

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.

2 teorie

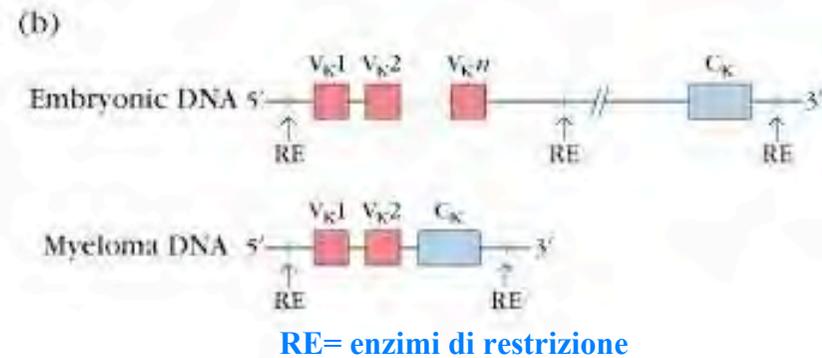
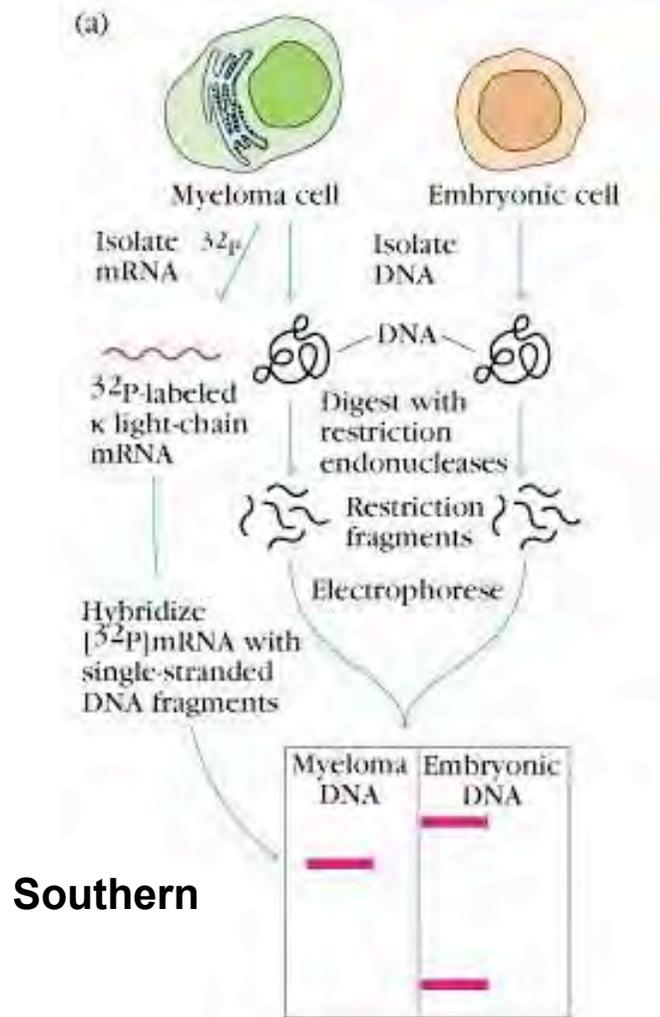
1. La teoria **germinale** (un gene per ciascuna diversa catena immunoglobulinica, repertorio in gran parte ereditato).
2. La teoria della **variabilità somatica** (modificazioni durante la vita di un individuo, partendo da un numero limitato di geni).

geni Ig clonati: entrambe le teorie valide

- Sequenza di DNA codificante è generata dal riarrangiamento di un numero relativamente piccolo di segmenti genici ereditati.**

- Diversificazione aumentata attraverso processo di ipermutazione somatica che avviene nelle cellule B mature attivate**

Nelle cellule B, i geni delle Ig sono riarrangiati



Tonegawa e Hozumi (1976)

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

Geni Ig = famiglie multigeniche = diversi segmenti genici nell'uomo

Numero dei segmenti genici nei geni della Ig umana			
Segmento	Catene leggere		Catena pesante
	κ	λ	H
Segmenti variabili (V)	40	30	40
Segmenti di diversità (D)	0	0	25
Segmenti di giunzione (J)	5	4	6
Chromosoma	2	22	14

Regione Variabile
110 aa

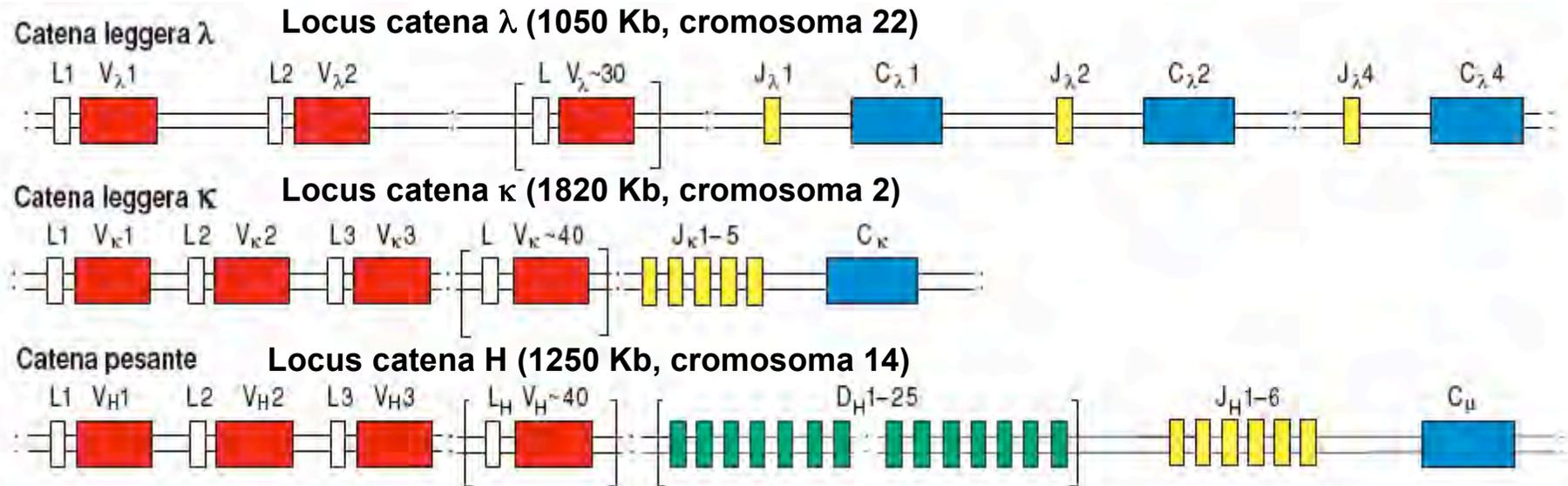
95-101 aa

~13 aa

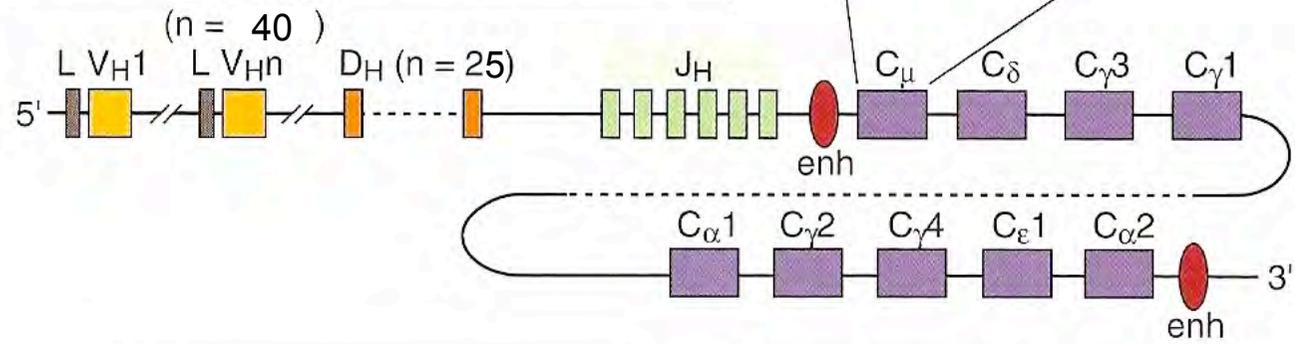
Configurazione germinale del DNA per catene pesanti e leggere = famiglie multigeniche distinte, localizzate su cromosomi differenti

Organizzazione multigenica dei geni delle immunoglobuline

segmenti genici = molteplici sequenze codificanti separate da sequenze non codificanti.



Locus della catena H (1250 kb; cromosoma 14)



Meccanismi per determinare la diversità del repertorio

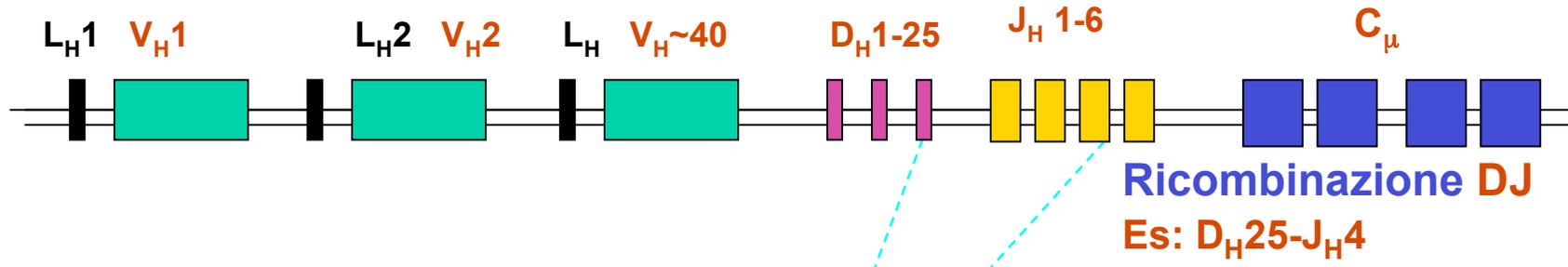
1. **Diversità combinatoria (presenza di molti segmenti genici V, D, J nel DNA germinale)**
2. **Diversità giunzionale**
3. **Diversità nell'associazione tra la catena pesante e leggera**
4. **Ipermutazione somatica**

Prime fasi di maturazione, negli organi linfatici centrali

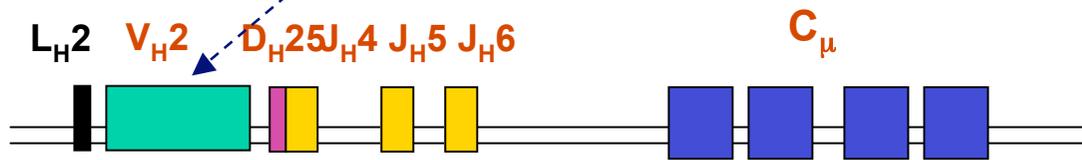
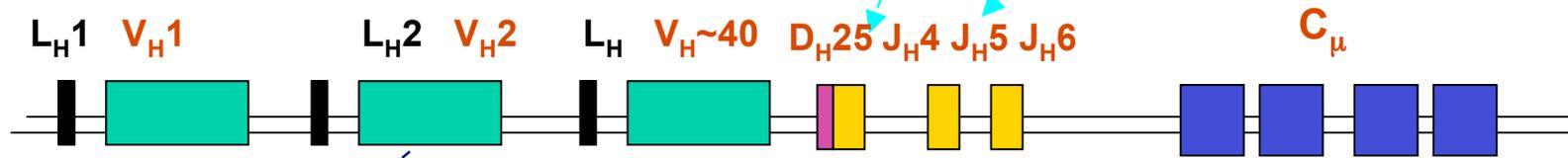
Organi linfatici periferici

Riarrangiamento della catena pesante μ

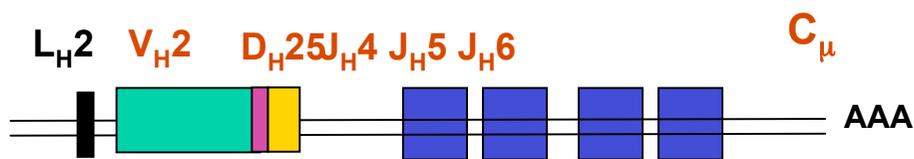
DNA germinale



Ricombinazione DJ
Es: $D_{H25}-J_{H4}$



Ricombinazione V-DJ
Es: $V_{H2}-DJ$



Trascrizione

RNA trascritto primario

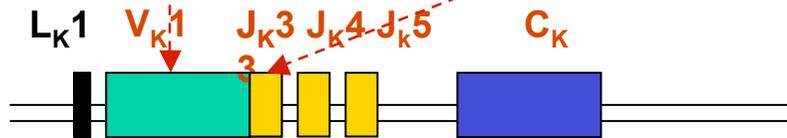
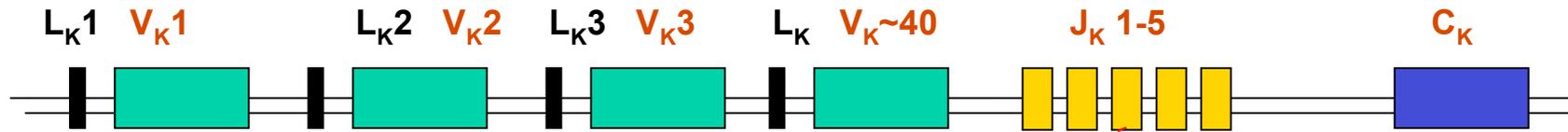


