Células e moléculas que reconhecem antígenos: ontogenia das células B.

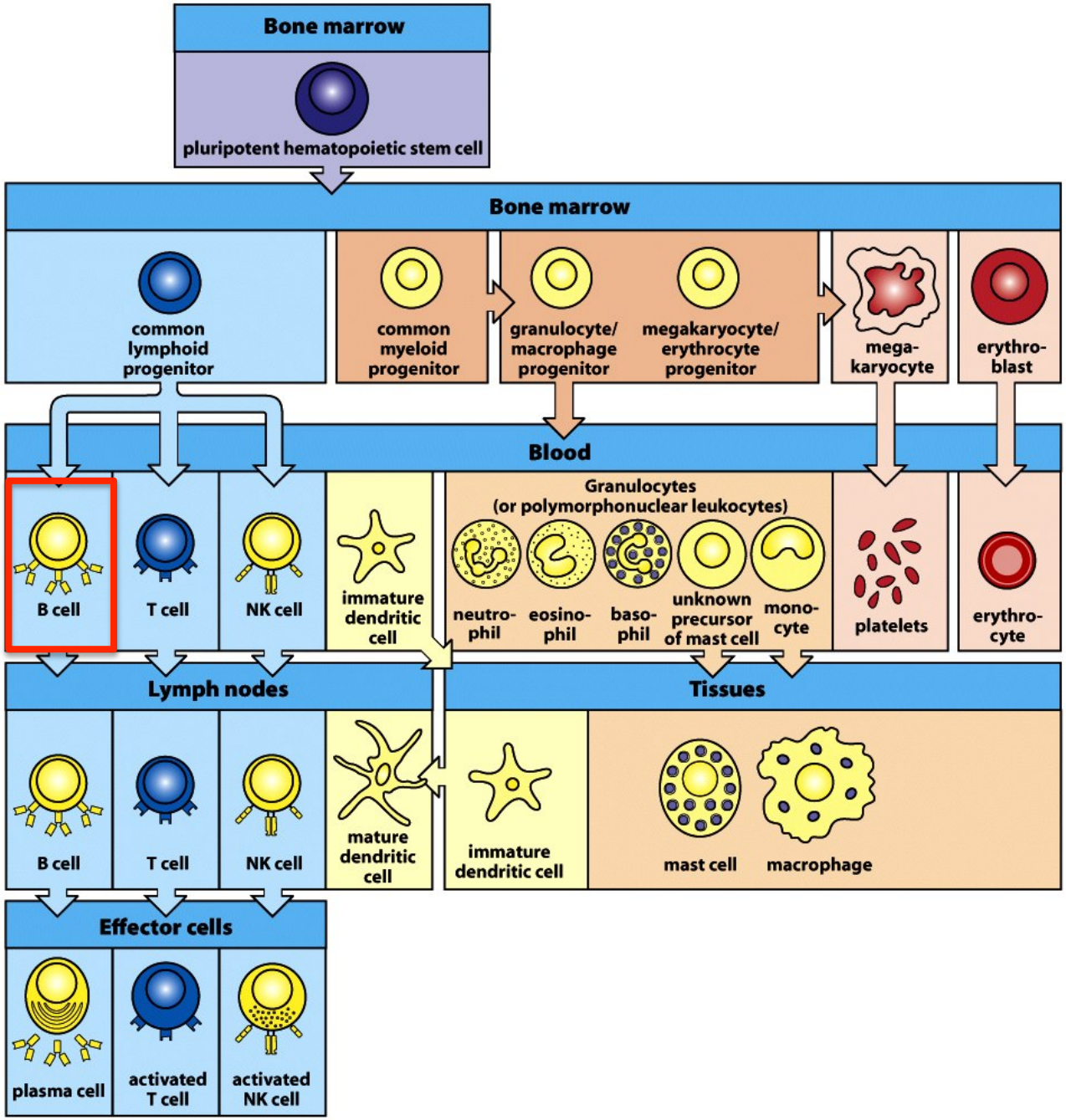


Figure 1-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

1. Estrutura dos anticorpos;
2. Ligação antígeno-anticorpo;
3. Recombinação somática;
4. Desenvolvimento de linfócitos B.

Anticorpos (ou imunoglobulinas) são moléculas produzidas pelas células B que reconhecem antígenos.

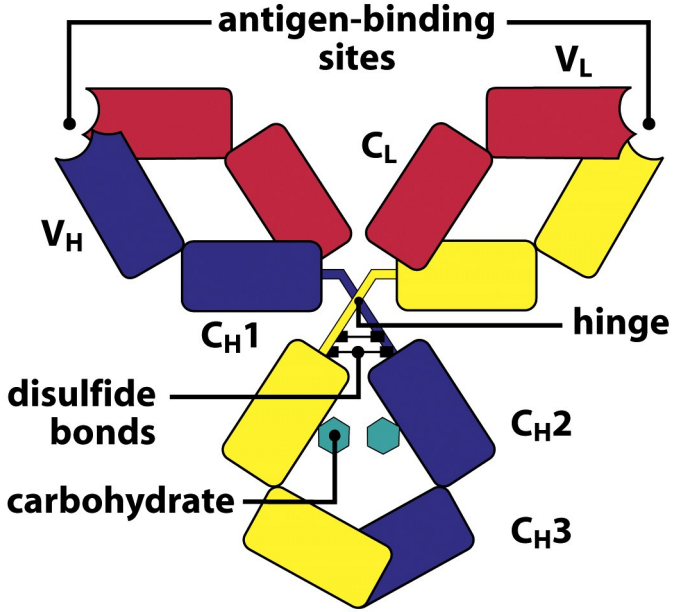


Figure 3-1b Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

- ✓ tem forma semelhante a um Y.
- ✓ tem 2 funções distintas:
  - ligar-se a moléculas do patógeno.
  - recrutar outras células e/ou moléculas para destruir o patógeno.
  - ✓ cada função é executada por uma parte distinta da molécula.

Características gerais dos anticorpos.

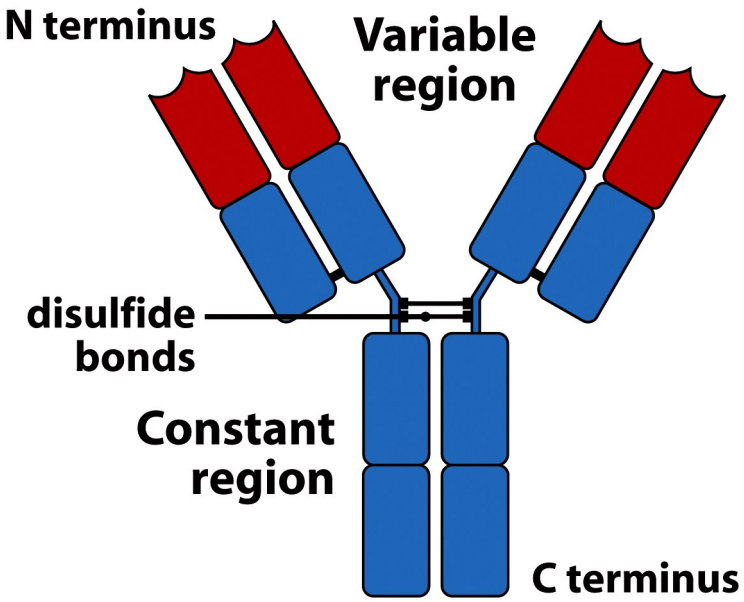


Figure 3-1c Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ Cada anticorpo possui uma porção variável e uma porção constante.

✓ Porção variável: varia entre um anticorpo e outro. É a região de ligação ao antígeno.

✓ Porção constante: é bem menos variável. É a região que interage com as células e moléculas efetoras.

- há 5 diferentes classes de anticorpos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE que podem ser distinguidas pela sua região constante.

Características gerais dos anticorpos.

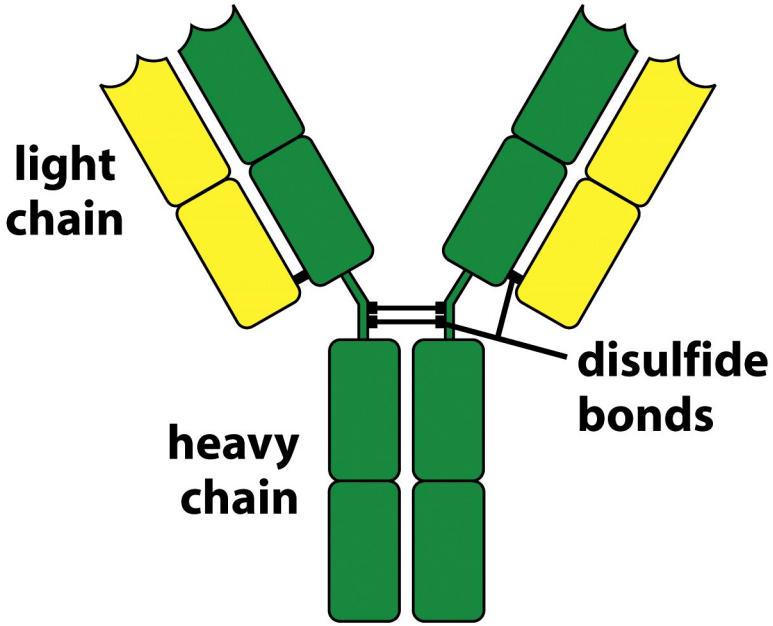


Figure 3-2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ IgGs são moléculas grandes com cerca de 150kDa.

