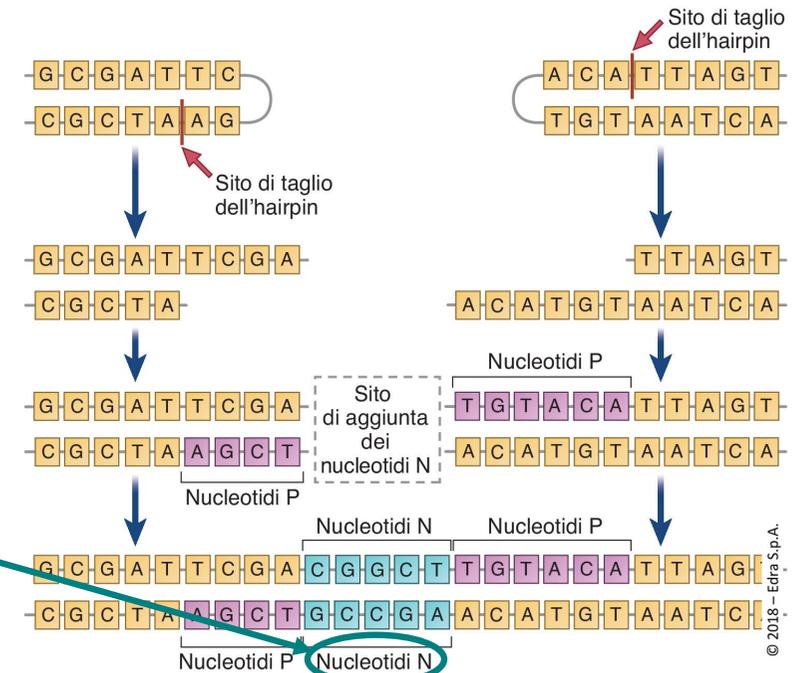
	Immunoglobulin	
	Heavy chain	κ
Number of V gene segments	45	35
Number of diversity (D) gene segments	23	0
Number of joining (J) gene segments	6	5

DIVERSITA' GIUNZIONALE

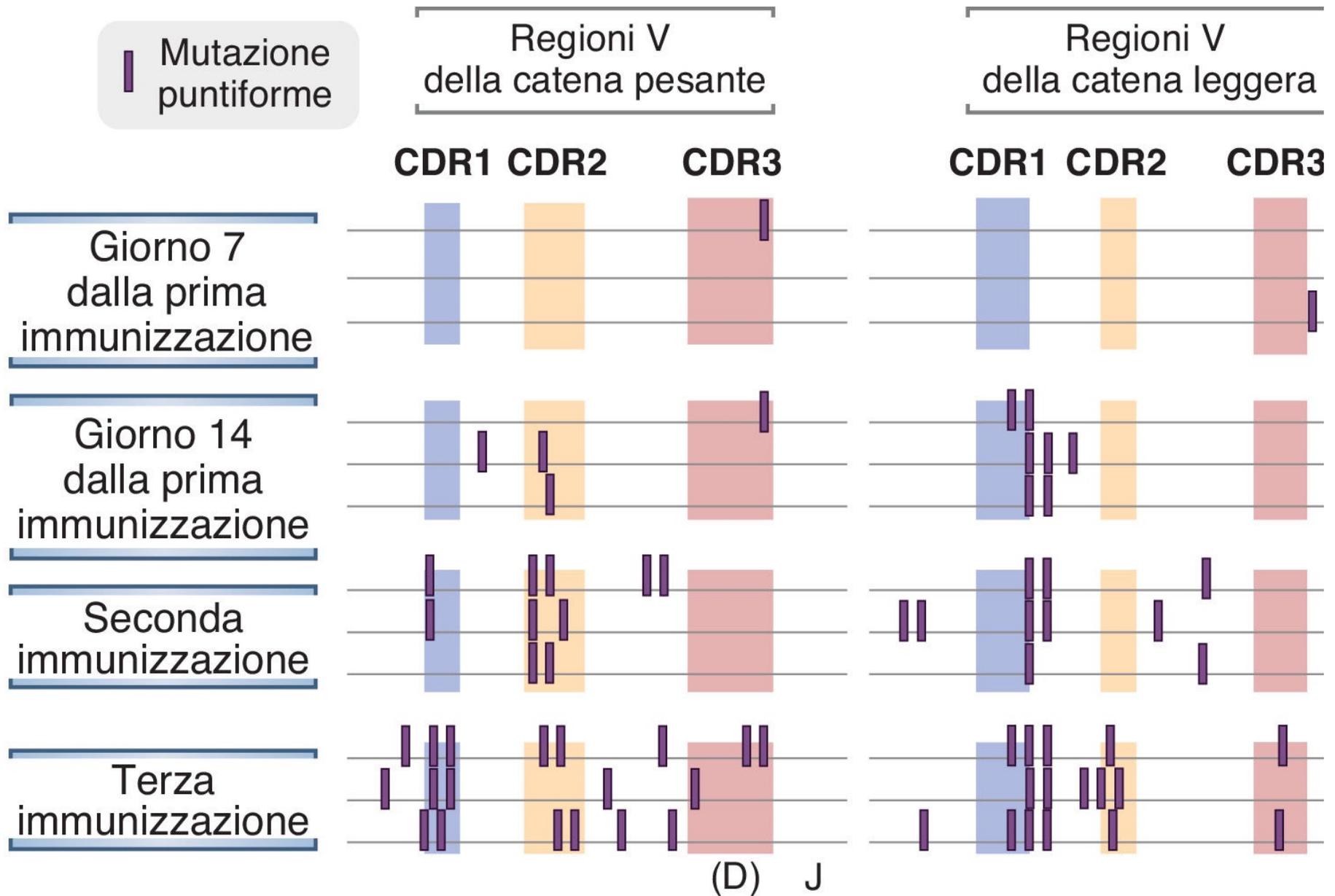
Delezione di nucleotidi nel punto di giunzione

Aggiunta di nucleotidi P; aggiunta di nucleotidi N ad opera della terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)

$\sim 5 \times 10^{13}$ Ig diverse



Mutazioni somatiche



Sono attivate dall'esposizione all'antigene (organi linfoidi secondari)

La frequenza delle mutazioni aumenta in seguito a ripetute esposizioni allo stesso antigene

Fattori che contribuiscono alla diversità delle Ig

DIVERSITA' COMBINATORIALE

- Geni multipli per la regione variabile V, D, J
(scelta casuale di uno solo dei segmenti V, D e J)
- Associazione combinatoriale delle catene H e L