Splicing

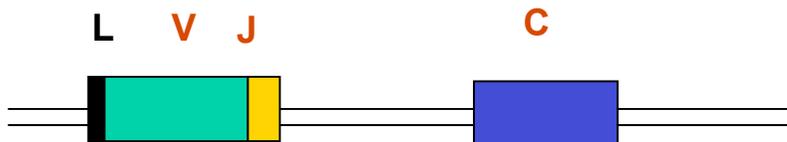
mRNA

Riarrangiamento genico o ricombinazione somatica della catena leggera K

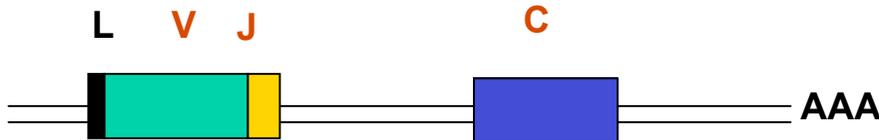
DNA germinale



Ricombinazione VJ



DNA riarrangiato della catena K



Trascrizione

RNA Trascritto primario

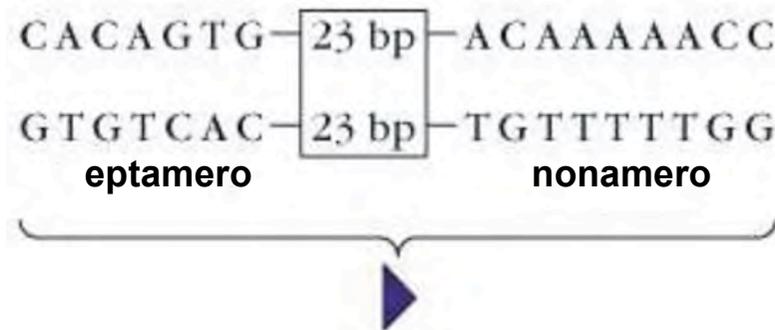


Splicing

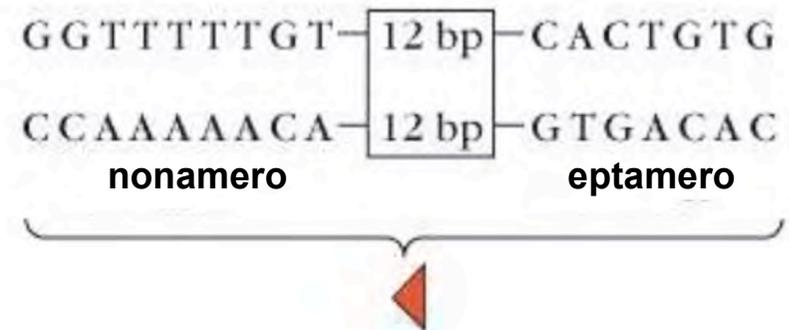
mRNA

Meccanismi della ricombinazione somatica

Sequenza nucleotidica delle RSS (Recombination Signal Sequence)



RSS a due giri



RSS a un giro

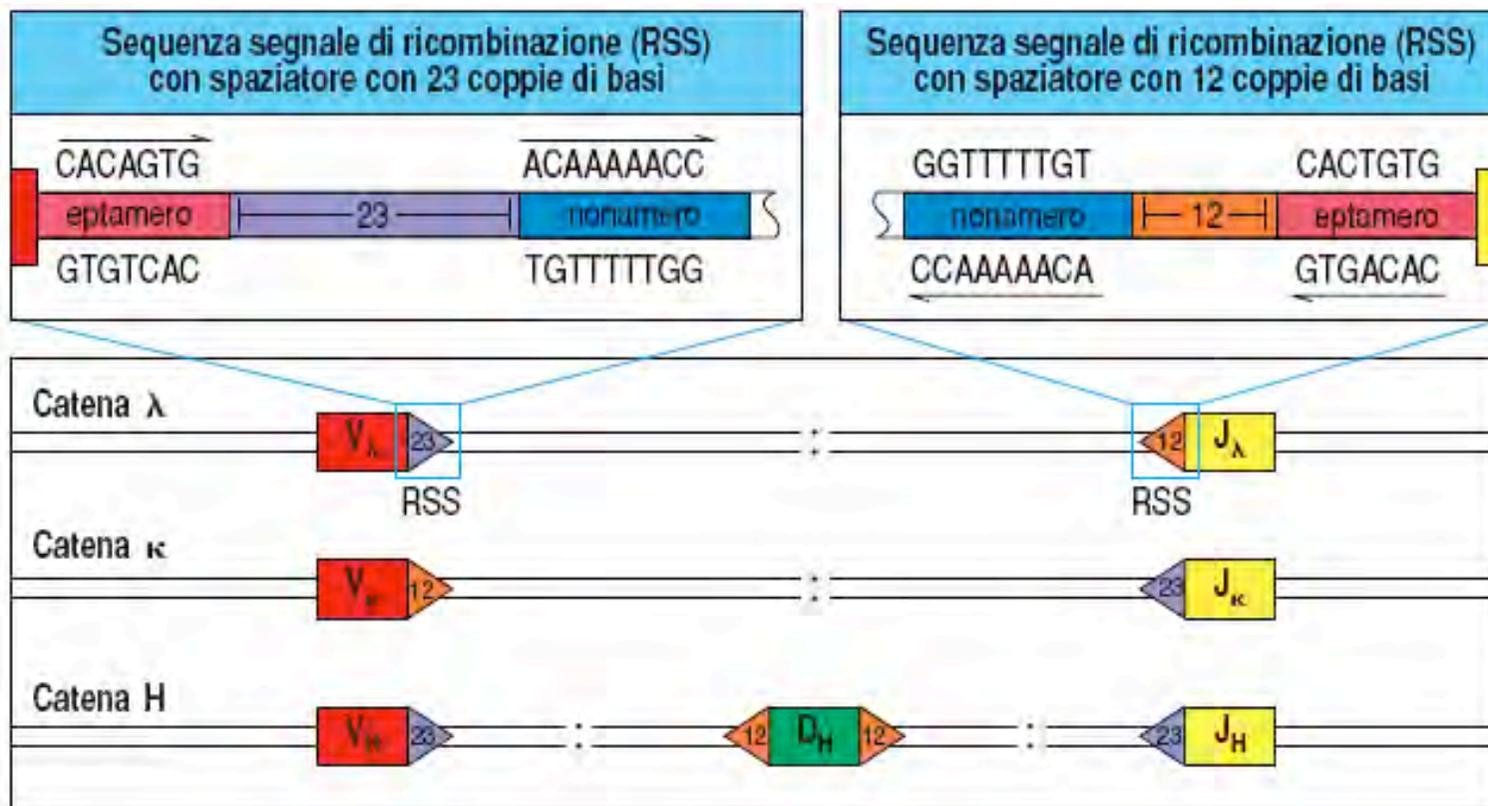
RSS= eptameri e nonameri palindromici conservati

Sequenze spaziatrici= 12 o 23 paia di basi

Sequenze spaziatrici a 12 paia di basi= un giro dell'elica del DNA

Sequenze spaziatrici a 23 paia di basi= due giri dell'elica del DNA

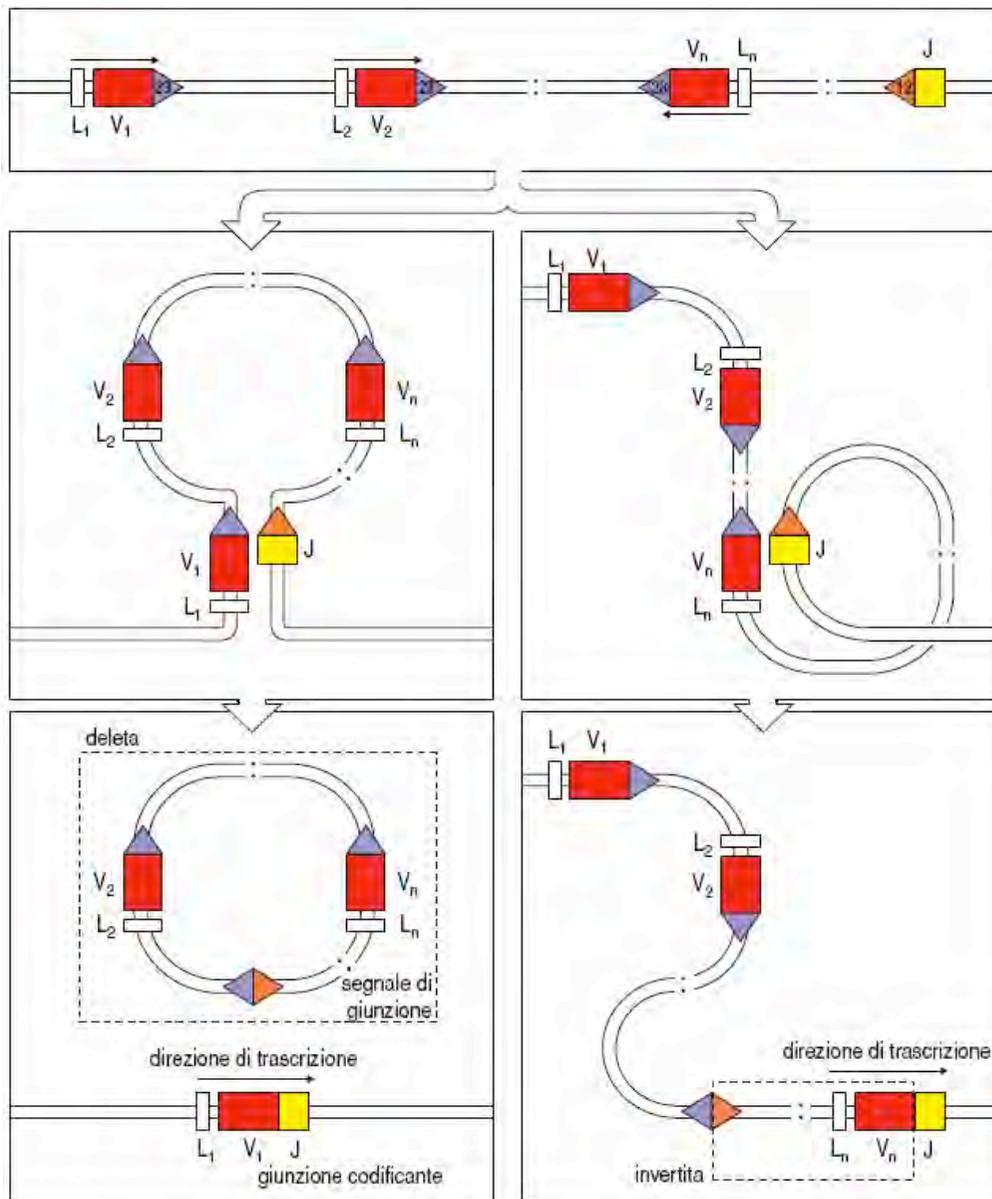
Localizzazione delle RSS nel DNA germinale delle Ig



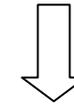
REGOLA 12/23

5% Ac: D-D

I segmenti genici della regione V sono riuniti grazie alla ricombinazione V(D)J



Azione di ricombinasi = RAG-1 e RAG-2 (Recombination Activating Genes)



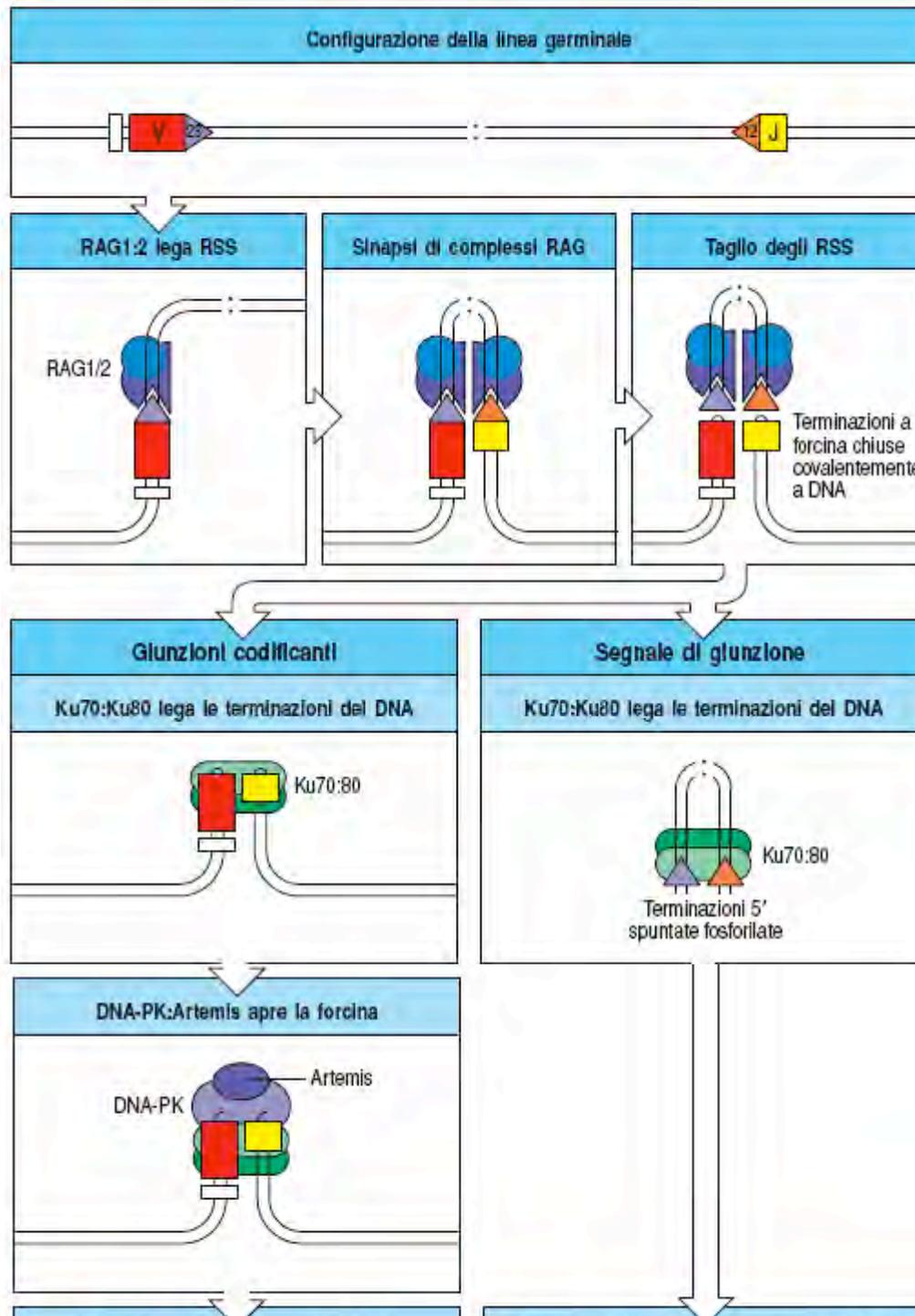
KO nel topo = SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency)