- ✓ 50kDa: cadeia pesada (H).
- ✓ 25kDa: cadeia leve (L).
- ✓ cada molécula de IgG consiste de 2 cadeias H e duas L.

✓ pontes dissulfeto ligam as duas cadeias H e cada uma delas a uma cadeia L.

✓ as duas cadeias H e as duas cadeias L são idênticas e podem ligar-se <u>simultaneamente</u> a duas estruturas idênticas.

✓ há dois tipos de cadeias leves: λ e κ.

✓ as cadeias pesadas são conhecidas por μ, δ, γ, α e ε.

A molécula de anticorpo pode ser clivada em fragmentos funcionalmente distintos.

✓ Fab: "fragment antigen binding".

✓ Fc: "fragment crystallizable".

✓scFV: single chain fragment variable.



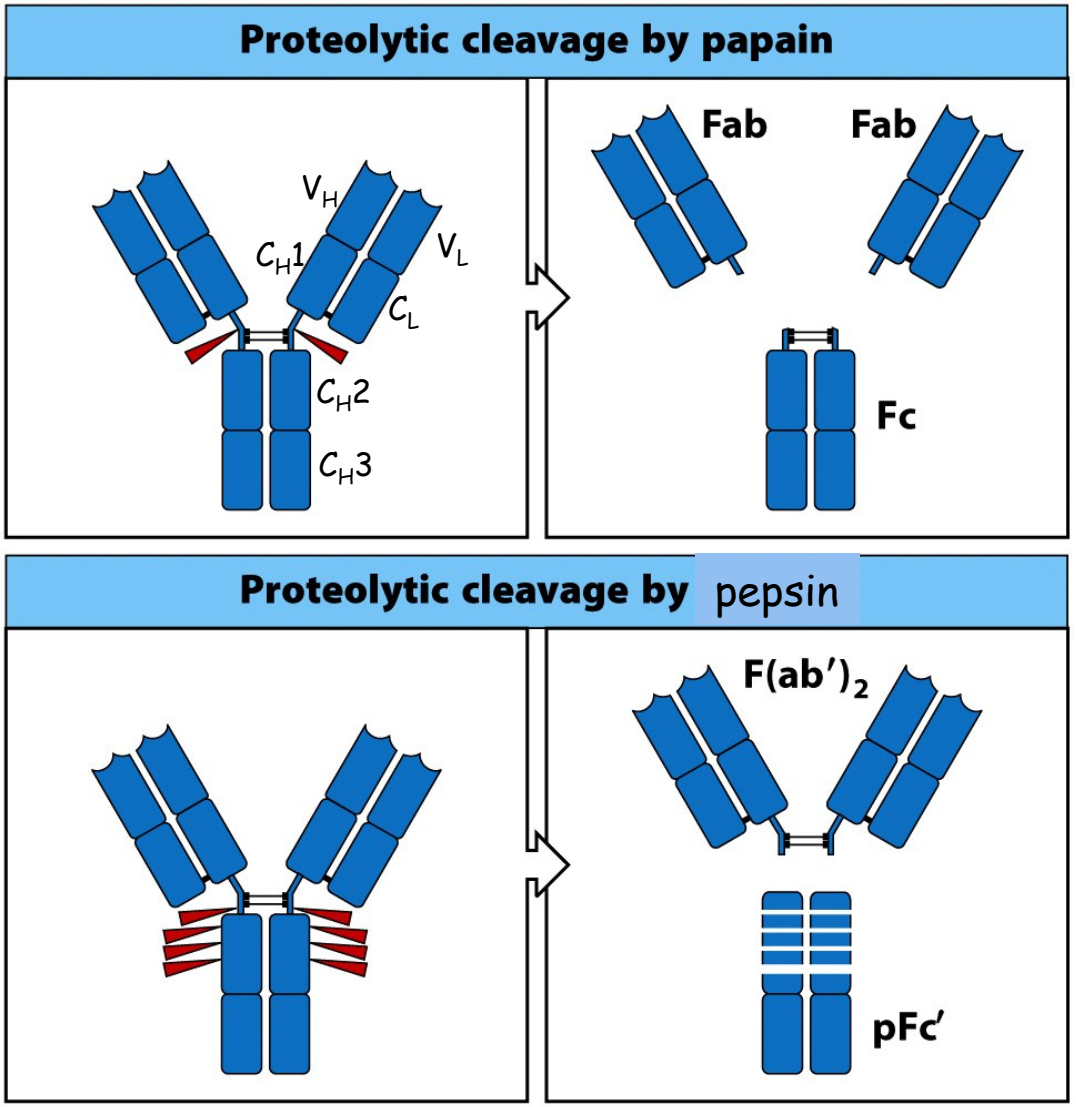
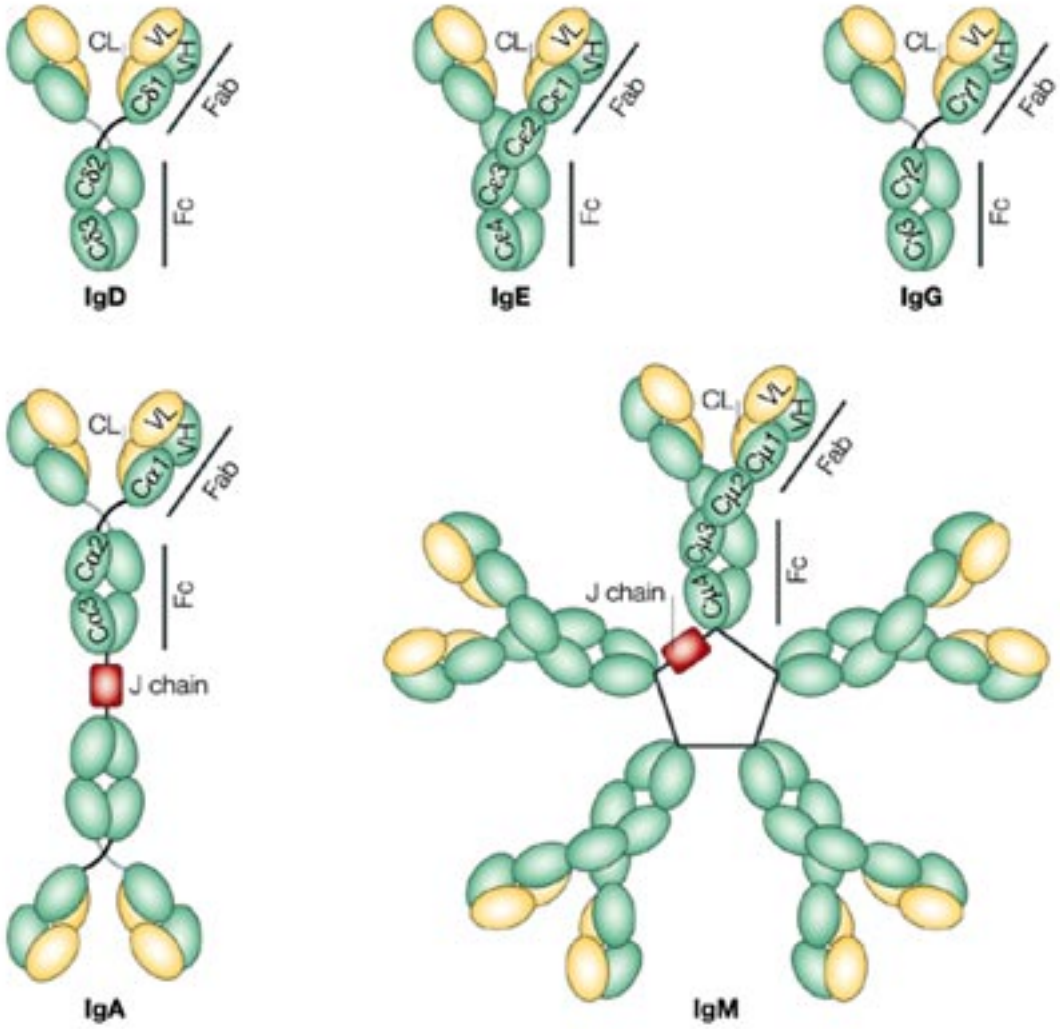


Figure 3-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Diferentes classes de imunoglobulinas são distinguidas pela estrutura das porções constantes de suas cadeias pesadas.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

✓Os anticorpos da classe IgG e IgA são ainda subdivididos em subclasses:

- IgG1.
- IgG2.
- IgG3.
- IgG4.

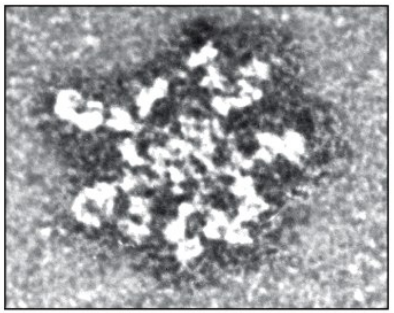
- IgA1.
- IgA2.

IgM e IgA podem formar multímeros.

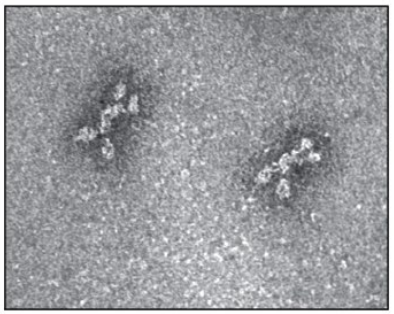
✓ As cadeias pesadas da IgM e da IgA possuem uma "cauda"com 18 aminoácidos contendo cisteínas que são ligadas pela cadeia J (um polipeptídeo de 15kDa).