DIVERSITA' GIUNZIONALE

- Delezione di nucleotidi nel punto di giunzione
- Aggiunta di nucleotidi nel punto di giunzione (regione N)
ad opera della terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)

• Mutazioni somatiche

Immature B cells express an IgM BCR and undergo a process of **negative selection**

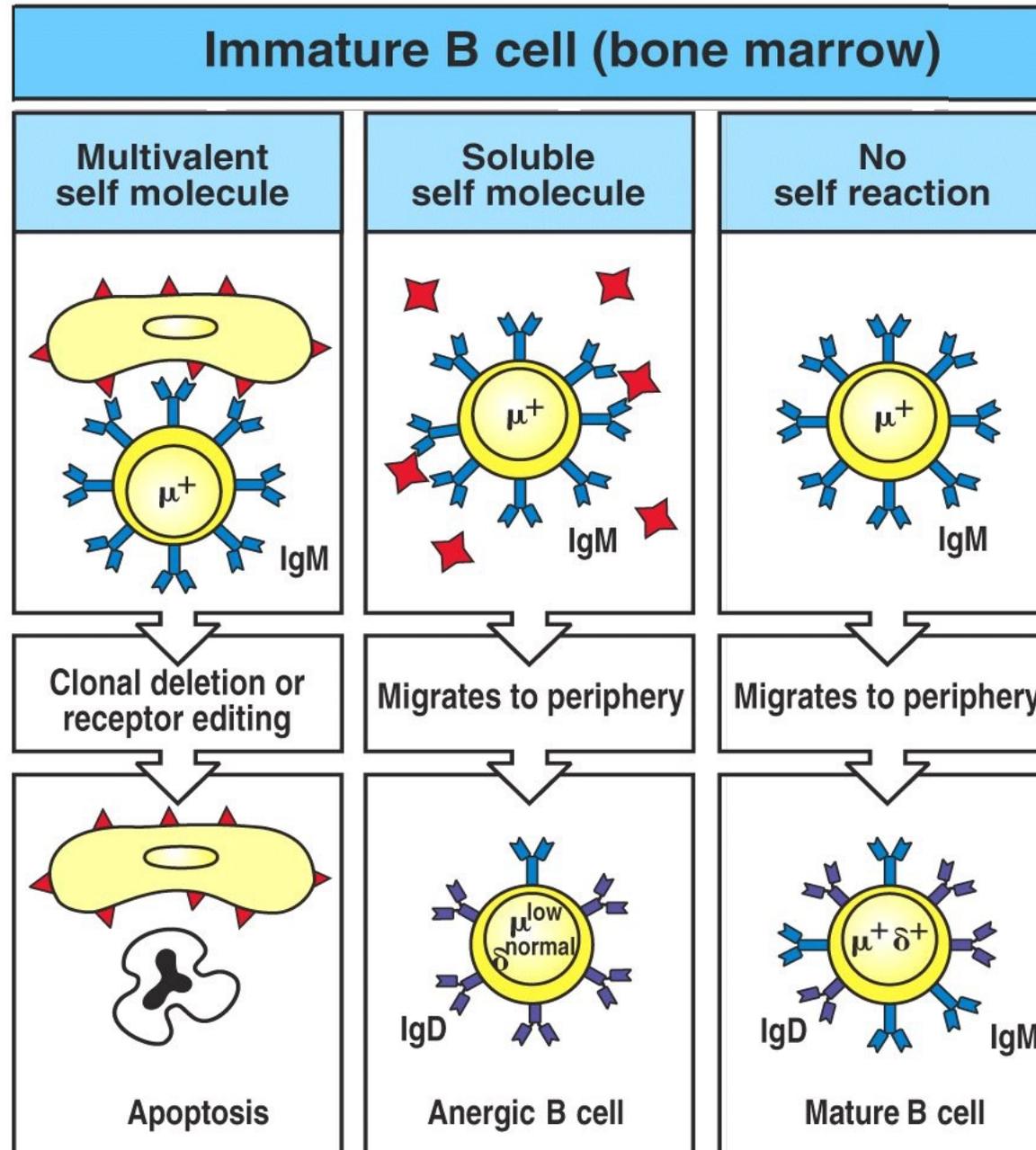
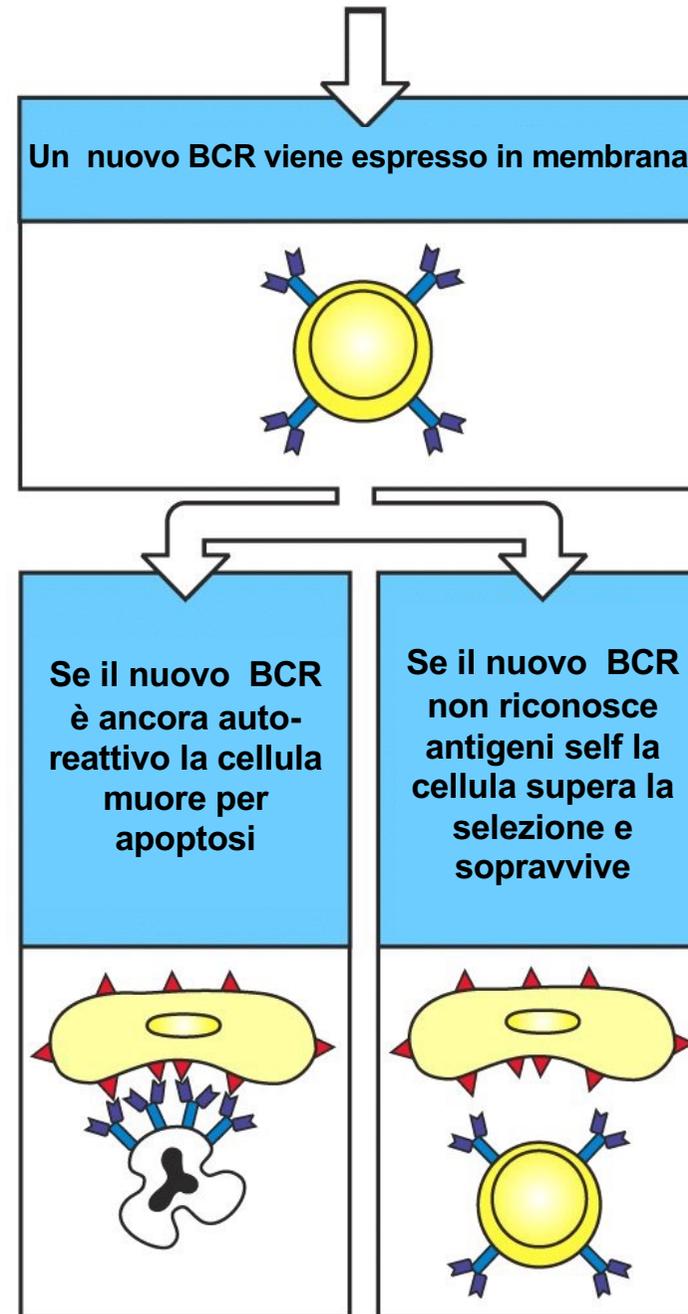
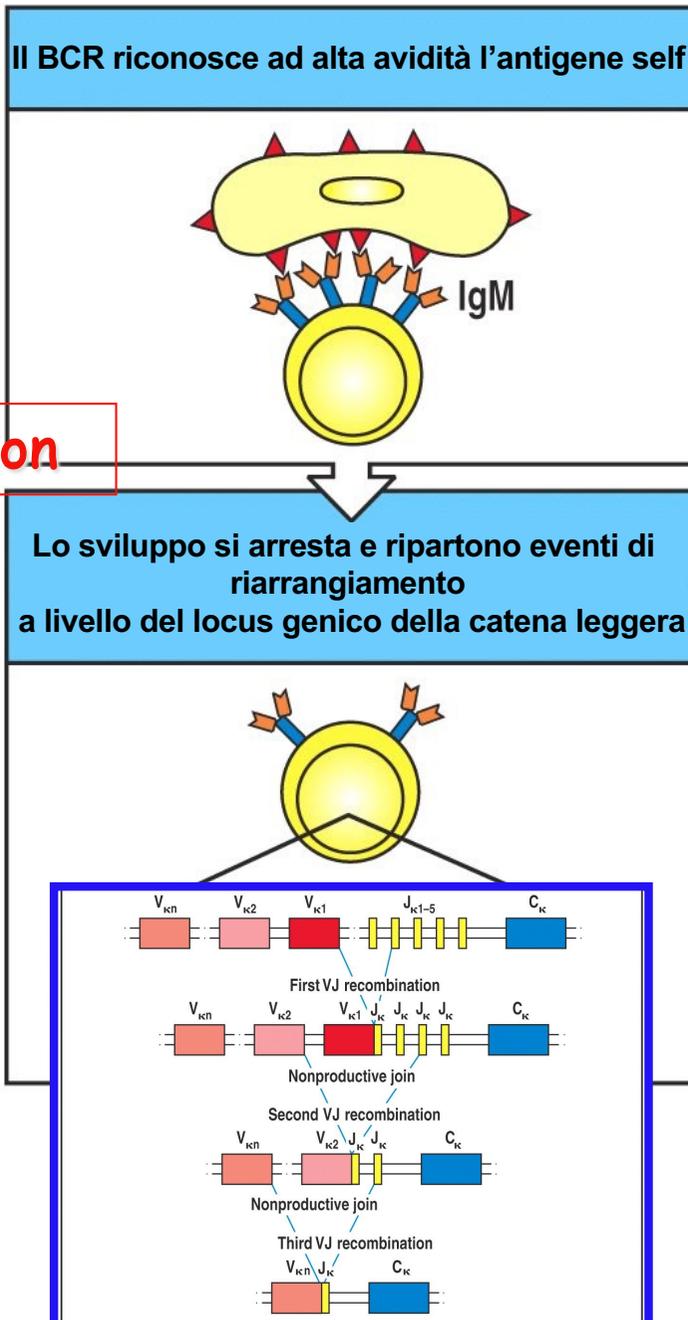
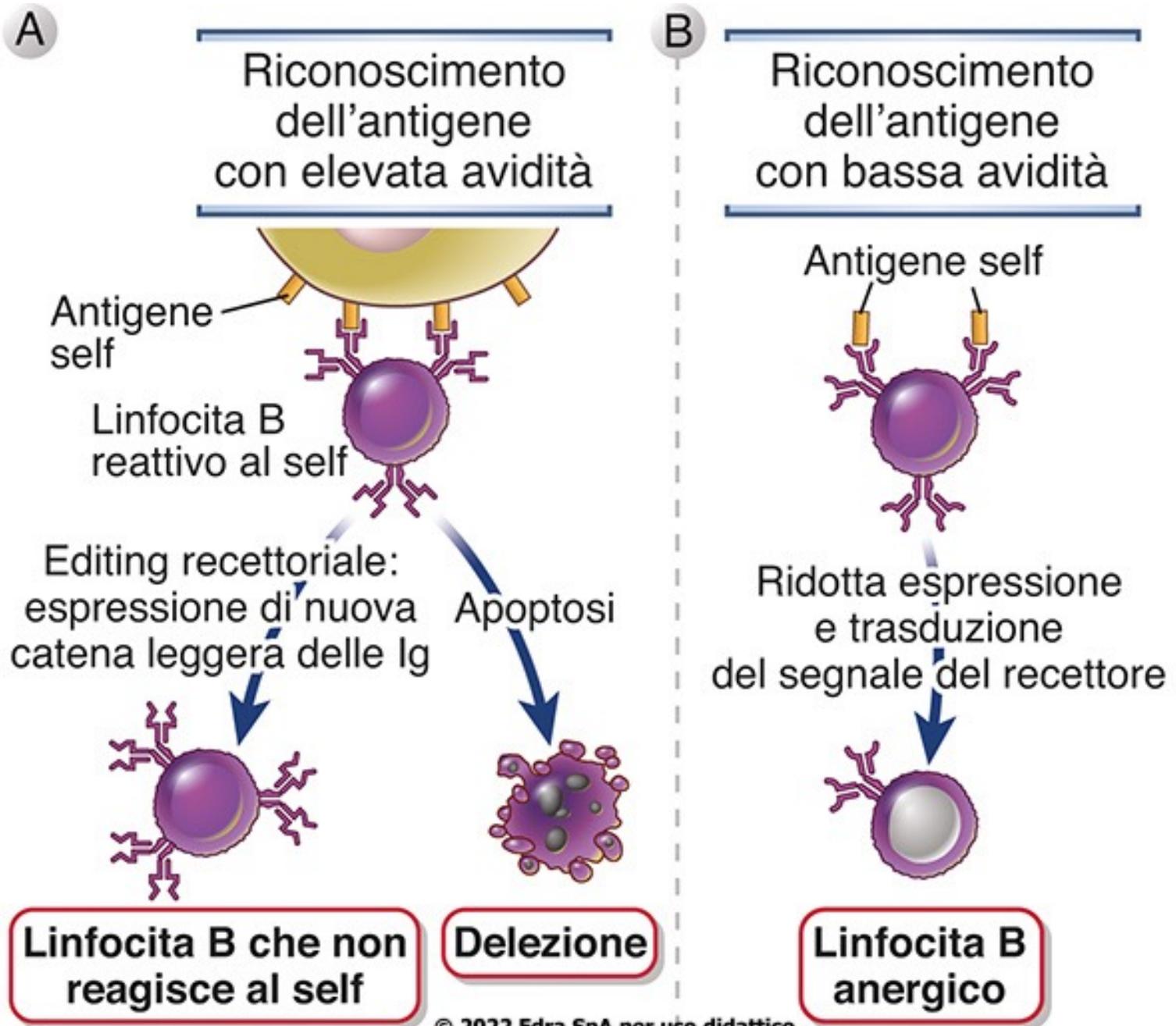