Mutazioni nell'uomo: sindrome di Omenn

Esoni V e J:

Stesso orientamento trascrizionale

Orientamento trascrizionale in direzioni opposte (50% dei geni k)



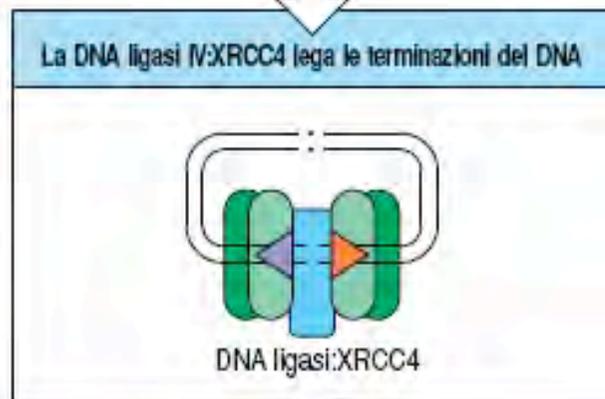
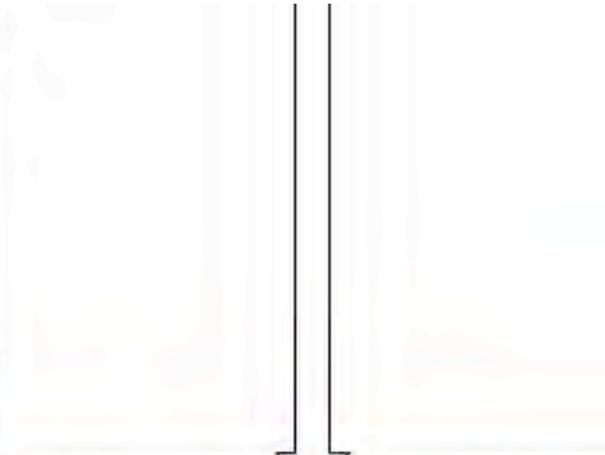
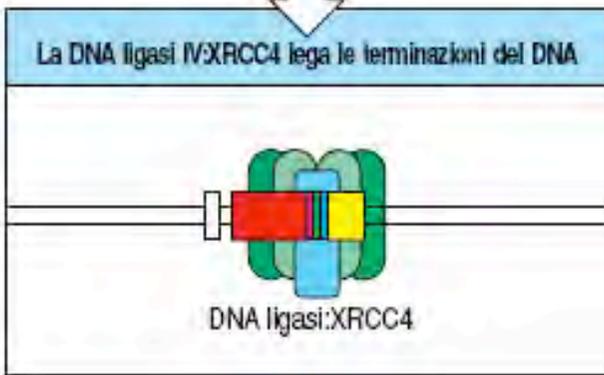
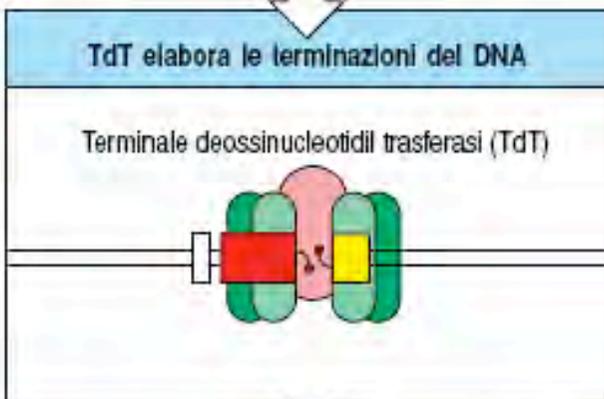
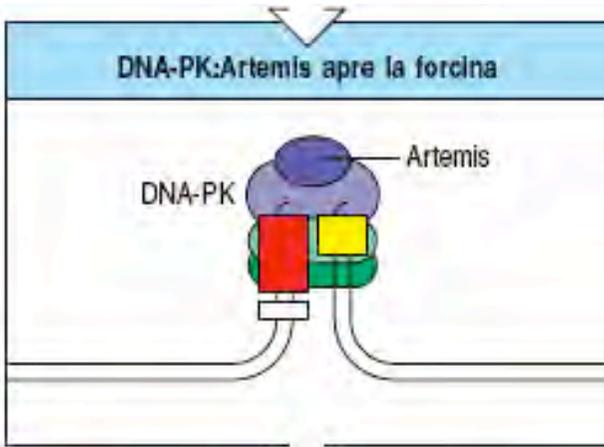
Geni implicati nella recombinazione VDJ:

RAG-1 e RAG-2

Ku70:Ku80

Proteina chinasi DNA dipendente (DNA-PK)

Artemis la cui inattivazione è responsabile di RS-SCID nell'uomo



**Proteina chinasi DNA
dipendente (DNA-PK)**

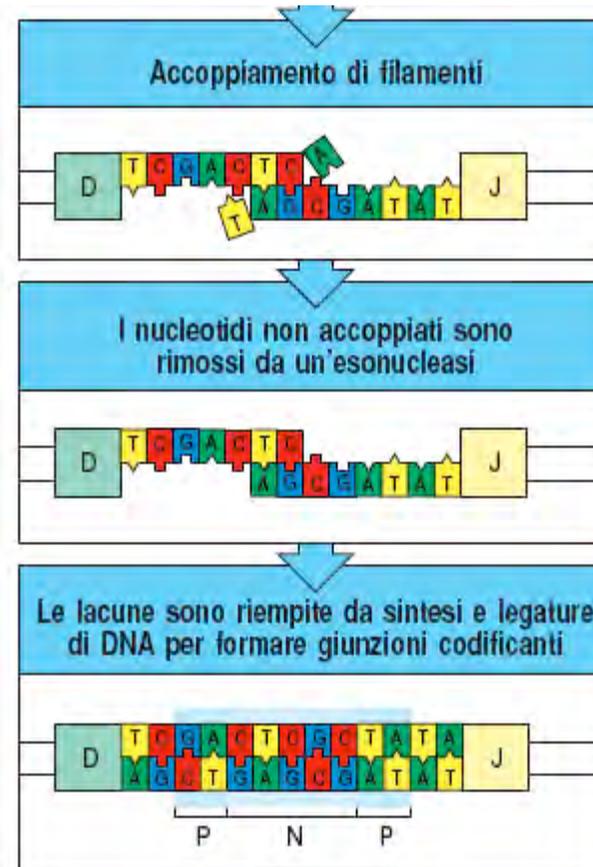
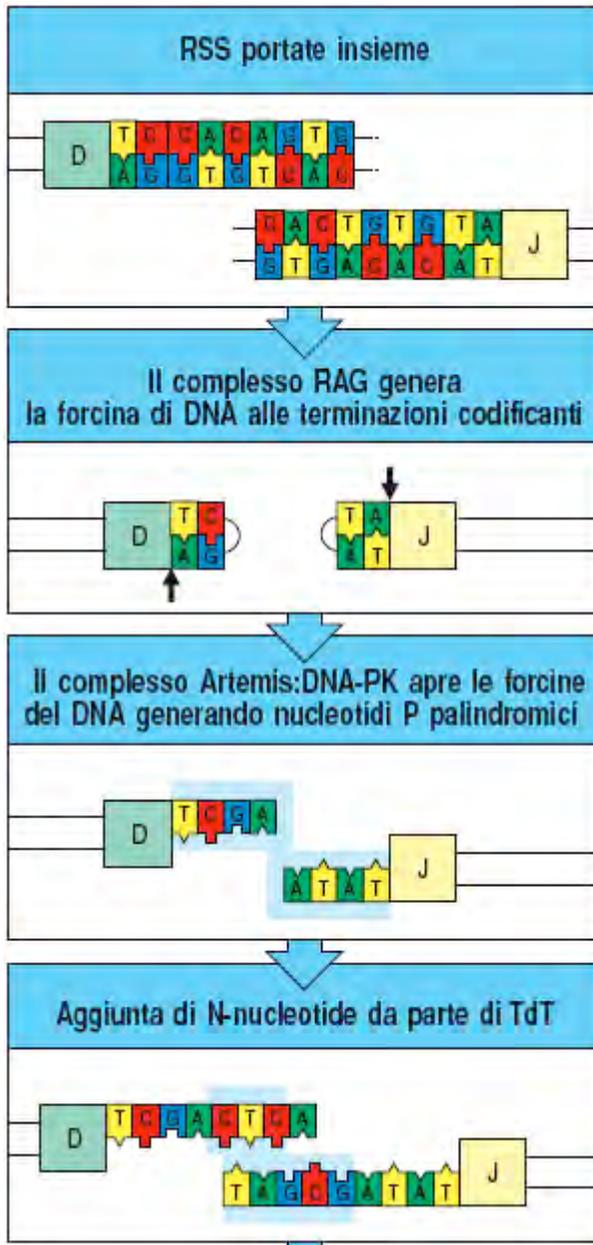
**Artemis la cui
inattivazione è
responsabile di RS-
SCID nell'uomo**

Meccanismi per determinare la diversità del repertorio

1. Diversità combinatoria (presenza di molti segmenti genici V, D, J nel DNA germinale)
2. Diversità giunzionale
3. Diversità nell'associazione tra la catena pesante e leggera
4. Ipermutazione somatica

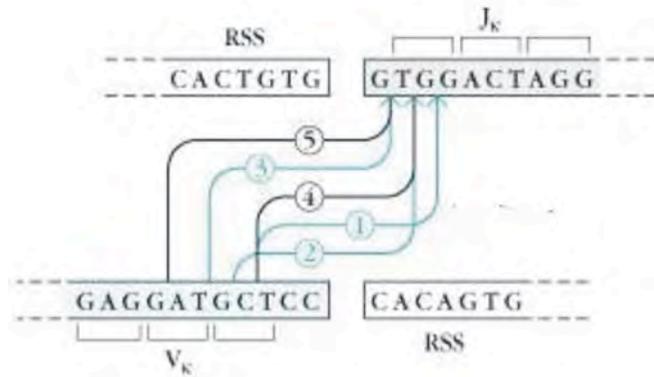
Prime fasi di maturazione, negli organi linfatici centrali

Organi linfatici periferici



Aggiunta dei nucleotidi N ad opera dell' enzima TdT (desossinucleotidil transferasi terminale)