✓ IgM pentaméricas no sangue.

✓ IgA dimérica nas secreções mucosas e monomérica no sangue.



✓ Avidez: força total de ligação.



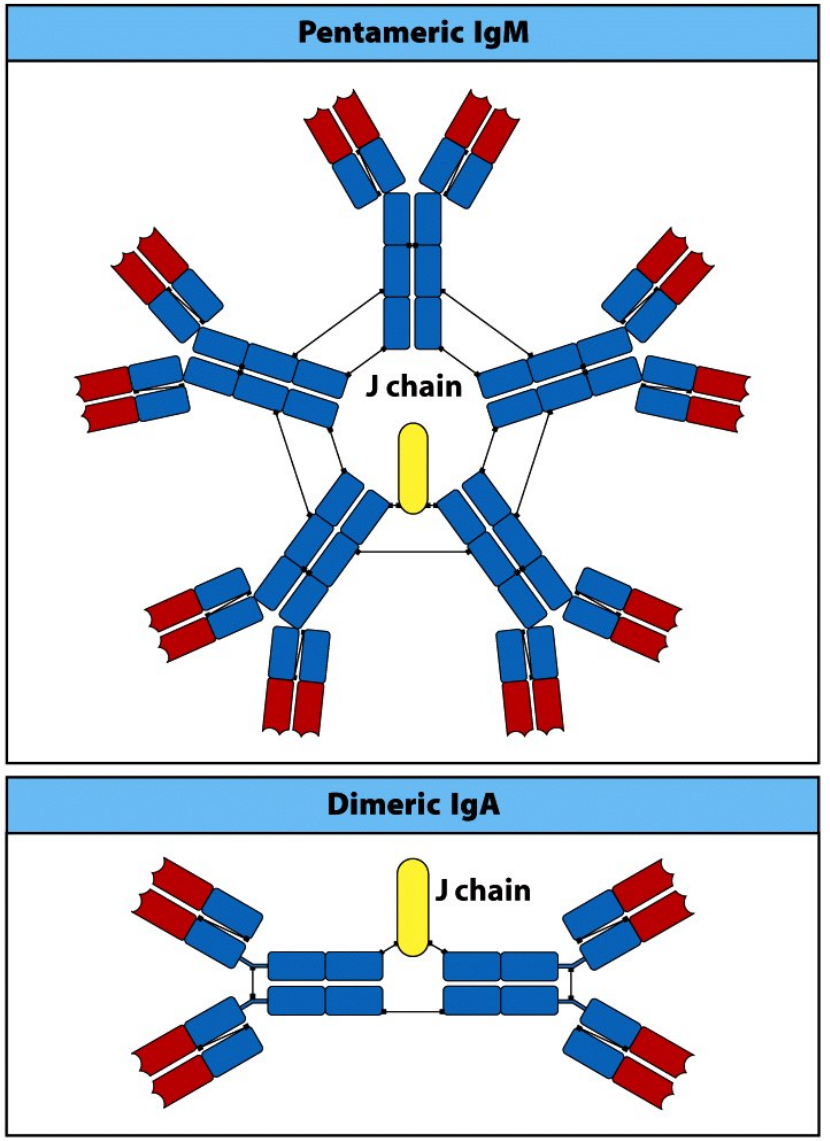


Figure 4-20 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

É a porção constante que confere especialização funcional ao anticorpo

✓ As porções Fc possuem três funções efetoras principais:

1. Opsonização de patógenos.

- As porções Fc de alguns anticorpos são capazes de ligar-se a receptores Fc presentes em macrófagos e neutrófilos. IgG1 e IgG3 principalmente.

- Fc da IgE liga-se a seu receptors (Fcε) em mastócitos, basófilos e eosinófilos ativados.

2. Lise por complemento (via clássica).

3. A porção Fc pode mediar o transporte ativo de anticorpos para as mucosas, lágrimas e leite (IgA), por ex.

As propriedades dos isotipos de imunoglobulinas humanos.

	Immunoglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Heavy chain	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Molecular weight (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serum level (mean adult mg ml^{-1})	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
Half-life in serum (days)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Classical pathway of complement activation	++	+	+++	−	++++	−	−	−	−
Alternative pathway of complement activation	−	−	−	−	−	+	−	−	−
Placental transfer	+++	+	++	−/+	−	−	−	−	−
Binding to macrophage and phagocyte Fc receptors	+	−	+	−/+	−	+	+	−	+
High-affinity binding to mast cells and basophils	−	−	−	−	−	−	−	−	+++
Reactivity with staphylococcal Protein A	+	+	−/+	+	−	−	−	−	−

Figure 4-16 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

A estrutura dos domínios constante e variável das imunoglobulinas.

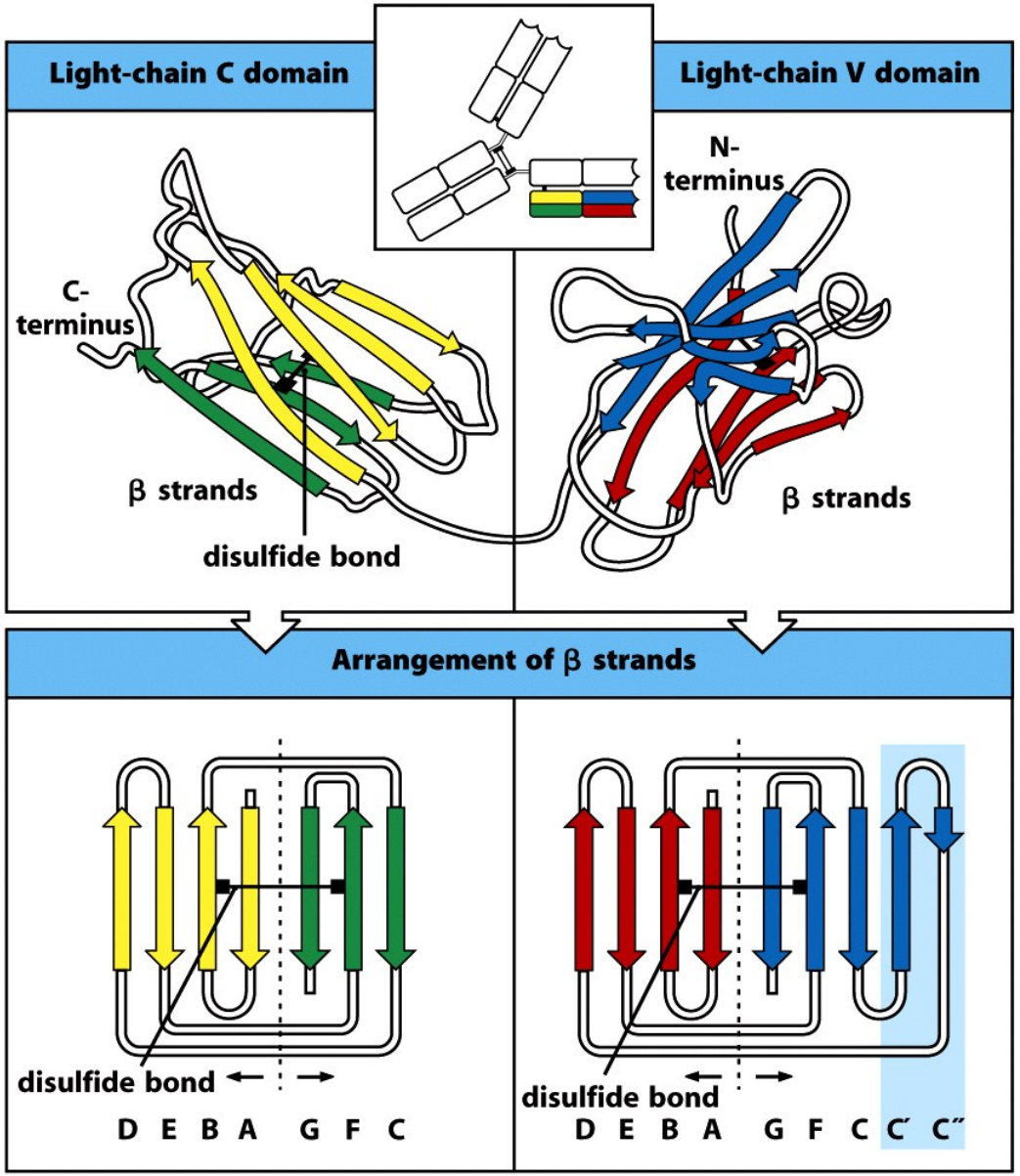


Figure 3-5 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Interação da molécula do anticorpo com o antígeno específico.