Figure 7-26 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

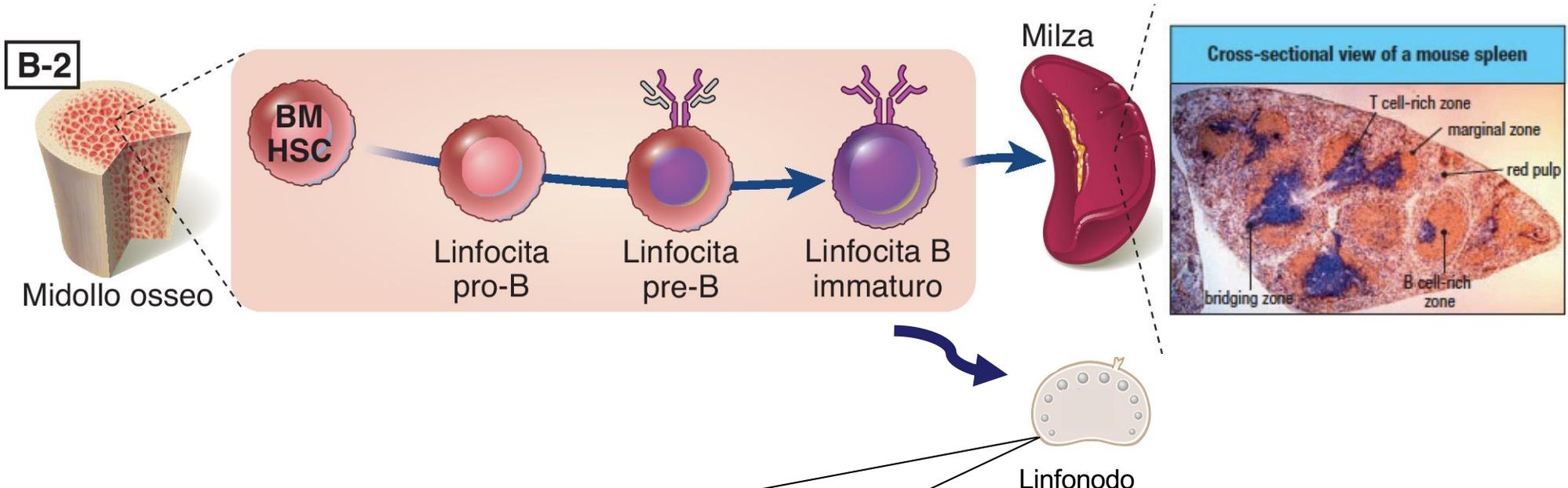
I linfociti B autoreattivi possono andare incontro ad "editing recettoriale"



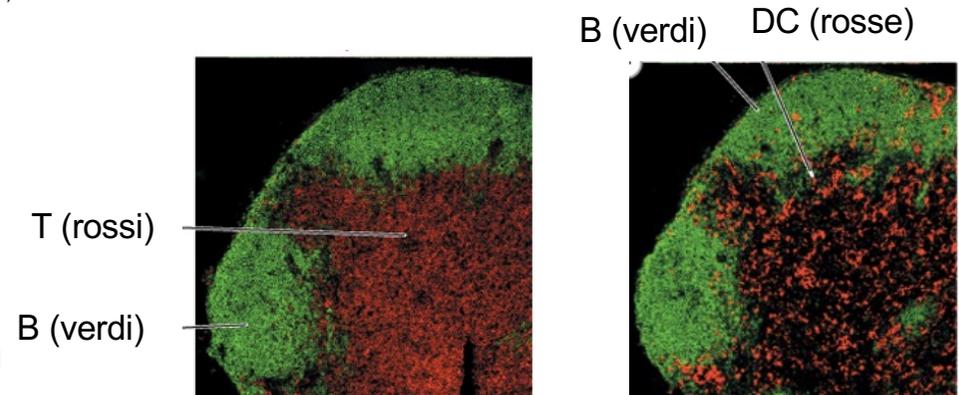
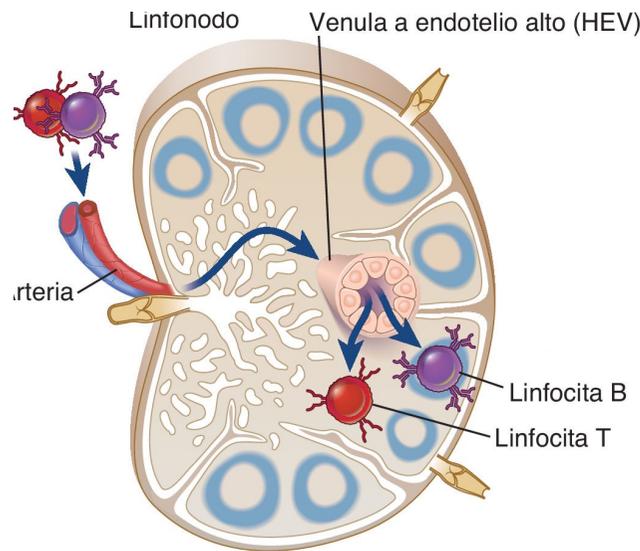
La selezione dei linfociti B



I linfociti B che hanno superato la selezione nel midollo osseo completano la loro maturazione negli organi linfoidi secondari...