Flessibilità giunzionale



Riarrangiamento produttivo

- ①

	Glu	Asp	Ala	Thr	Arg										

①	G	A	G	G	A	T	G	C	G	A	C	T	A	G	G
- ②

	Glu	Asp	Gly	Thr	Arg									

②	G	A	G	A	T	G	G	G	A	C	T	A	G	G
- ③

	Glu	Asp	Trp	Thr	Arg									

③	G	A	G	A	T	T	G	G	A	C	T	A	G	G
- ④

	Glu	Asp	Ala	Asp	Stop										

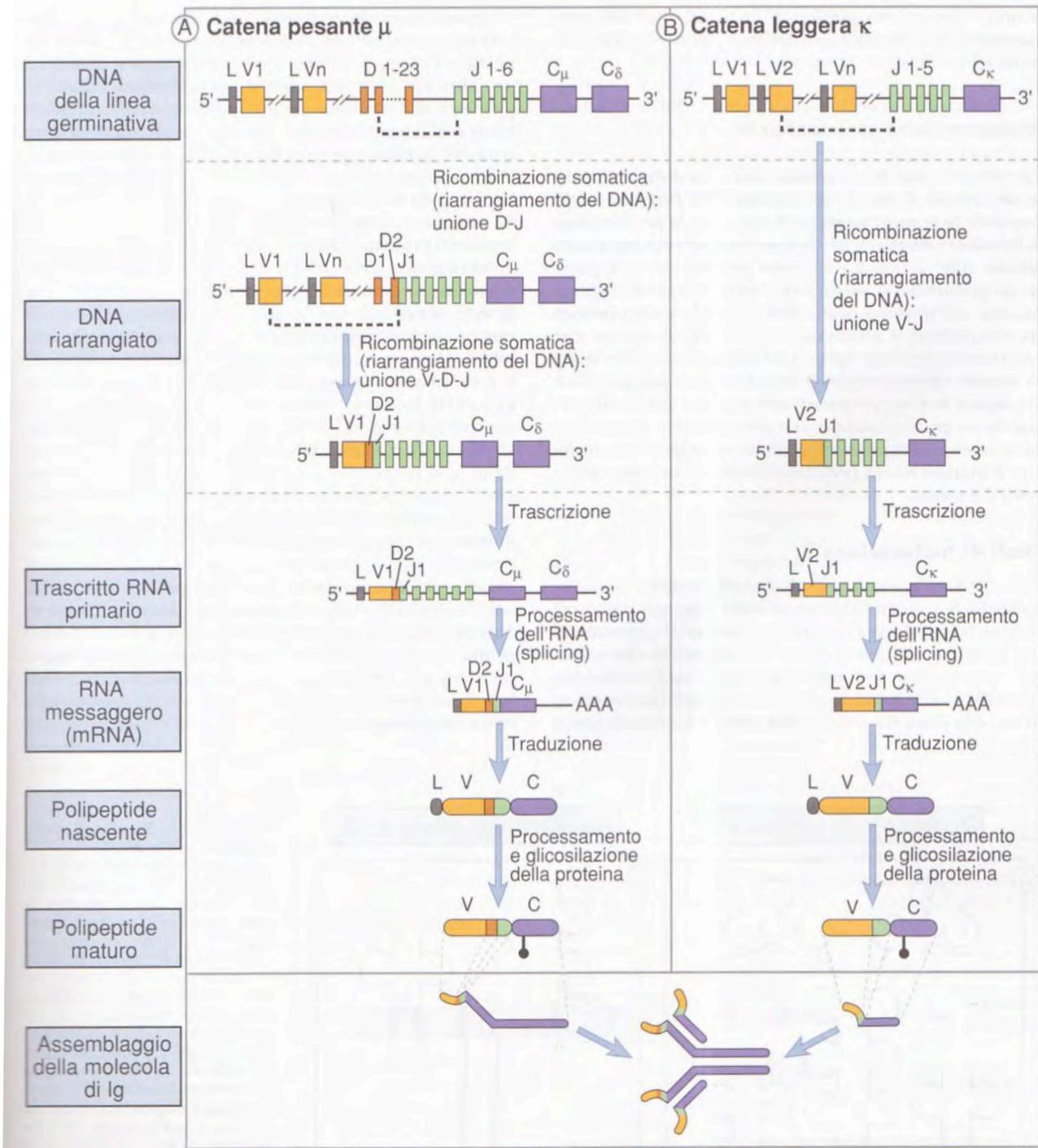
④	G	A	G	A	T	G	C	G	G	A	C	T	A	G	G
- ⑤

	Glu	Val	Asp	Stop									

⑤	G	A	G	G	T	G	G	A	C	T	A	G	G

Riarrangiamento non produttivo

Due su tre riarrangiamenti non sono produttivi



Meccanismi per determinare la diversità del repertorio

1. Diversità combinatoria (presenza di molti segmenti genici V, D, J nel DNA germinale)
2. Diversità giunzionale
3. Diversità nell'associazione tra la catena pesante e leggera
4. Ipermutazione somatica

Prime fasi di maturazione, negli organi linfatici centrali

Organi linfatici periferici

Fattori che contribuiscono alla generazione della diversità del repertorio anticorpale

	catene		
N° geni della linea germinale	H	κ	λ
V	40	40	30
D	25	0	0
J	6	5	4
Ricombinazione	40 x 25 x 6 = 6000	40 x 5 = 200	30 x 4 = 120
Associazione catene H e L	6000 x (200 + 120) = 1,9 x 10⁶		

Meccanismo comune a Ig e TCR:

Cellule B

Cellule T

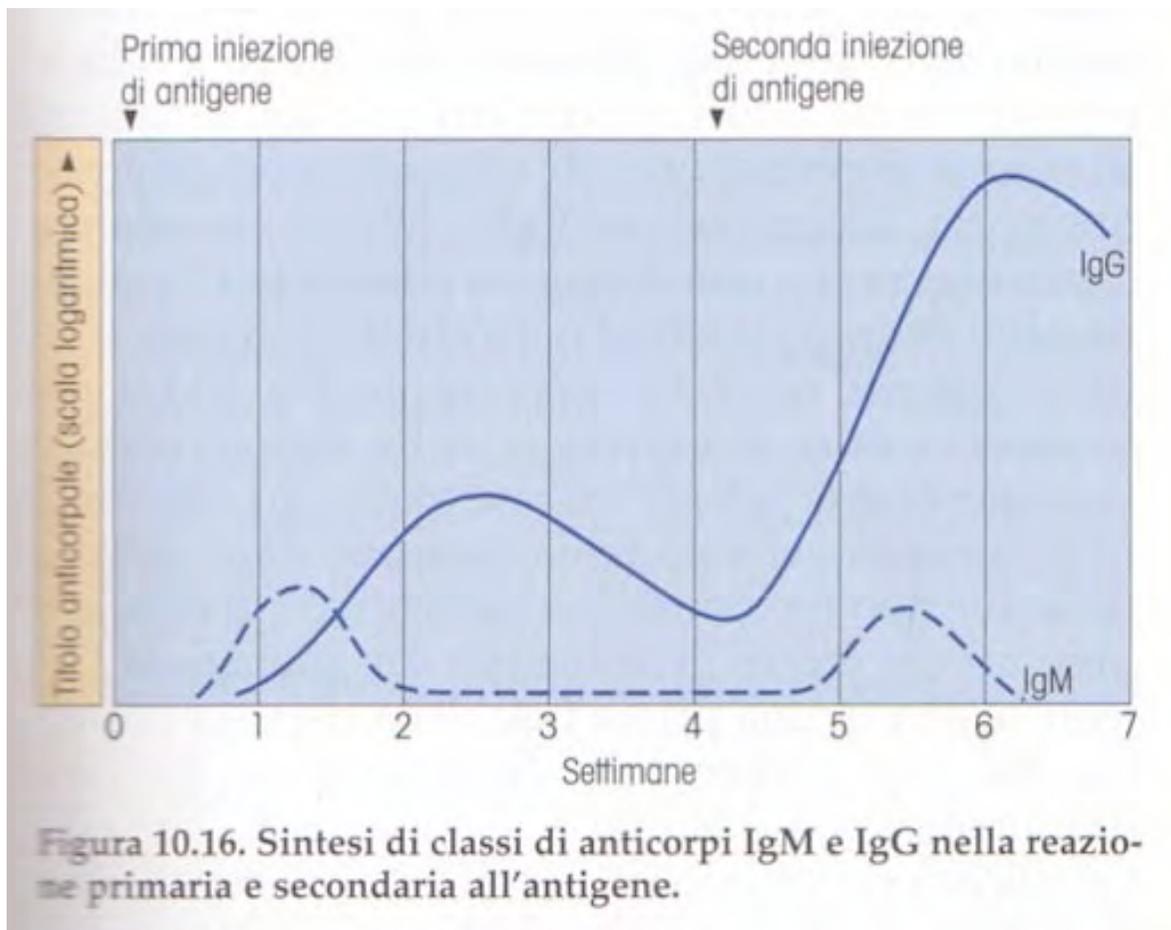
Elemento	Immunoglobulina		Recettore α - β	
	H	$\kappa + \lambda$	β	α
Segmenti variabili (V)	40	70	52	~70
Segmenti di diversità (D)	25	0	2	0
Segmenti D letti in 3 cornici	raramente	—	spesso	—
Segmenti di giunzione (J)	6	5 (κ) 4 (λ)	13	61
Aggiunta di nucleotidi N e P	2	50% delle giunzioni	2	1
Numero di coppie di geni V	$1,9 \times 10^6$		$5,8 \times 10^6$	
Variabilità di giunzione	$\sim 3 \times 10^7$		$\sim 2 \times 10^{11}$	
Diversità totale	5×10^{13}		$\sim 10^{18}$	

Meccanismi per determinare la diversità del repertorio

1. Diversità combinatoria (**presenza di molti segmenti genici V, D, J nel DNA germinale**)
2. Diversità giunzionale
3. Diversità nell'**associazione tra la catena pesante e leggera**
4. Ipermutazione somatica