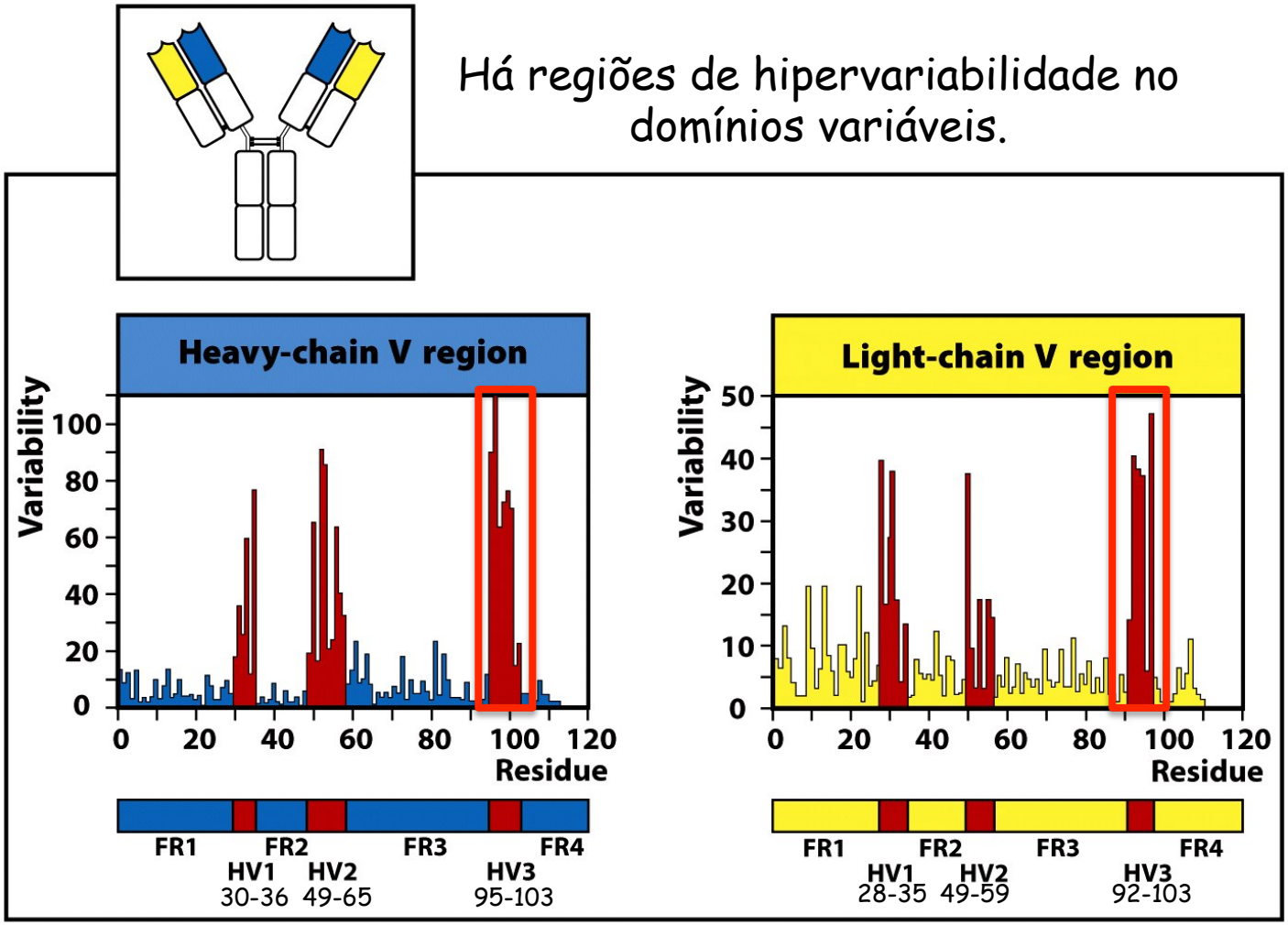


Figure 3-6 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

HV: hypervariable regions
FR: framework regions

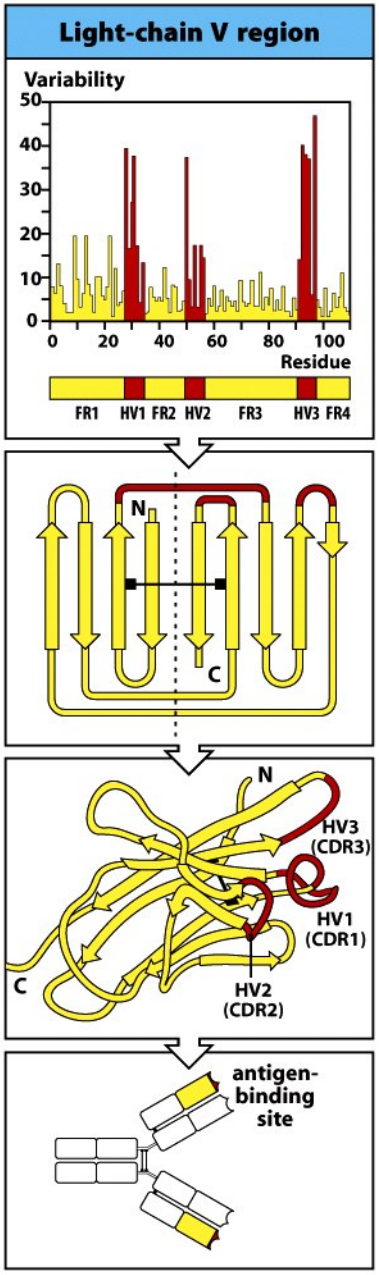


Figure 3-7 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

As regiões hipervariáveis localizam-se nos "loops" da estrutura.

✓ É nesses "loops" que está localizado o sítio de ligação do antígeno.

✓ Os seis "loops" hipervariáveis determinam a especificidade ao antígeno pois formam uma superfície complementar ao mesmo.

✓ Estas regiões são mais conhecidas por regiões determinantes de complementaridade ("complementarity-determining regions" ou CDRs).

✓ É a combinação dos CDRs nas cadeias pesada e leve que determina a especificidade ao antígeno.

Anticorpos ligam antígenos via contato com aminoácidos nos CDRs, mas os detalhes da ligação dependem do tamanho e forma do antígeno.

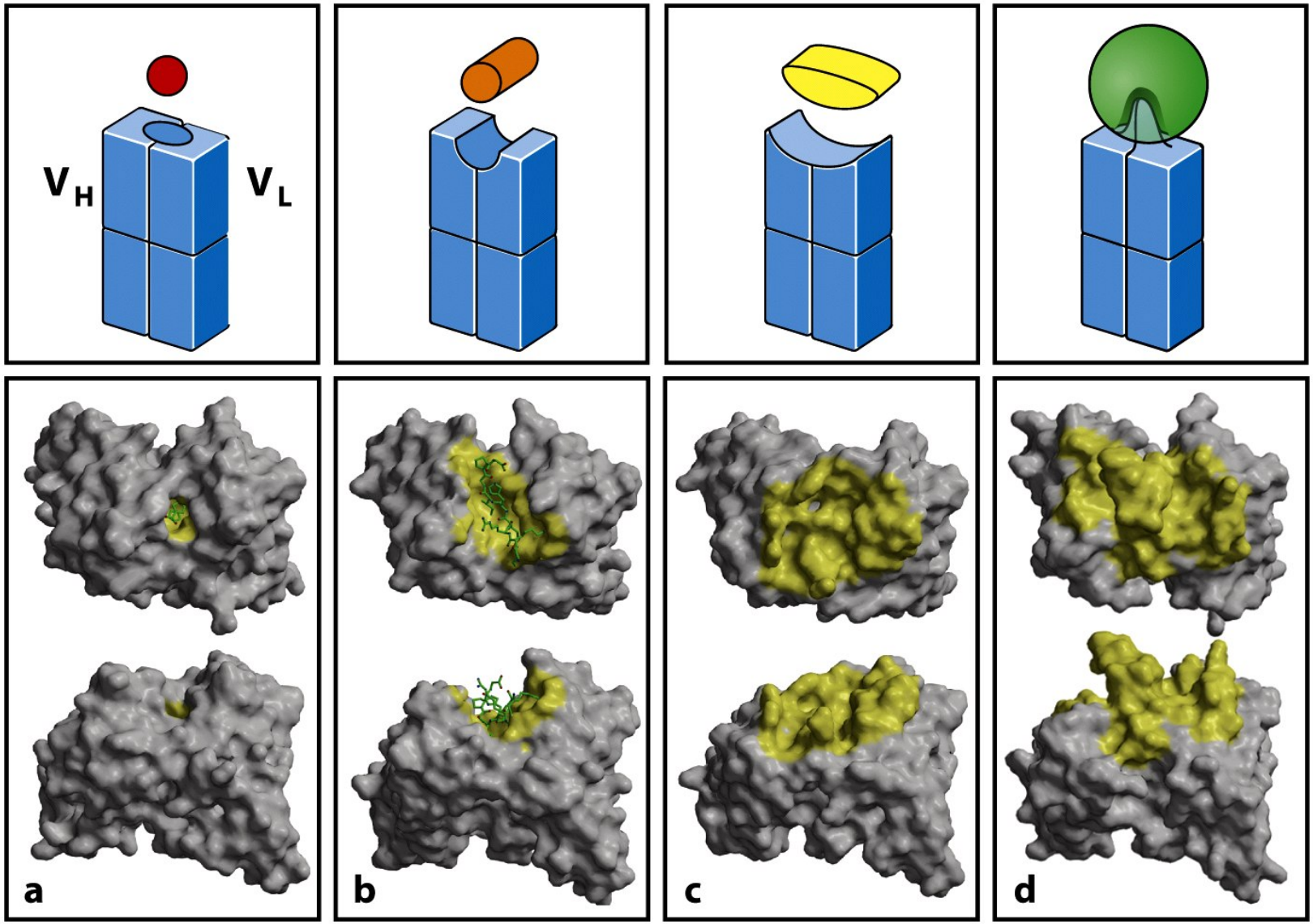
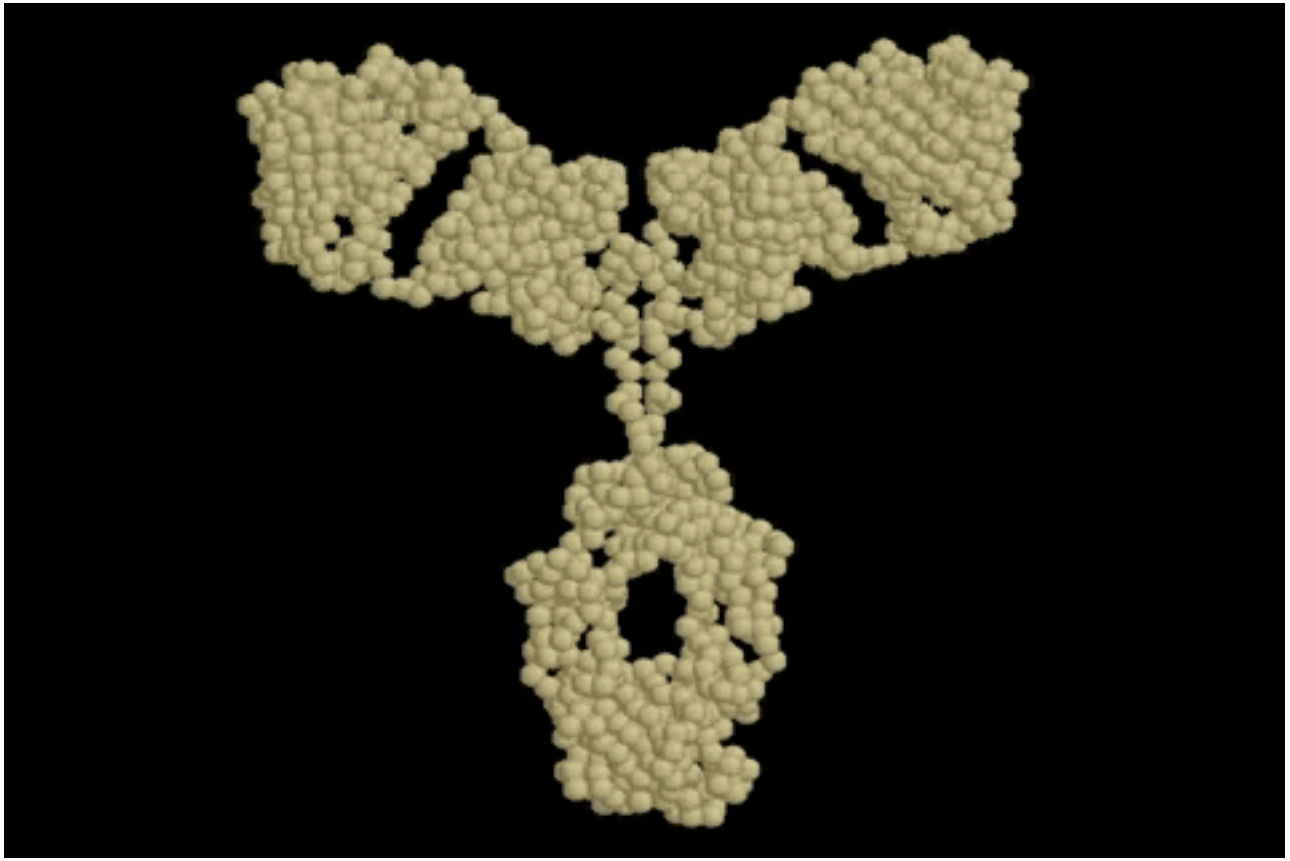