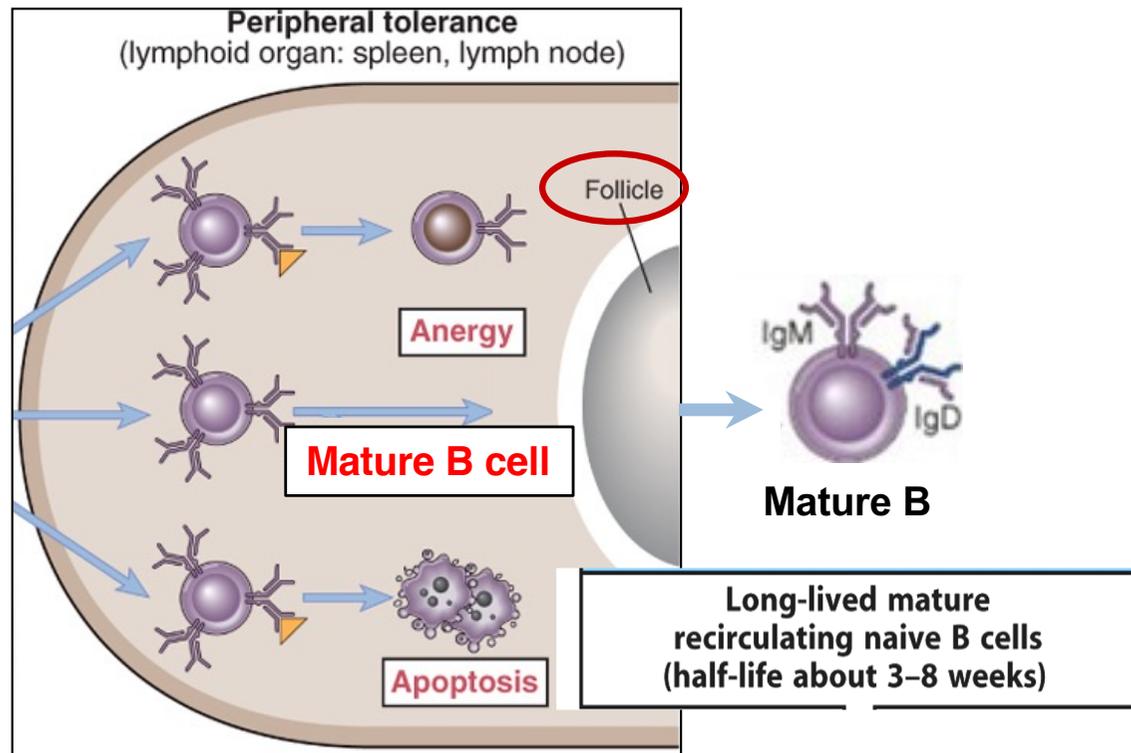
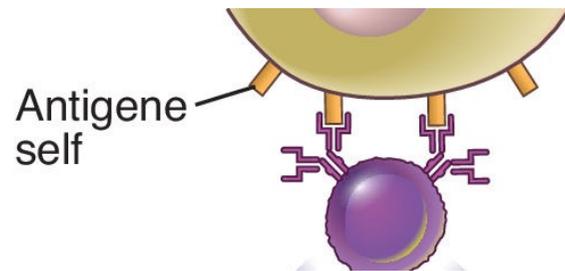


Le cellule T popolano la regione interna mentre i B formano **follicoli** nella regione esterna.



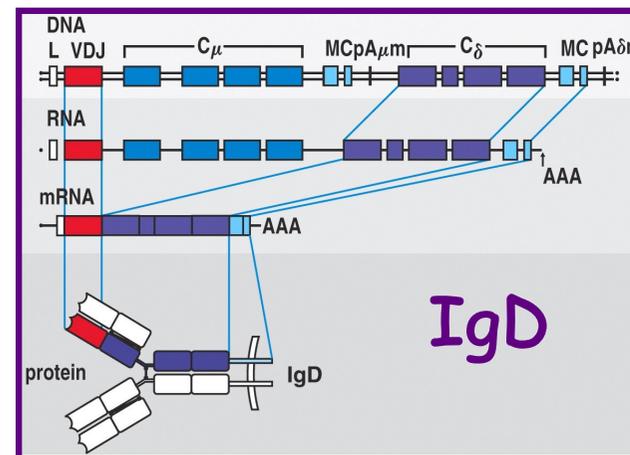
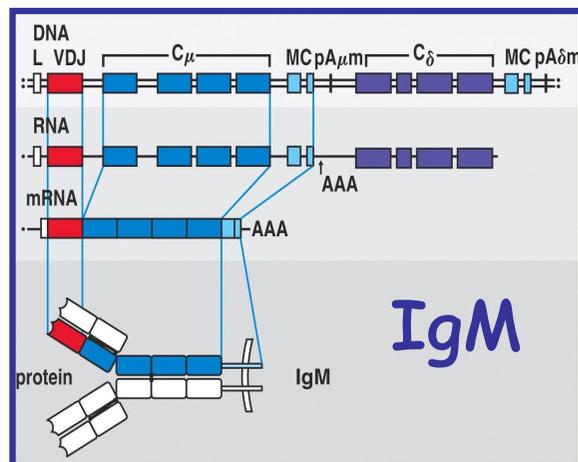
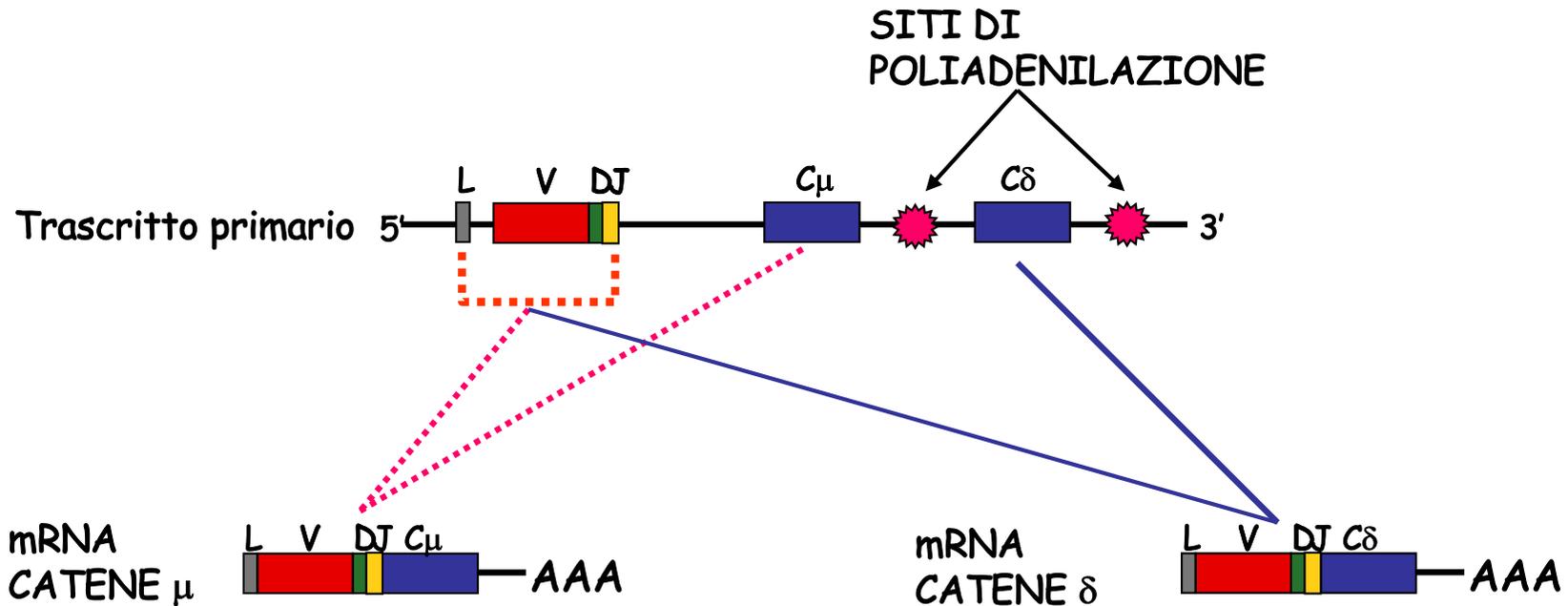
..... dove subiscono un ulteriore processo di selezione!