Prime fasi di maturazione, negli organi linfatici centrali

Organi linfatici periferici



Le mutazioni somatiche aumentano con il numero di immunizzazione

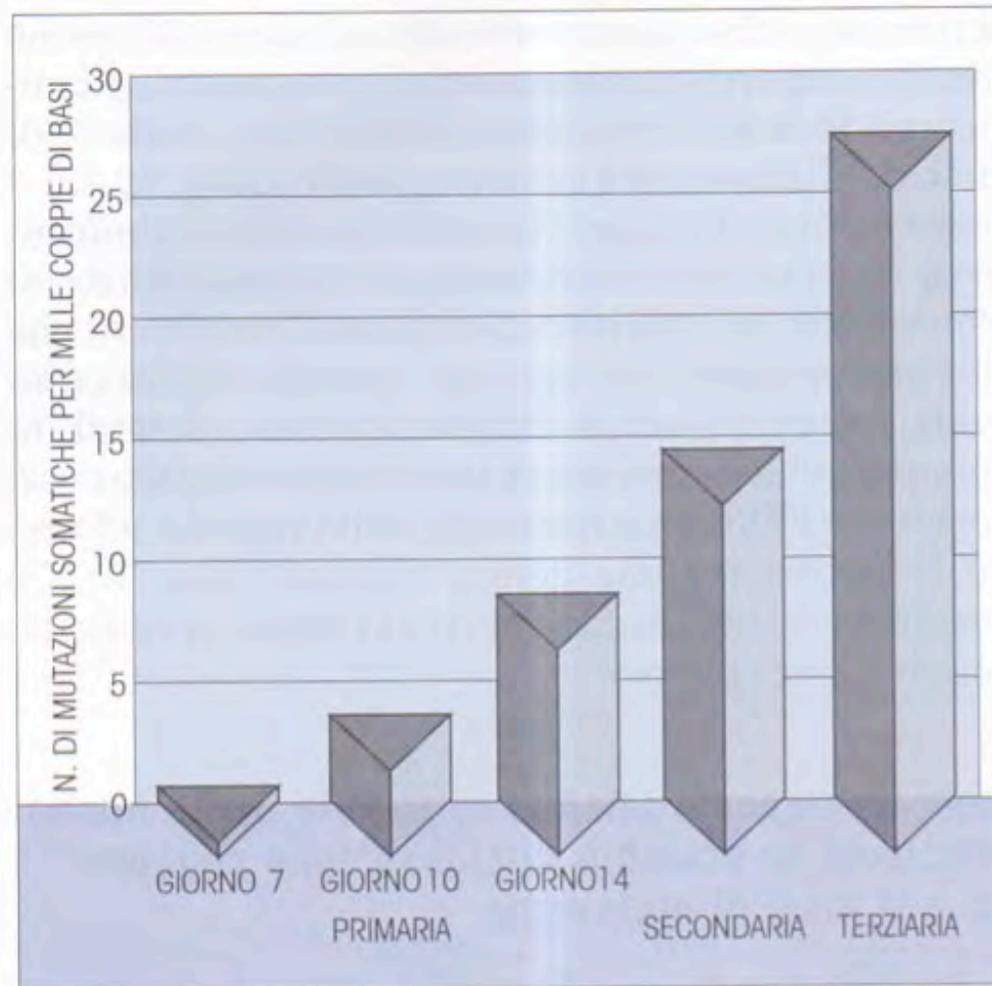
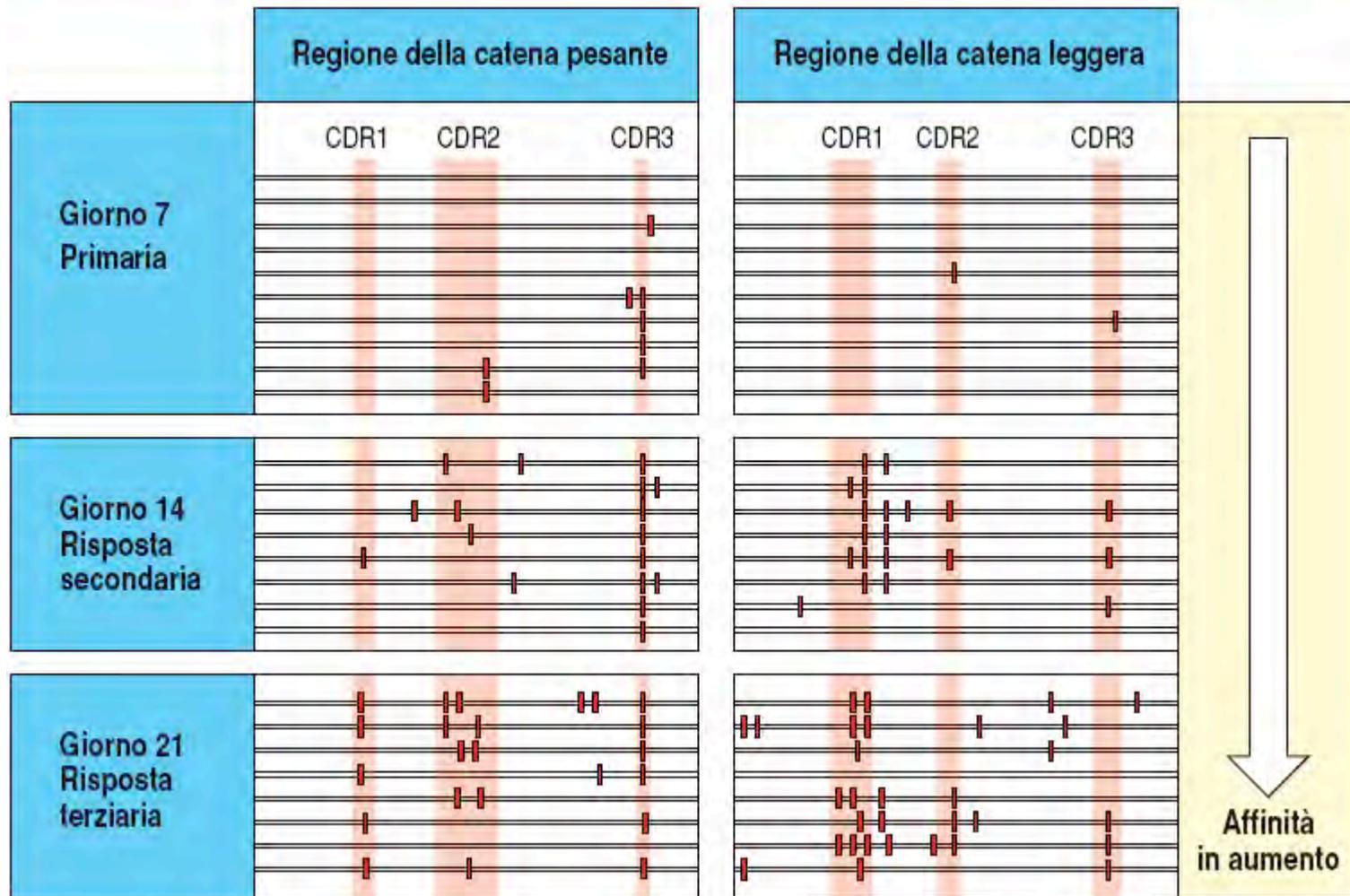
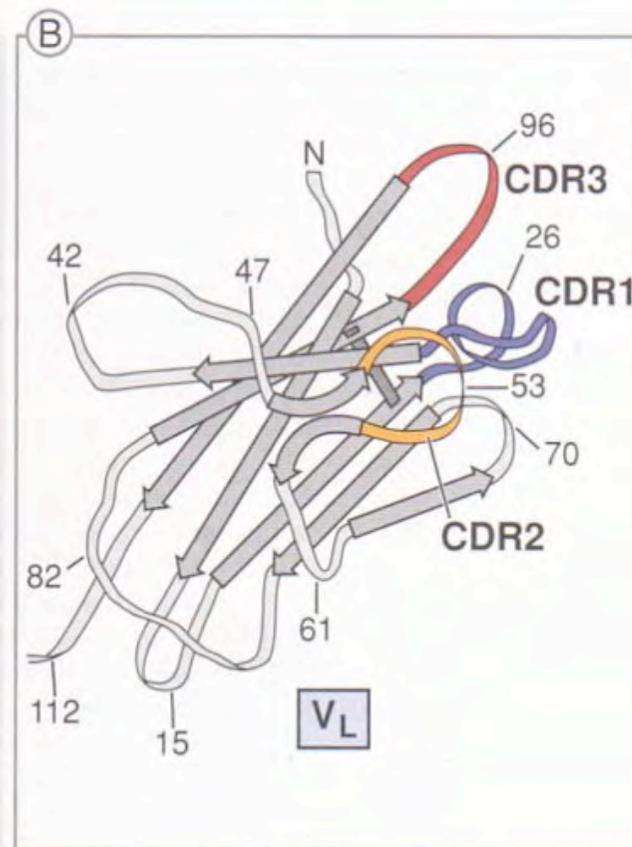
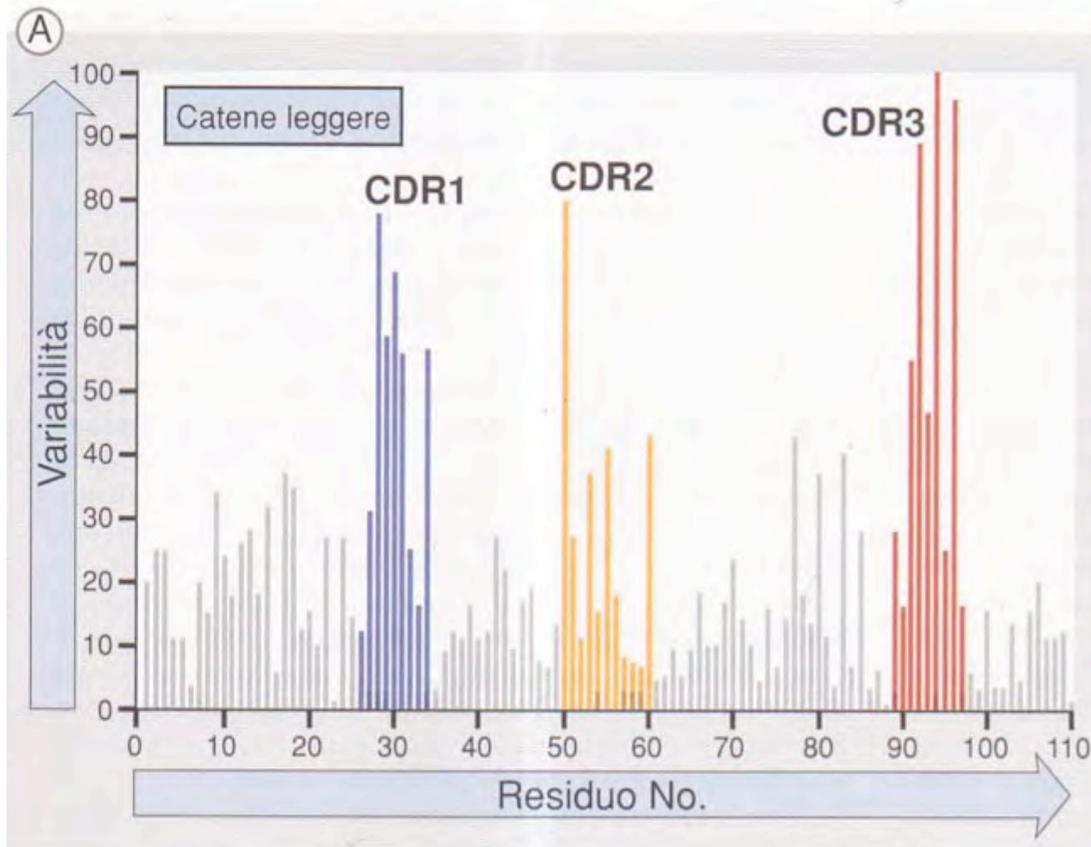


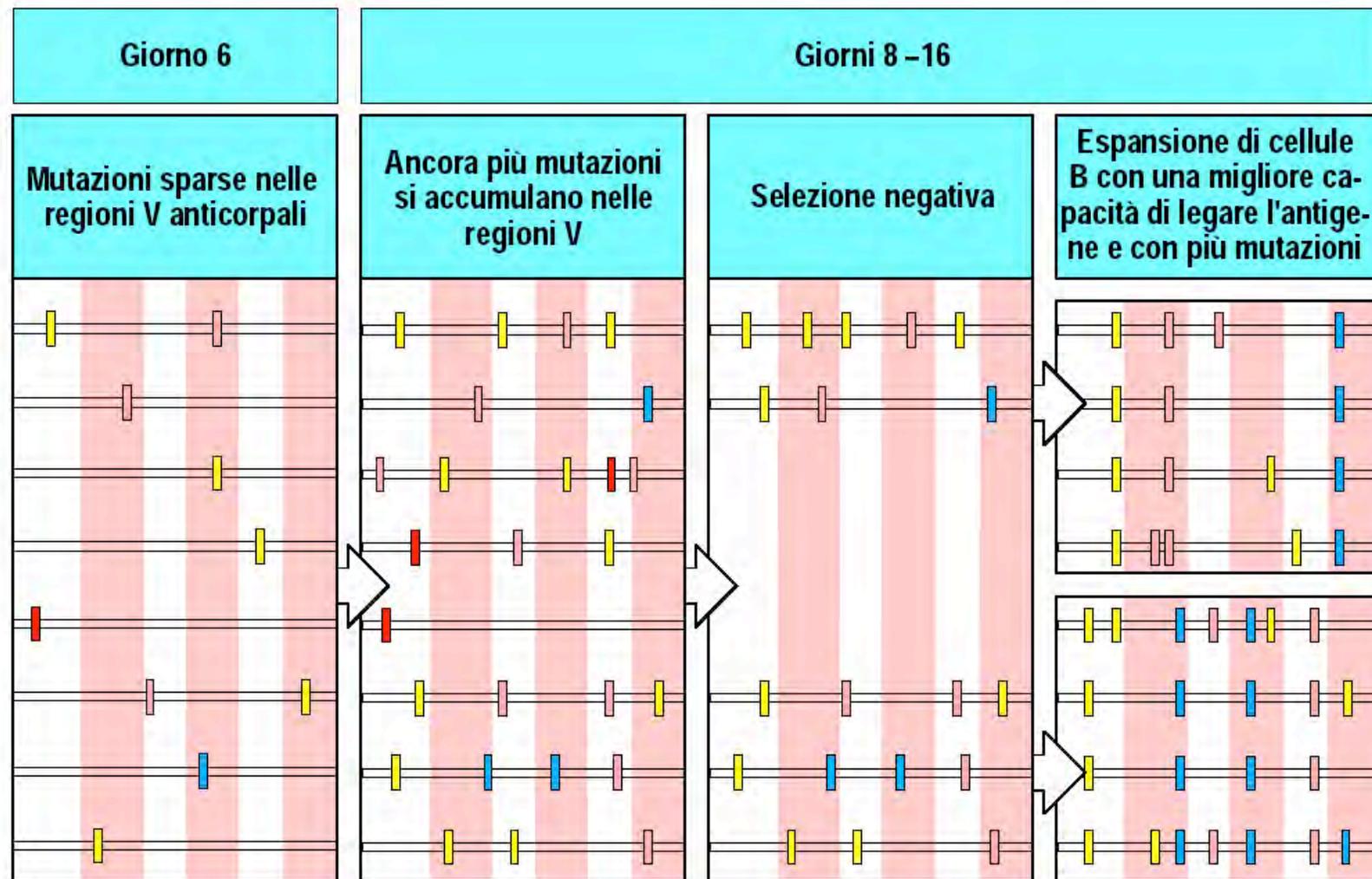
Figura 10.18. Mutazioni somatiche in aumento nelle strutture immunodominanti della linea germinale anticorpale osservate in ibridomi isolati in seguito a ripetute immunizzazioni con feniloxazolone. (Dati presi da Berek C. & Apel M. (1989). In Melchers F. *et al.* (eds) *Progress in Immunology* 7,99. Springer-Verlag, Berlin).

L'ipermutazione somatica = diversificazione nella regione variabile
riarrangiata = aumento specificità



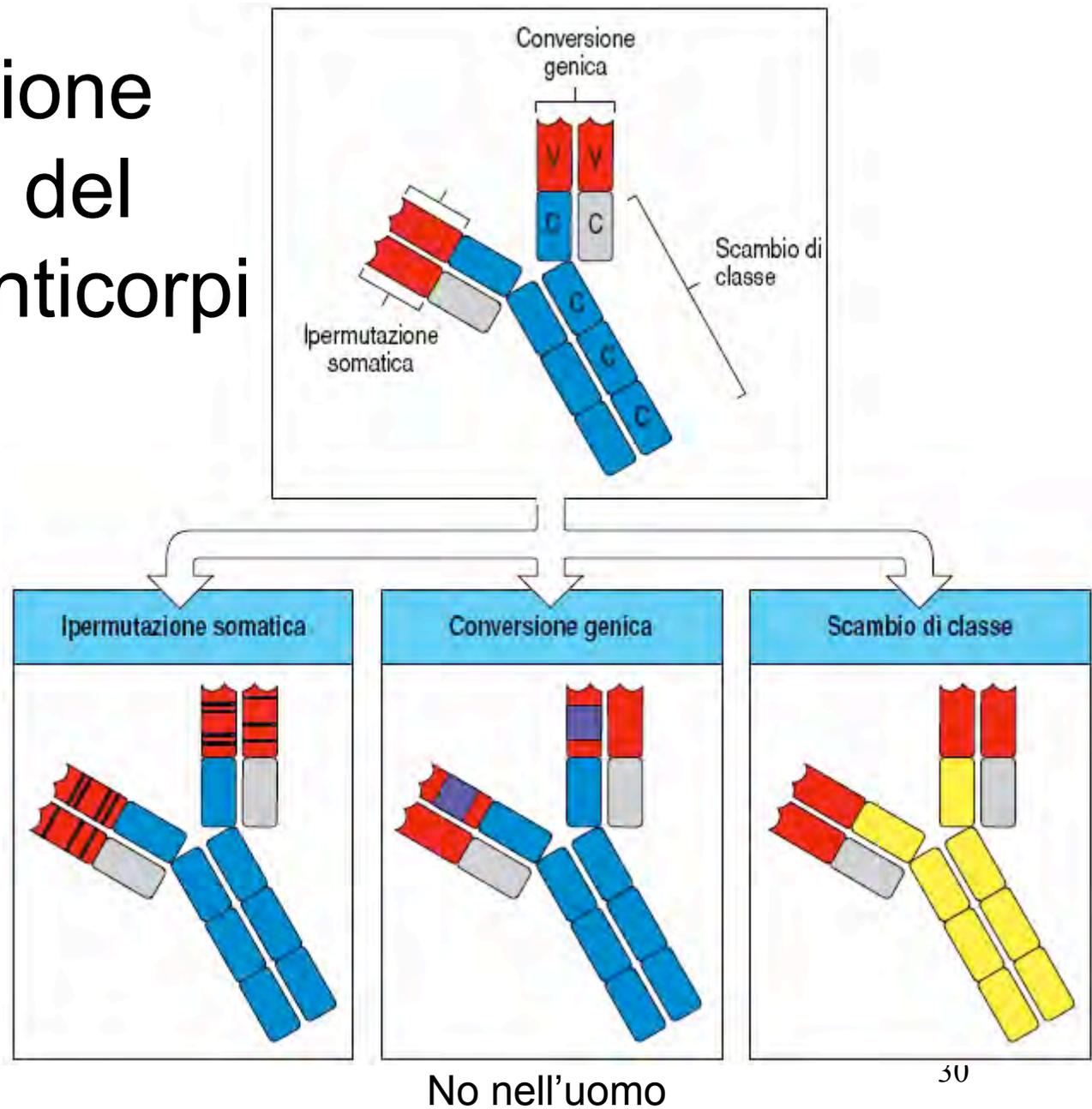


Le cellule B che producono Ac con affinità maggiore per l'Ag dopo ipermutazione somatica sono selezionate positivamente