Figure 3-8 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)



Os anticorpos podem reconhecer epitopos (determinantes antigênicos) que são conformacionais/ descontínuos ou epitopos lineares/contínuos.

A ligação do anticorpo ao antígeno é uma interação não covalente e portanto reversível.

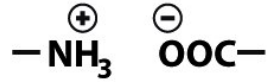
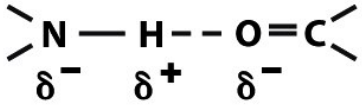
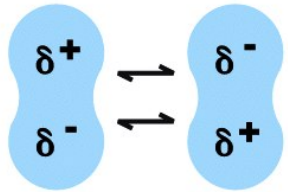
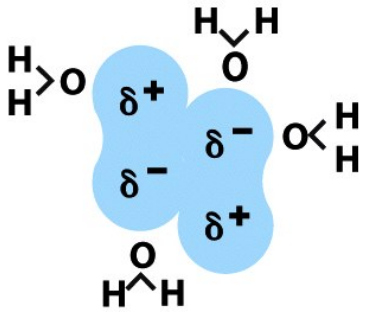
Noncovalent forces	Origin	
Electrostatic forces	Attraction between opposite charges	
Hydrogen bonds	Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O)	
Van der Waals forces	Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms	
Hydrophobic forces	Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces	

Figure 3-9 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Rearranjo Gênico Primário das Imunoglobulinas

Recombinação Somática.

- ✓ Repertório de anticorpos = número total de especificidades disponíveis.
- ✓ 10^{11} em humanos.
- ✓ cada anticorpo tem especificidade e afinidade únicas por um antígeno.

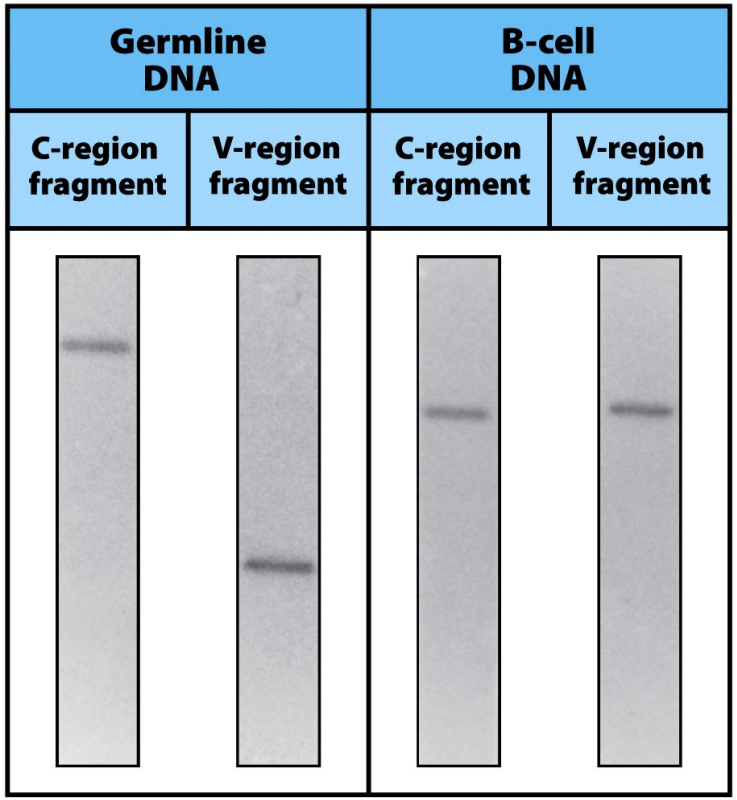


Figure 4-1 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Os genes das imunoglobulinas sofrem rearranjos nas células B.

Southern Blot.

Esquerda: DNA de células não linfóides de uma pessoa normal.

Direita: DNA de linfócitos do sangue periférico de um paciente com leucemia linfóide crônica.

A organização dos loci das cadeias pesada e leves (κ e λ) no genoma humano.

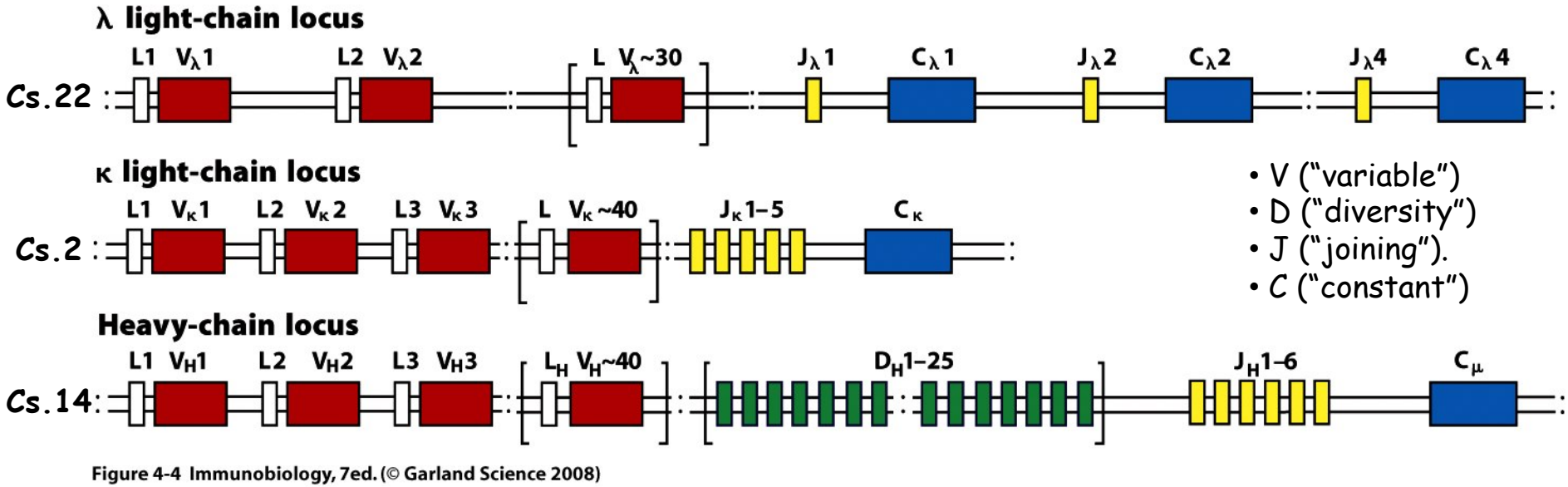


Figure 4-4 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

• locus da cadeia pesada contém várias regiões C, uma atrás da outra, cada uma correspondendo a um isotipo diferente.