milza o linfonodi

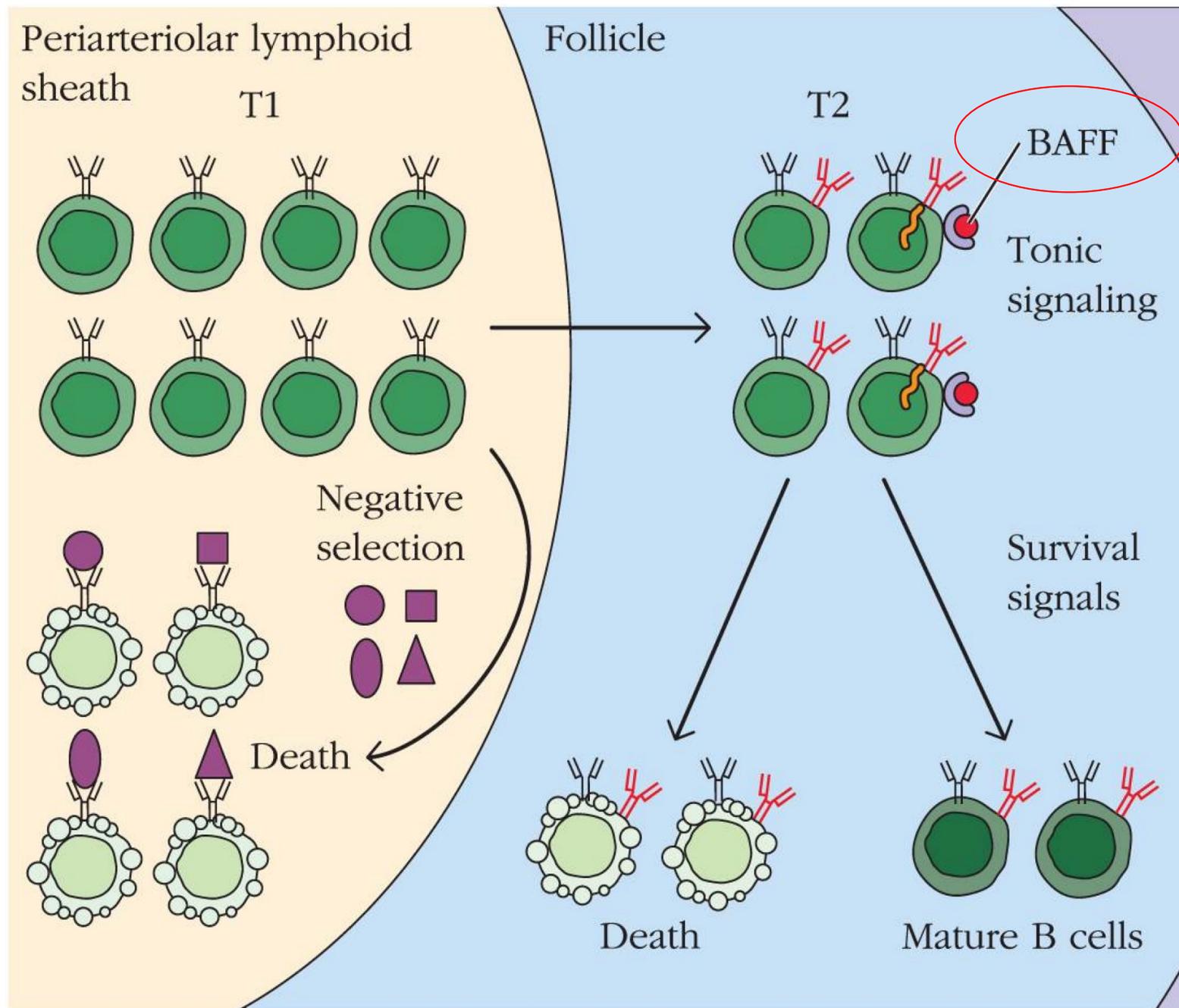


Il linfocita B maturo esprime in membrana sia IgM e IgD

La contemporanea espressione di IgM e IgD dipende da eventi di splicing alternativi