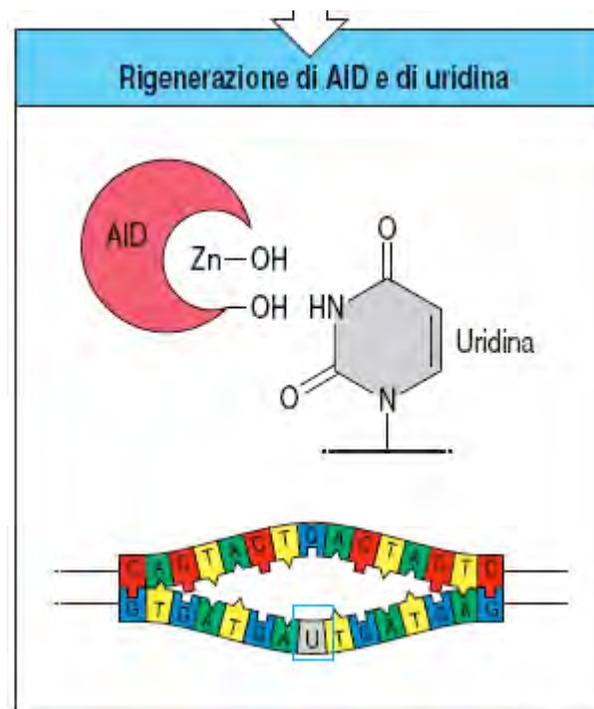
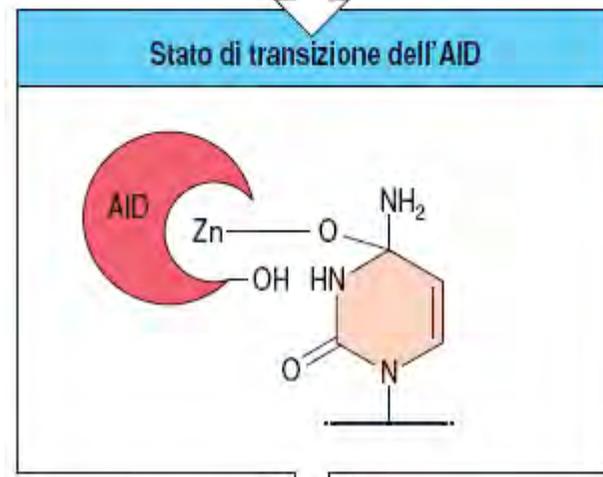
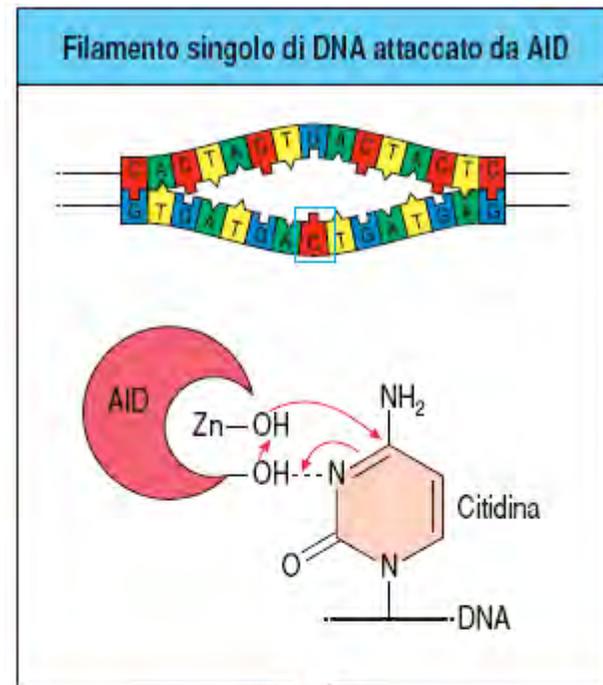


Mancanza di Citidina Deaminasi Indotta dall'Attivazione (AID) blocca l'accumulo di mutazioni somatiche

Diversificazione secondaria del repertorio di anticorpi



Ruolo della citidina deaminasi indotta dall'attivazione (AID)

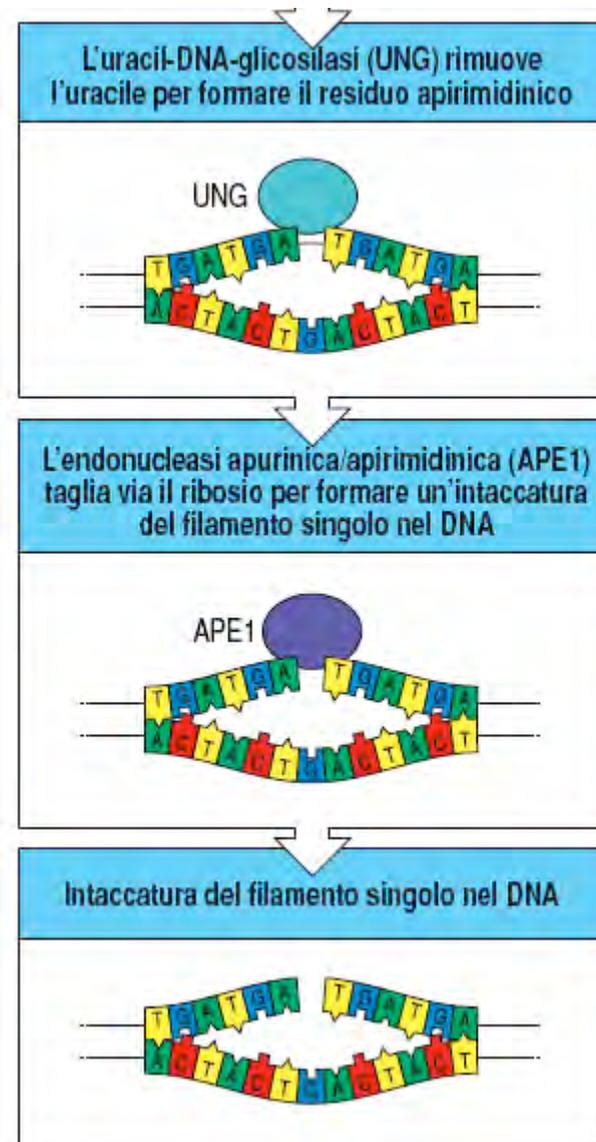
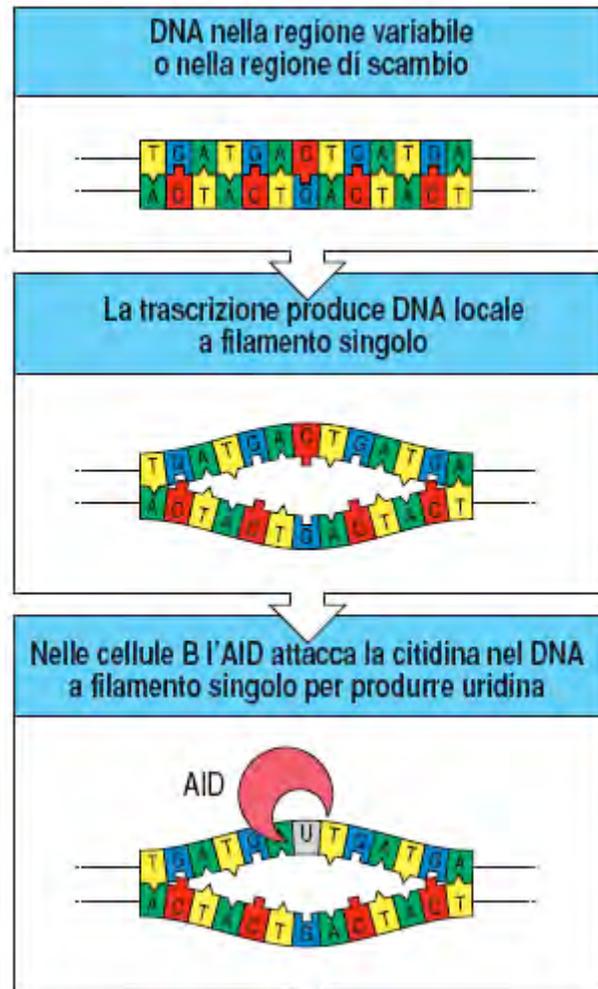


Deaminazione
del nucleoside:
citosina in
uracile

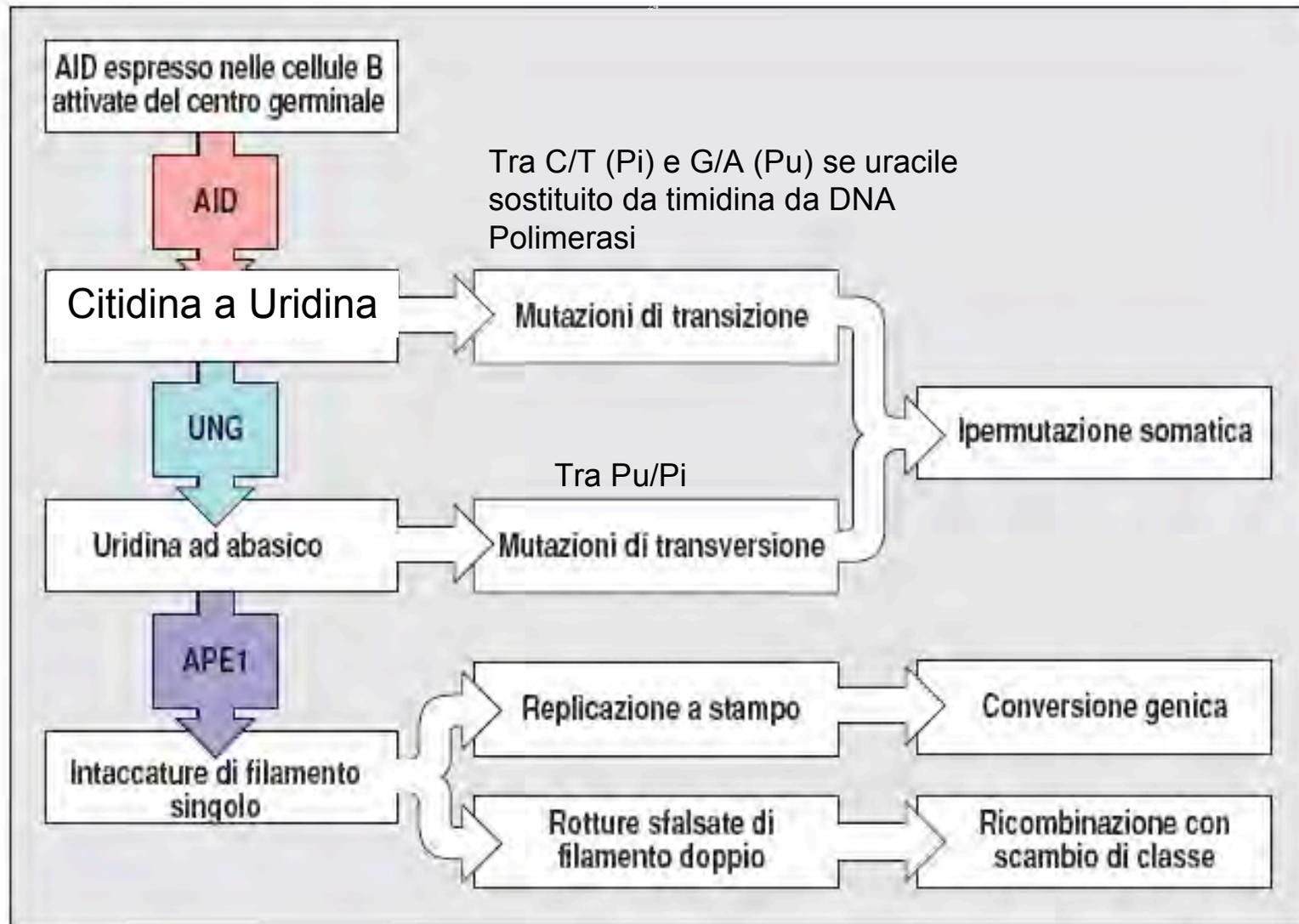
Mancanza di AID blocca completamente l'ipermutazione somatica e lo scambio isotipico ed è associato a immunodeficienza: **sindrome da iper IgM di tipo 2.**