• as células B expressam primeiramente os isotipos μ e δ por splicing alternativo que leva a expressão de IgM e IgD, respectivamente.

Genes completos que codificam para uma porção variável são gerados por recombinação somática de fragmentos gênicos separados.

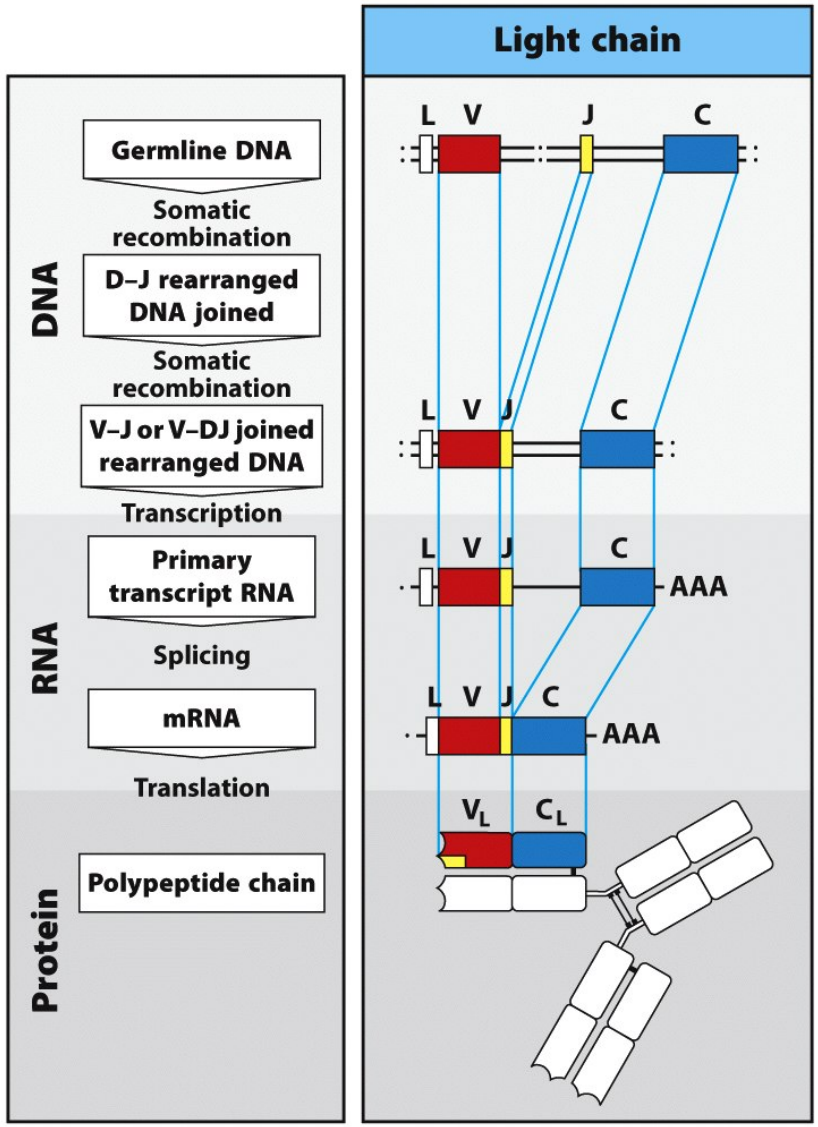


Figure 4-2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ Cadeia Leve

• Recombinação somática: um fragmento V ("variable") rearranja com o J ("joining").

• Junção do fragmento VJ com o fragmento C ("constant") se dá por "splicing" do RNA após a transcrição .

Genes completos que codificam para uma porção variável são gerados por recombinação somática de fragmentos gênicos separados.

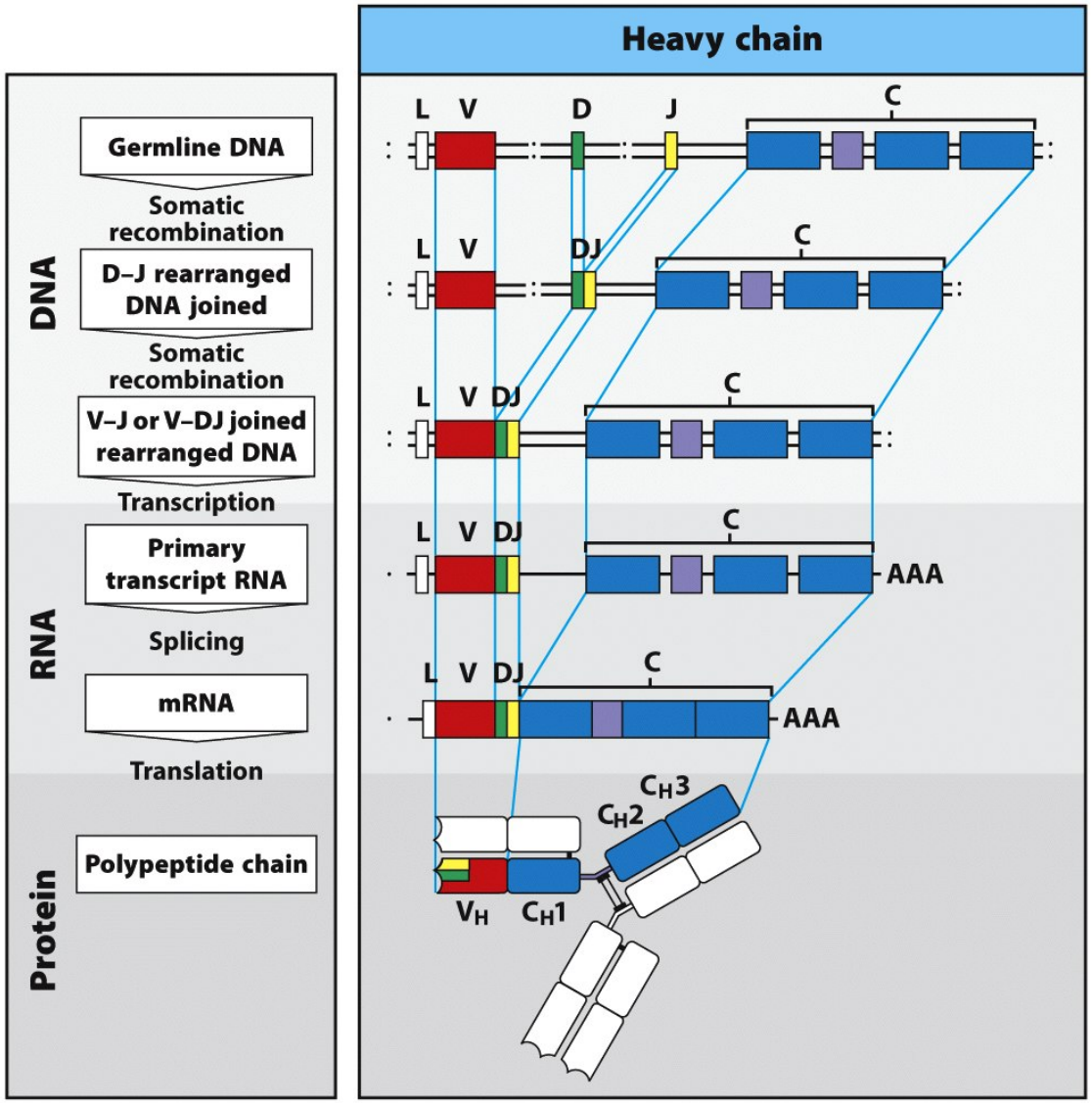


Figure 4-2 Immunobiology, 7ed. (© Ga

✓ Cadeia Pesada.

• Recombinação somática: um fragmento D ("diversity") rearranja com o J ("joining").

• Recombinação somática: o fragmento DJ ("diversity") rearranja com o V ("variable").

• Junção do fragmento VDJ com o fragmento C ("constant") se dá por "splicing" do RNA após a transcrição.

Múltiplos segmentos V contínuos estão presentes em cada locus da imunoglobulina.

Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci

Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	40	30	40
Diversity (D)	0	0	25
Joining (J)	5	4	6

Figure 4-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ Além dos segmentos funcionais, há vários pseudogenes que podem sofrer recombinação somática e resultar em cadeias não funcionais.

O rearranjo dos segmentos gênicos V, D e J é guiado por regiões flanqueadoras de DNA.