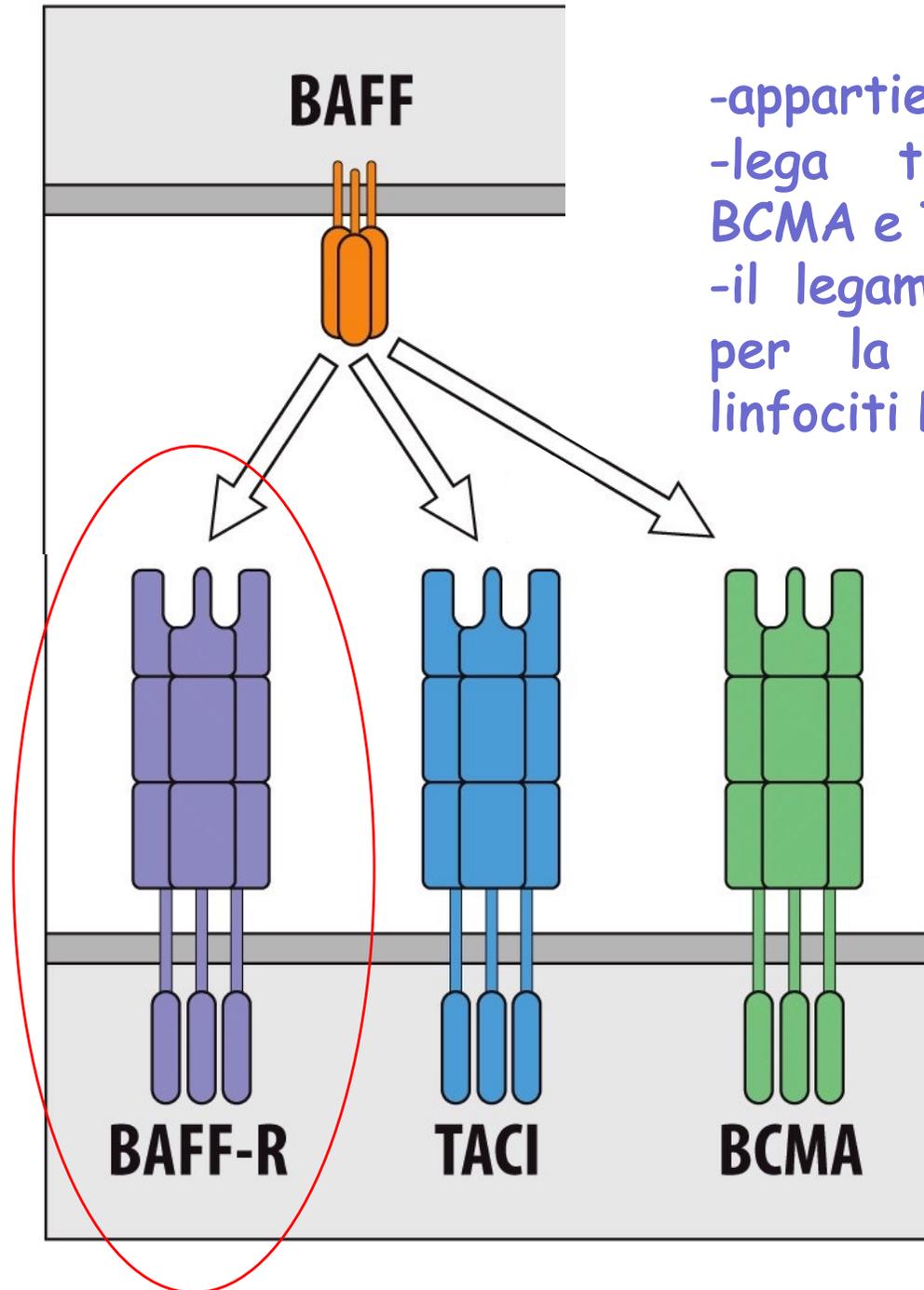


B cell positive selection is controlled by tonic and survival signaling



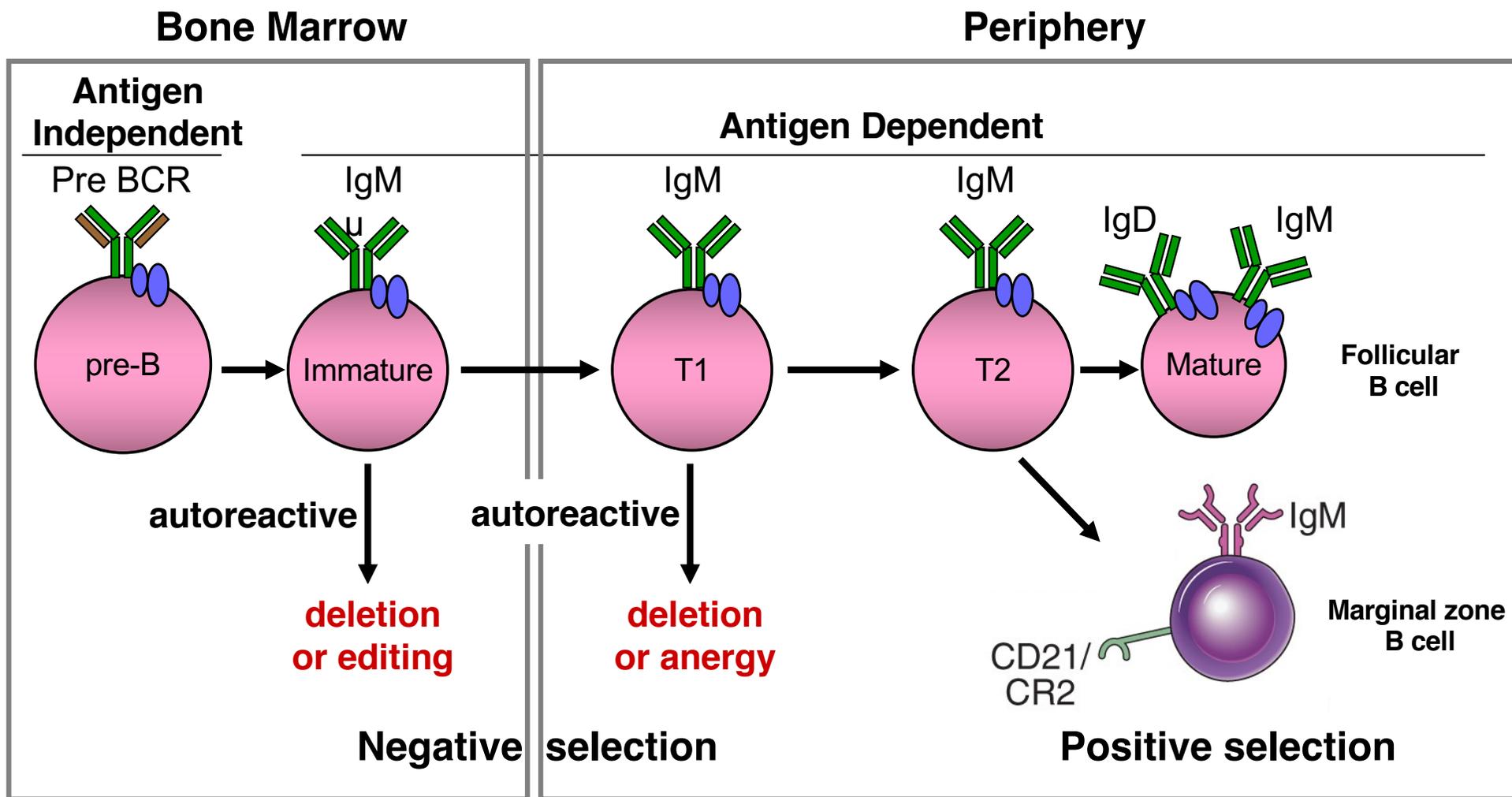
BAFF

- appartiene alla famiglia del TNF
- lega tre recettori: BAFF-R, BCMA e TACI
- il legame a BAFF-R è richiesto per la piena maturazione dei linfociti B

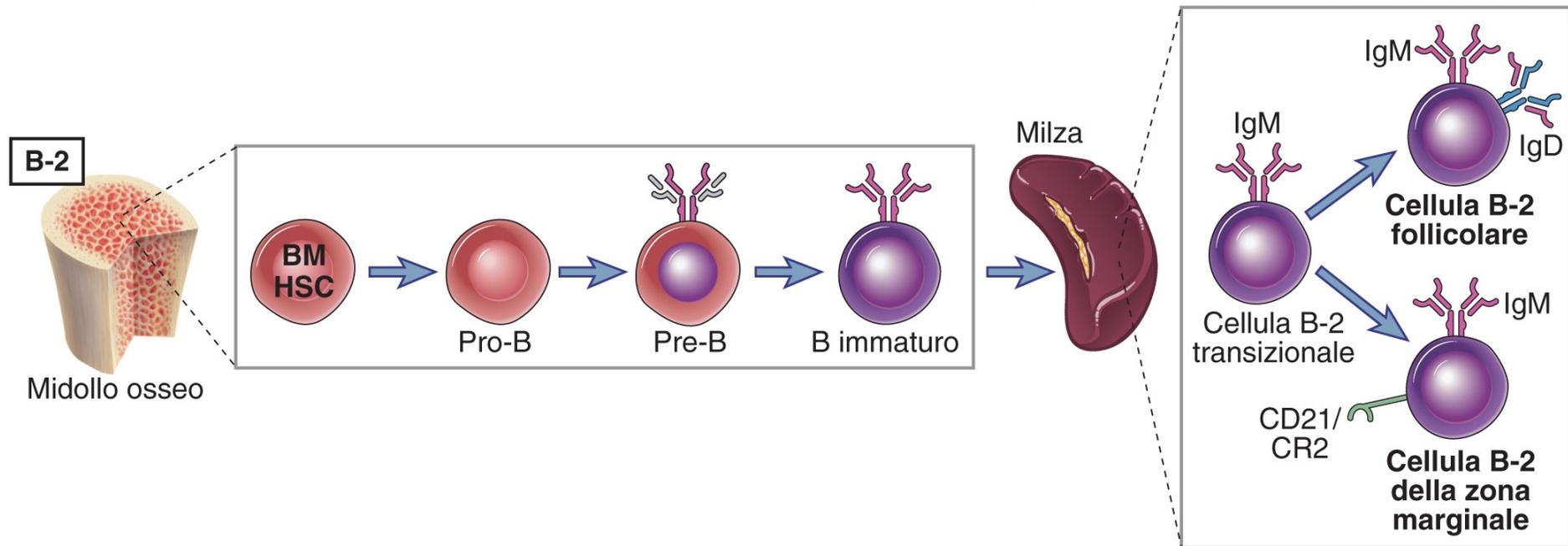


Topi KO per BAFF mancano di linfociti B maturi e hanno un eccesso di linfociti in fase T2 !

Proposal model of human B-cell development

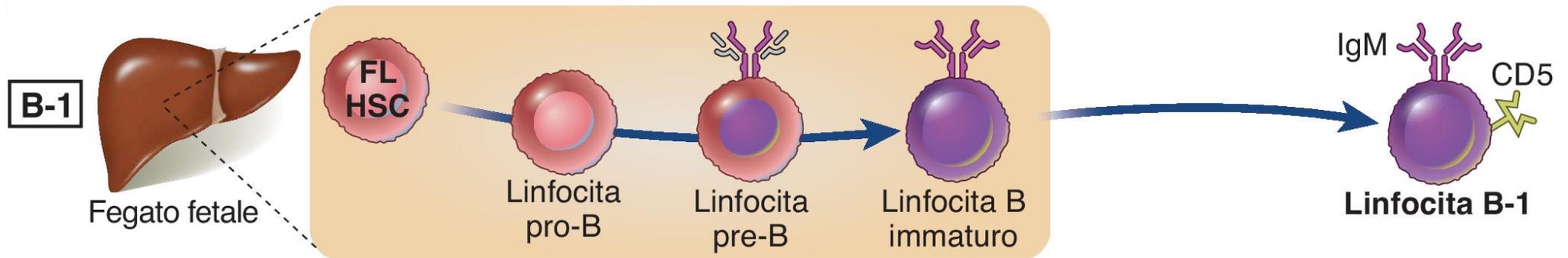


I linfociti B generati dai precursori del midollo osseo sono denominati B2



Una sottopopolazione di linfociti B, denominati B-1 matura
differentemente dalla maggior parte dei linfociti B

Le cellule B-1 si sviluppano precocemente ed esprimono un repertorio di geni V limitato



Property	B-1 cells
When first produced	Fetus
N-regions in VDJ junctions	Few
V-region repertoire	Restricted
Primary location	Body cavities (peritoneal, pleural)
Mode of renewal	Self-renewing
Spontaneous production of immunoglobulin	High

- maturano nel fegato fetale
- possiedono un repertorio recettoriale limitato (minore variabilità combinatoriale e giunzionale, assenza di TdT)
- legano antigeni polisaccaridici
- non danno origine a cellule della memoria

Le diverse popolazioni di linfociti B si attivano in risposta ad antigeni diversi