Nucleotide = nucleoside (base azotata + zucchero)
+ fosfato

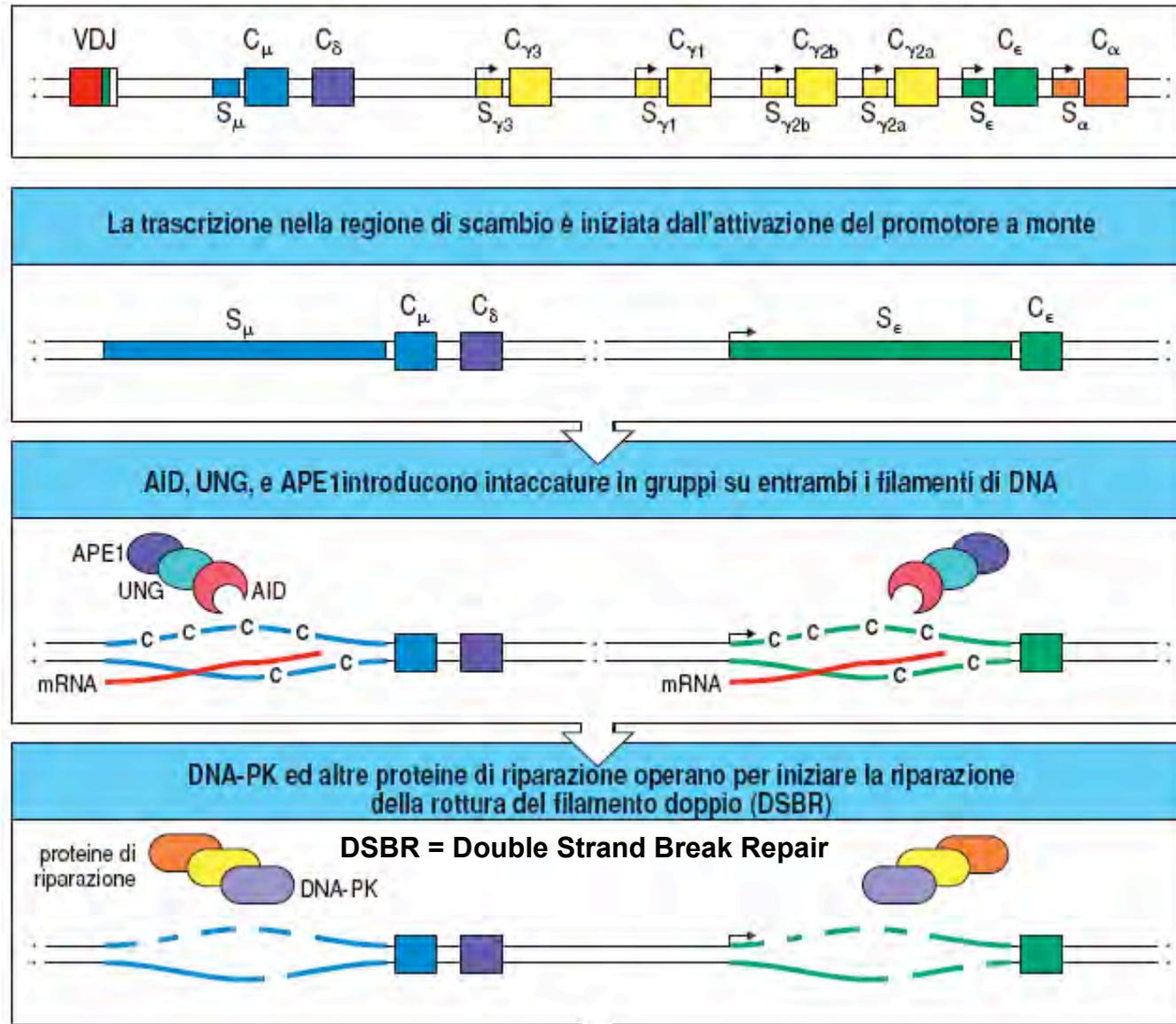
AID introduce mutazioni nei geni trascritti nelle cellule B

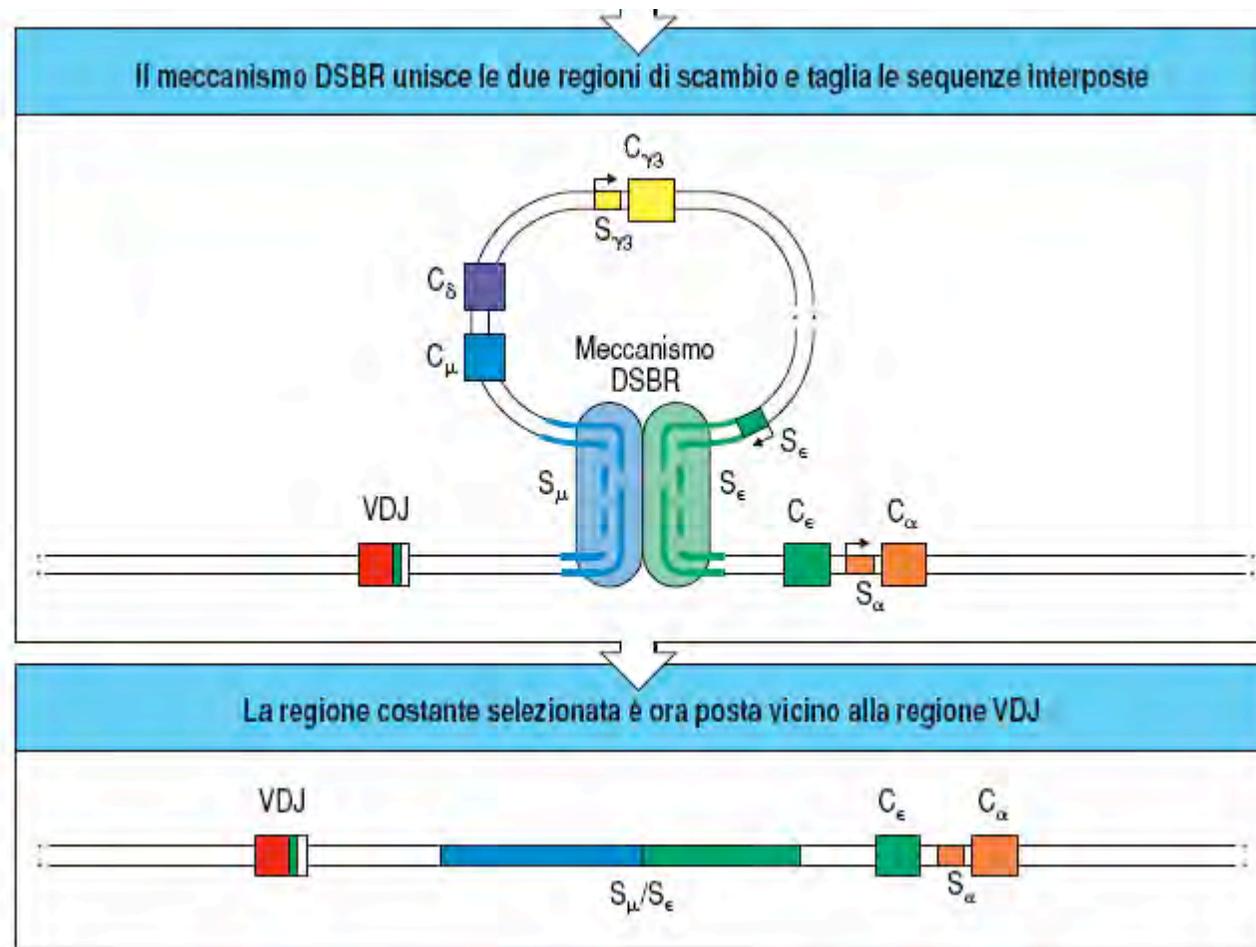


AID introduce mutazioni nei geni trascritti nelle cellule B



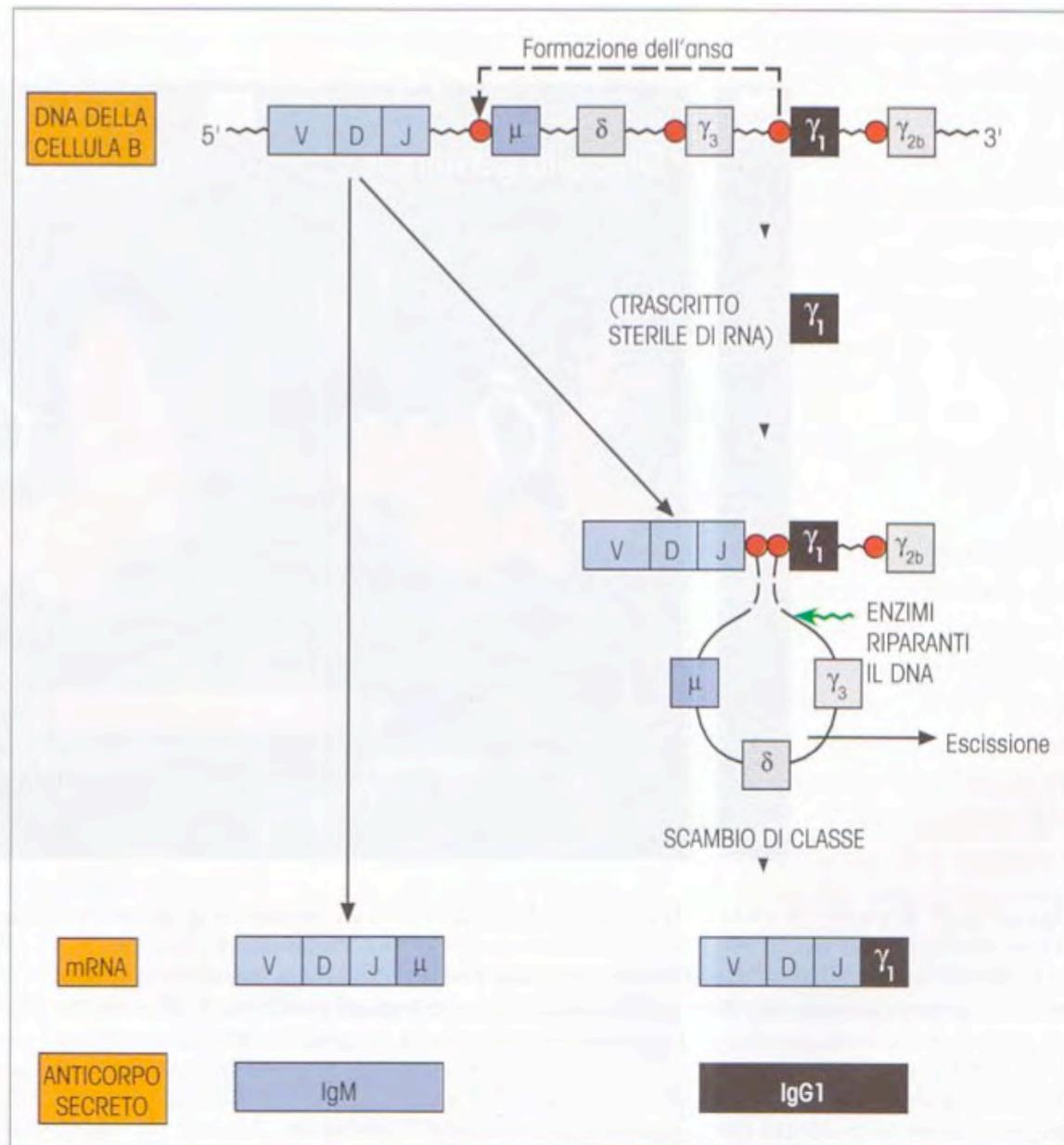
Meccanismo dell'isotype switch = (S)cambio di classe





Cambio di classe: generazione di Ac con la stessa
specificità antigenica ma **funzioni effettrici diverse**