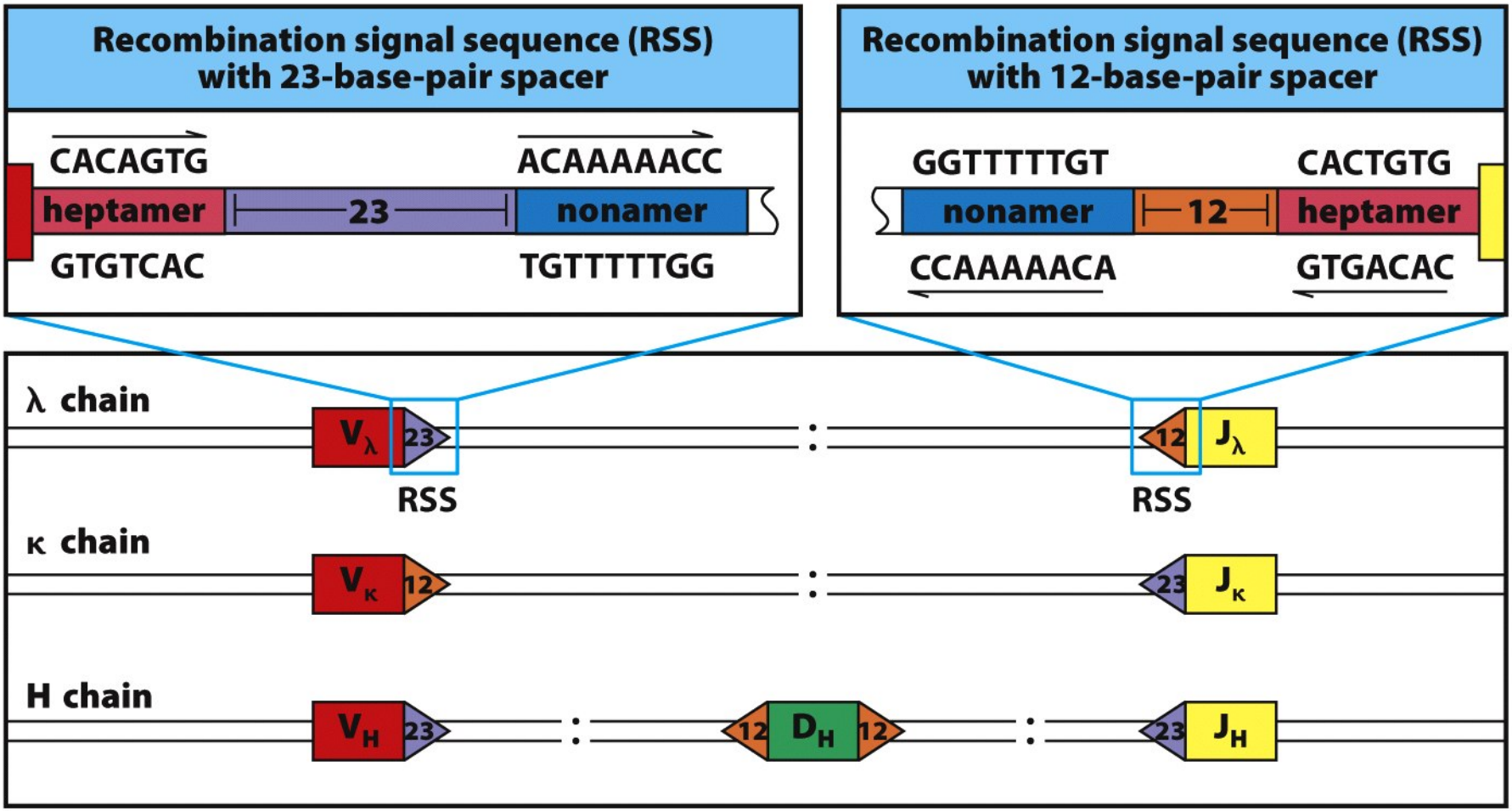


Figure 4-5 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Um fragmento gênico flanqueado por uma RSS que tem um espaçador de 23pb se junta normalmente somente a um RSS com espaçador de 12pb (regra 12/23).

Recombinação dos genes das regiões variáveis.

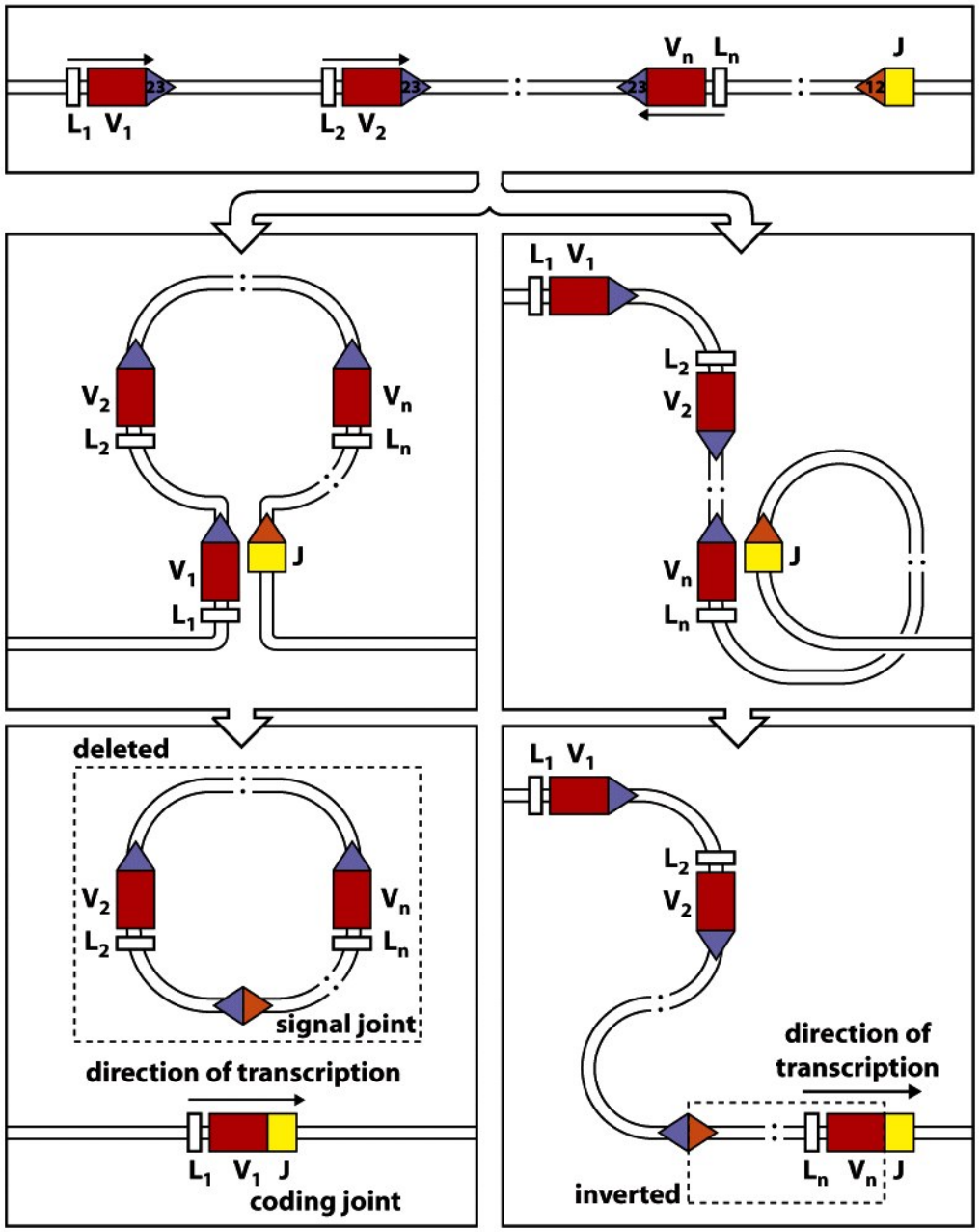
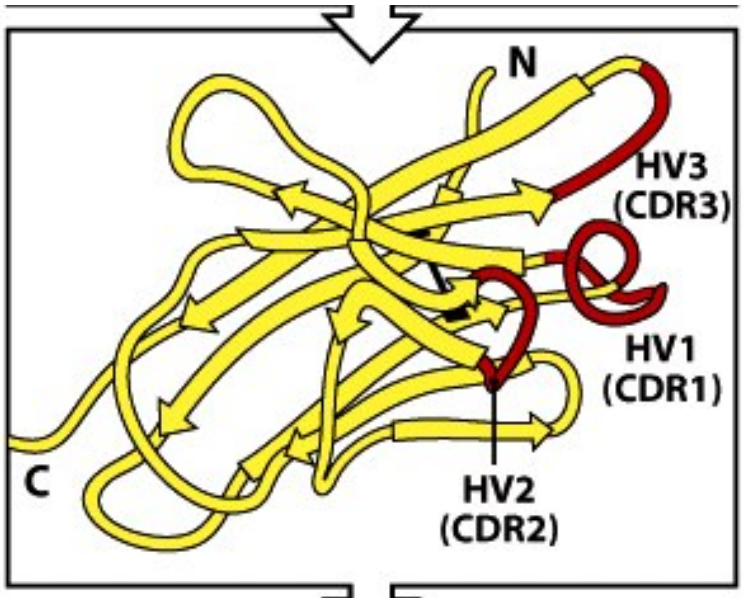


Figure 4-6 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓Genes na mesma orientação: remoção do fragmento intergênico.

✓Genes em orientações opostas: o fragmento intergênico é mantido no genoma.

- menos comum, porém em humanos ocorre na metade das junções entre as porções V e J da cadeia κ.



✓ CDR1 e CDR2 são codificadas no segmento V.

✓ CDR3 (a que apresenta maior variabilidade) é codificada pelo DNA criado pela junção dos segmentos V e J nas cadeias leves e V,D e J na cadeia pesada.

✓ pode haver junção de um fragmento D com outro D (muito raro, aproximadamente 5% dos anticorpos em humanos).

✓ junção DD deixa a região hipervariável CDR3 mais longa.

A reação que recombina os segmentos gênicos V, D e J envolve enzimas modificadoras de DNA que são específicas para linfócitos e outras que são ubíquas.

Reconhecimento do Antígeno – Recombinação gênica.