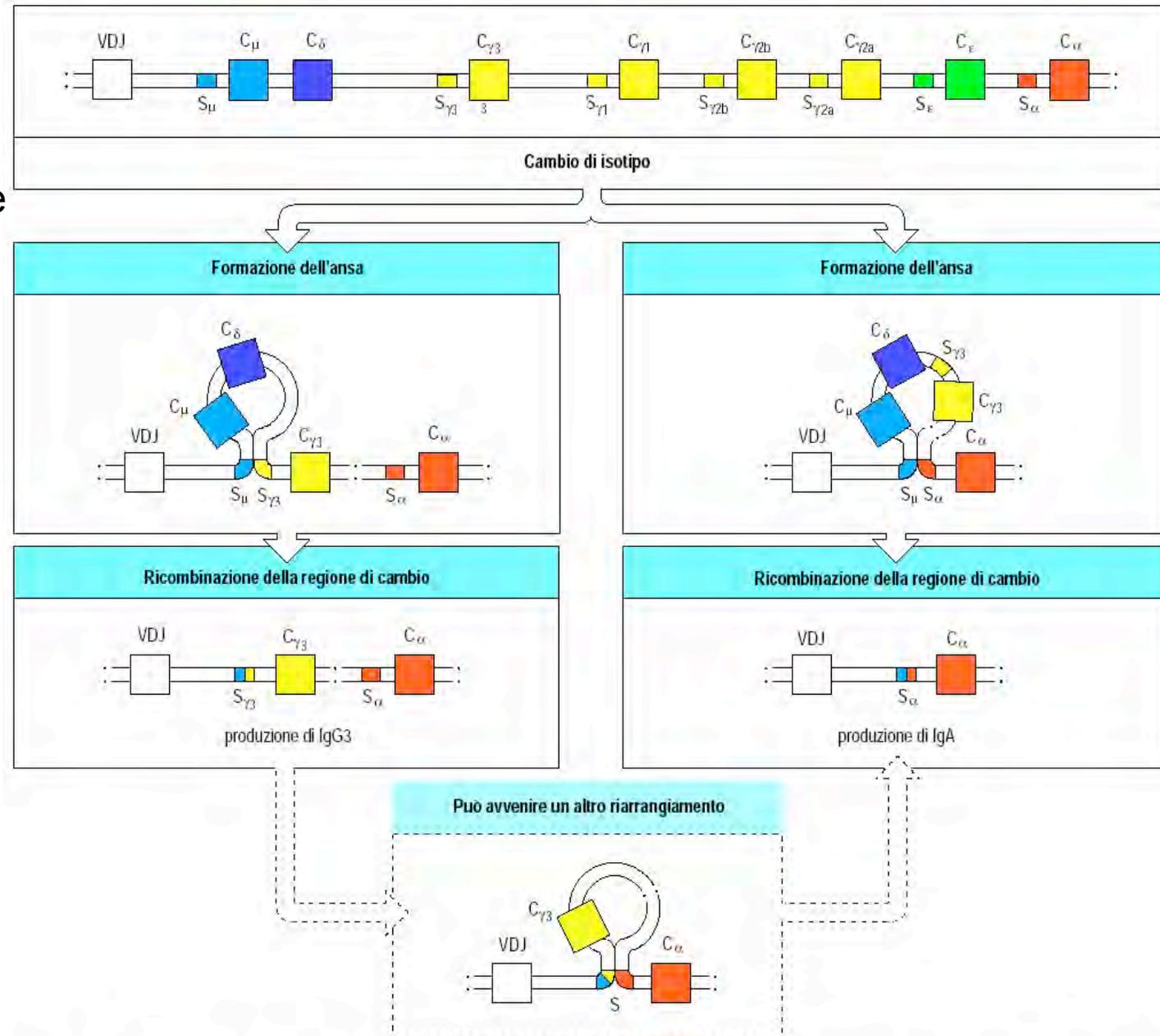
Isotype switch = (S)cambio di isotipo = Generazione di Ac con la stessa **specificità antigenica** ma **funzioni effettrici diverse**



Isotype switch = (S)cambio di isotipo

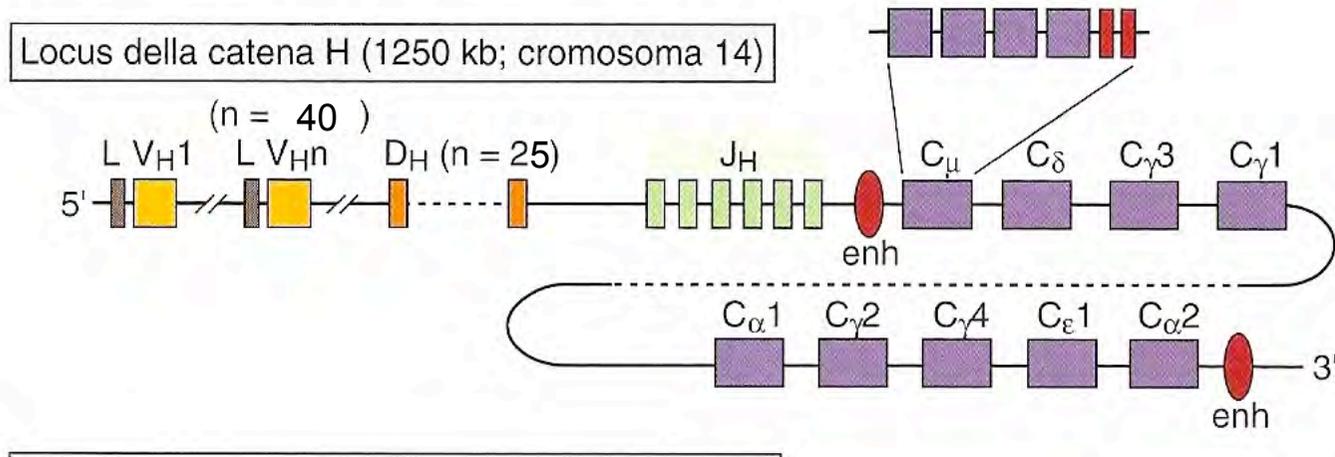
Locus murino

Recombinazione tra sequenze S

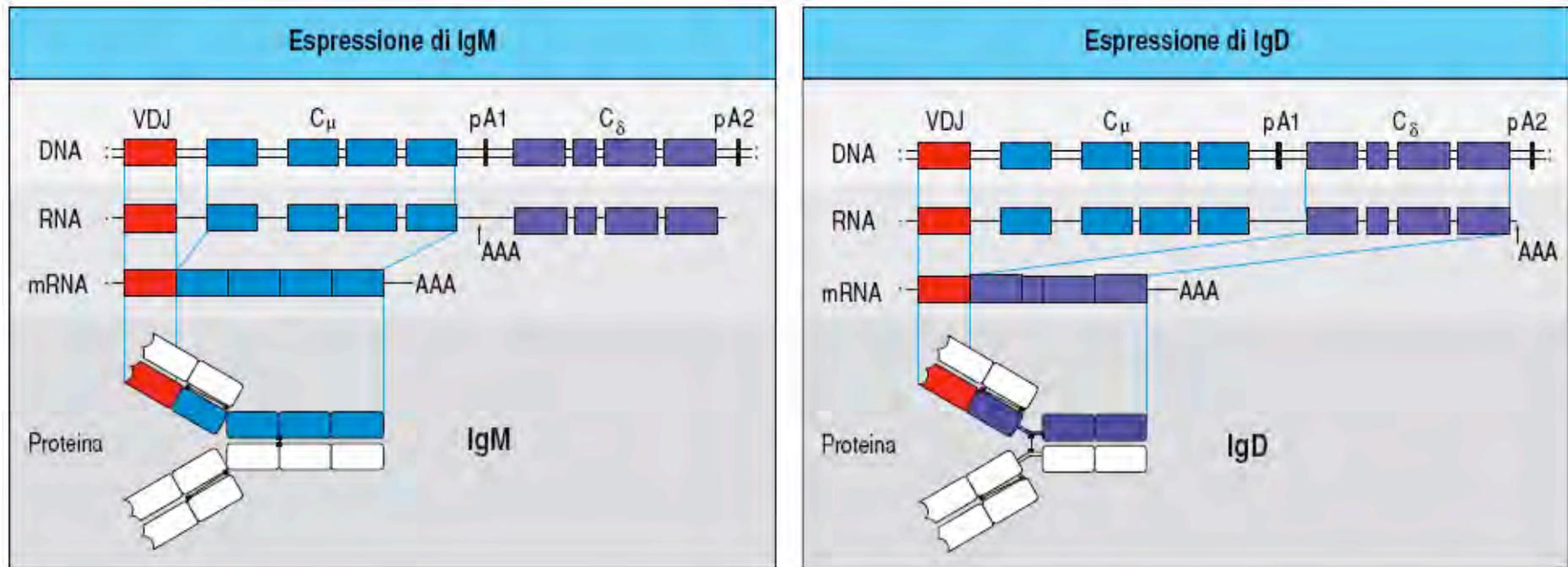


Variazioni strutturali delle regioni costanti

Prima Ig sintetizzata durante maturazione linfociti B = IgM

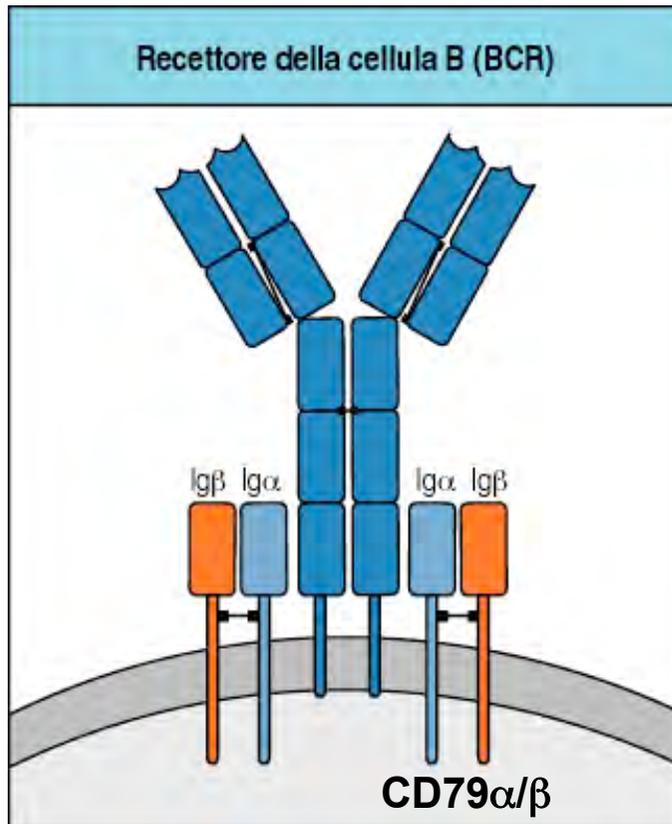


Co-espressione di IgM ed IgD

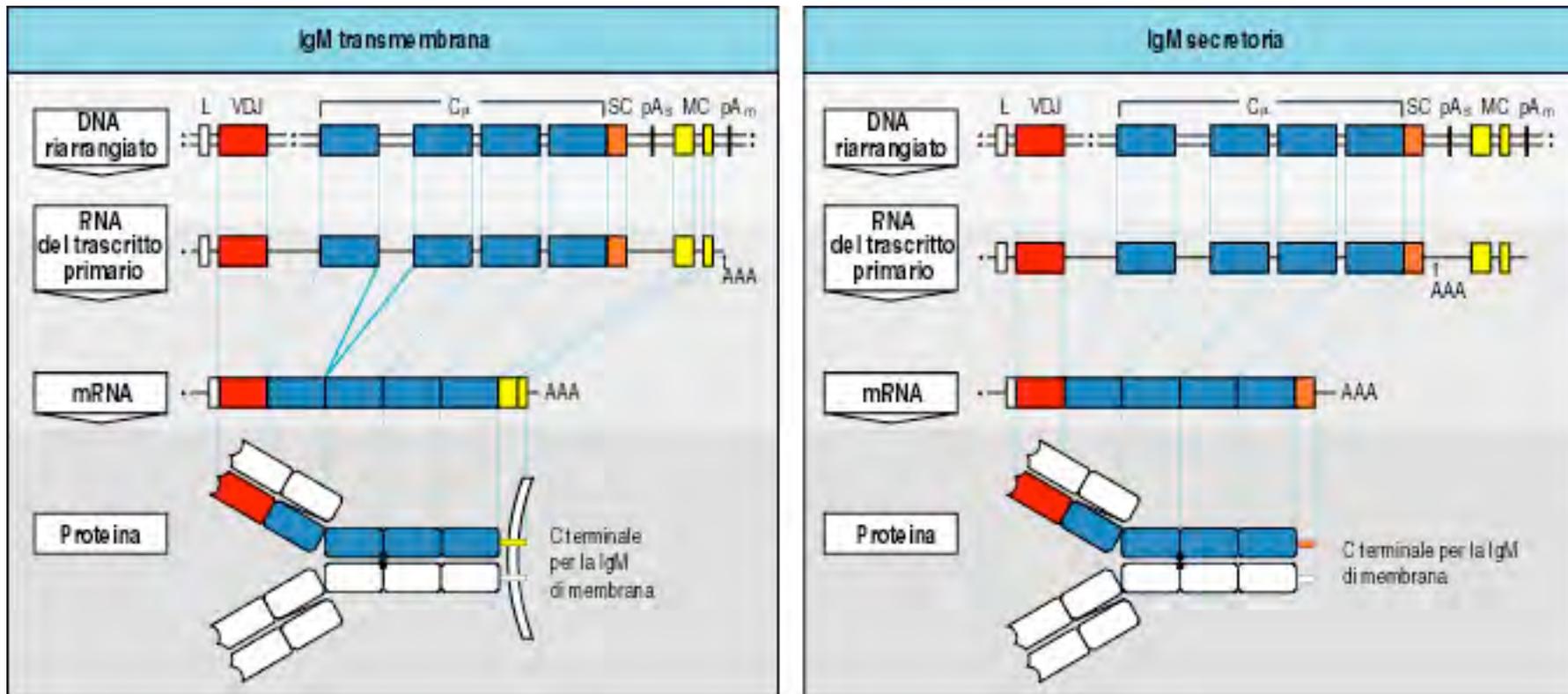


Controllo della co-espressione a livello del RNA

Immunoglobulina di membrana



Ig di membrana e secretoria



Utilizzo degli esoni MC (membrane coding) o SC (secretion coding) per splicing alternativo del RNA

Modificazioni dei geni dei linfociti: Ig per le cellule B, TCR per le cellule T

Evento	Processo	Natura del cambiamento	Il processo avviene nelle	
			cellule B	cellule T
Assemblaggio della regione V	Ricombinazione somatica del DNA	Irreversibile	Si	Si
Diversificazione della giunzione	Giunzione imprecisa, inserimento di sequenze N nel DNA	Irreversibile	Si	Si
Attivazione della trascrizione	Attivazione del promotore per vicinanza all'enhancer	Irreversibile ma regolato	Si	Si
Cambio di classe per ricombinazione	Ricombinazione somatica del DNA	Irreversibile	Si	No
Ipermutazione somatica	Mutazioni puntiformi sul DNA	Irreversibile	Si	No
Espressione di IgM e IgD di superficie	Splicing alternativo del RNA	Reversibile, regolato	Si	No
Forma di membrana vs forma secreta	Splicing alternativo del RNA	Reversibile, regolato	Si	No