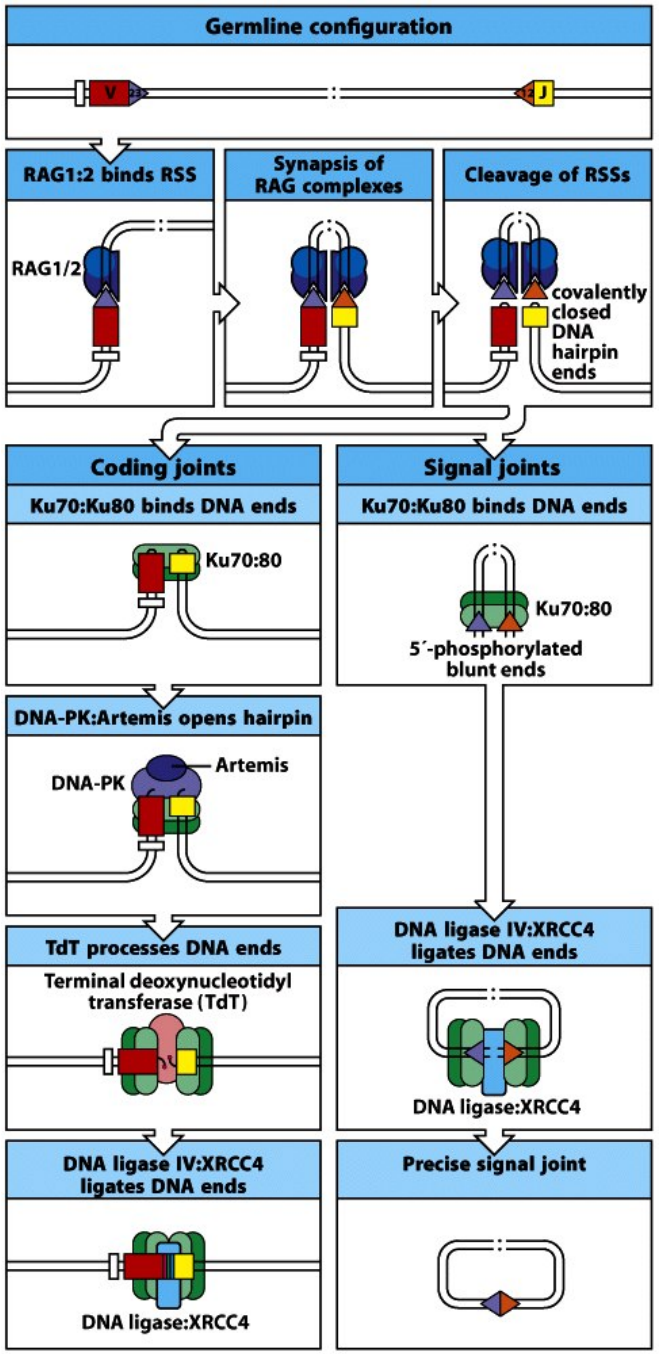


Figure 4-7 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Ação das enzimas durante a recombinação somática "recombinação V(D)J".

1. RAGs 1 e 2 são duas recombinases codificadas pelos genes *RAG-1* e *RAG-2* ("recombination-activated genes") – Obs: são expressas especificamente nos linfócitos.
2. RAGs 1 e 2 ligam-se a sequências RSS
3. RAG 1 cliva o DNA em duas simples fitas deixando o 3′-OH livre para reagir com a porção 5′.
4. Forma-se um grampo ("hairpin") de DNA.
5. As outras enzimas são ubíquas e envolvidas em processos de reparo do DNA.
6. Ku é um heretodímero (70:80) que se associa à subunidade catalítica da DNA-PK ("DNA protein kinase").
7. Artemis: tem uma atividade de nuclease quando fosforilada pela DNA-PK.
8. Enzima DNA ligase IV complexada à proteína de reparo de DNA XRCC4 faz a ligação das pontas.

Qualquer deficiência ou ausência dos componentes deste sistema de recombinação gera imunodeficiências como SCID ("severe combined immune deficiency").

Células B naive expressam IgM e IgD em suas superfícies.

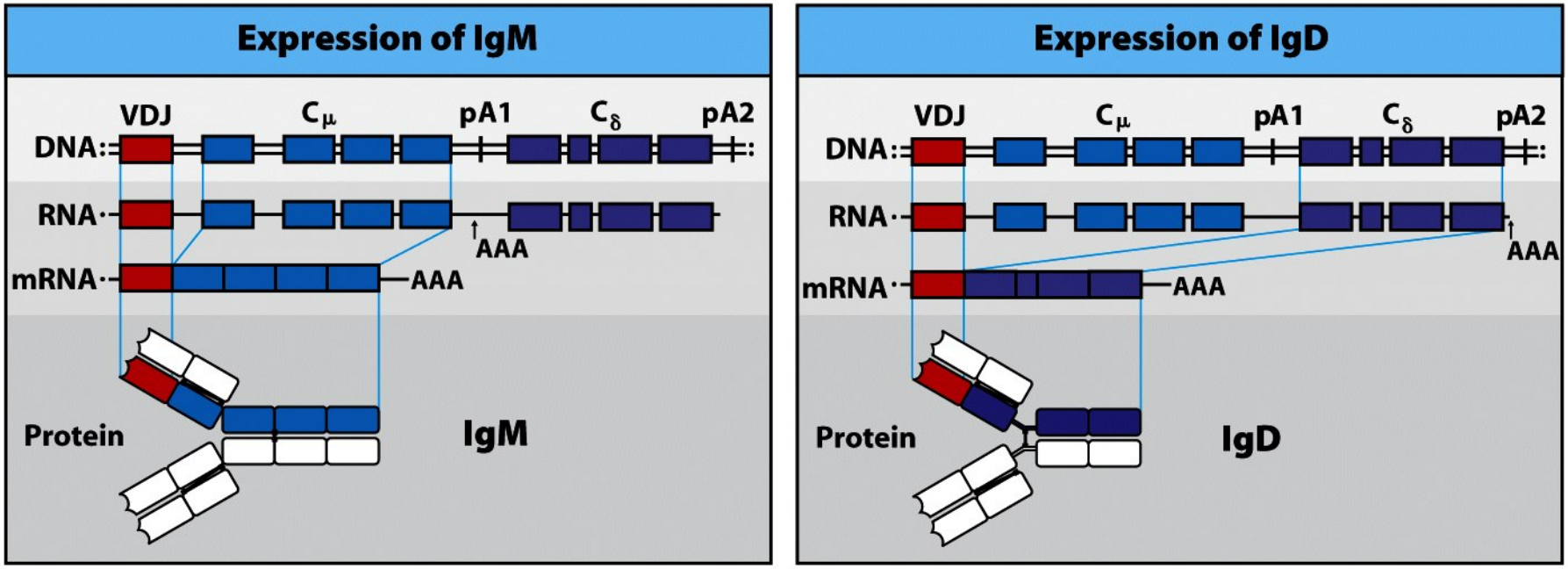


Figure 4-18 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

IgMs e IgDs estão presentes na superfície da maioria das células B.

As células B maduras expressam um RNA bastante longo que depois sofre splicing para gerar IgM ou IgD.

As formas transmembrânicas e secretadas das imunoglobulinas são geradas à partir de transcritos alternativos das cadeias pesadas.

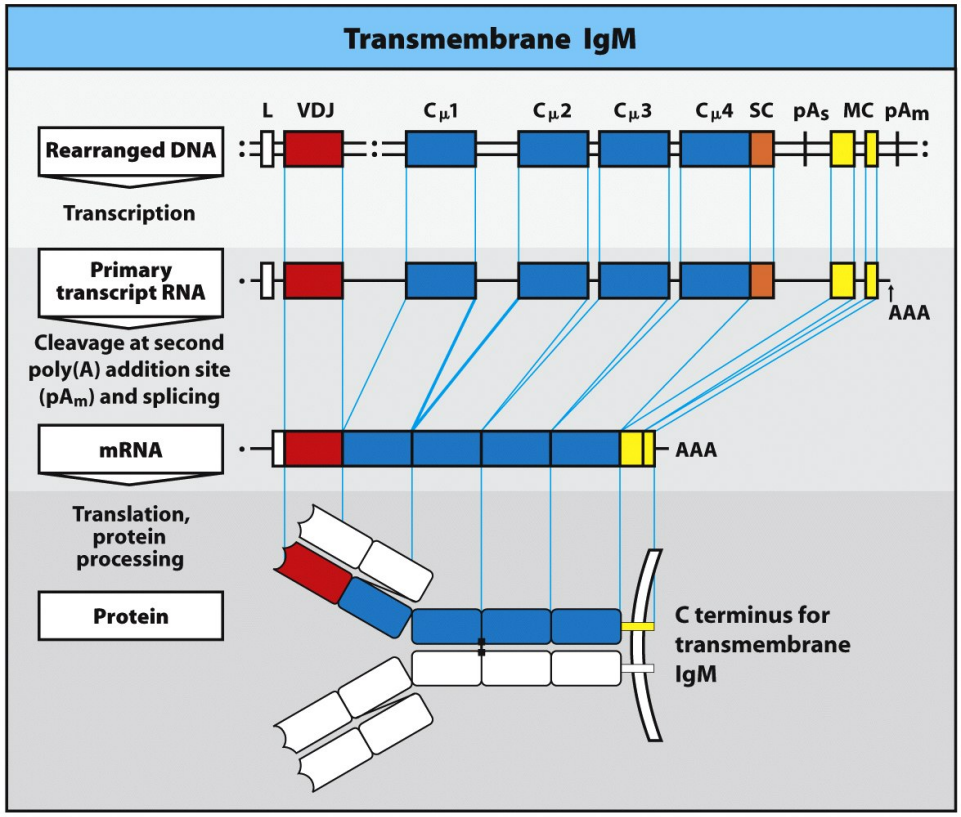


Figure 4-19 part 1 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

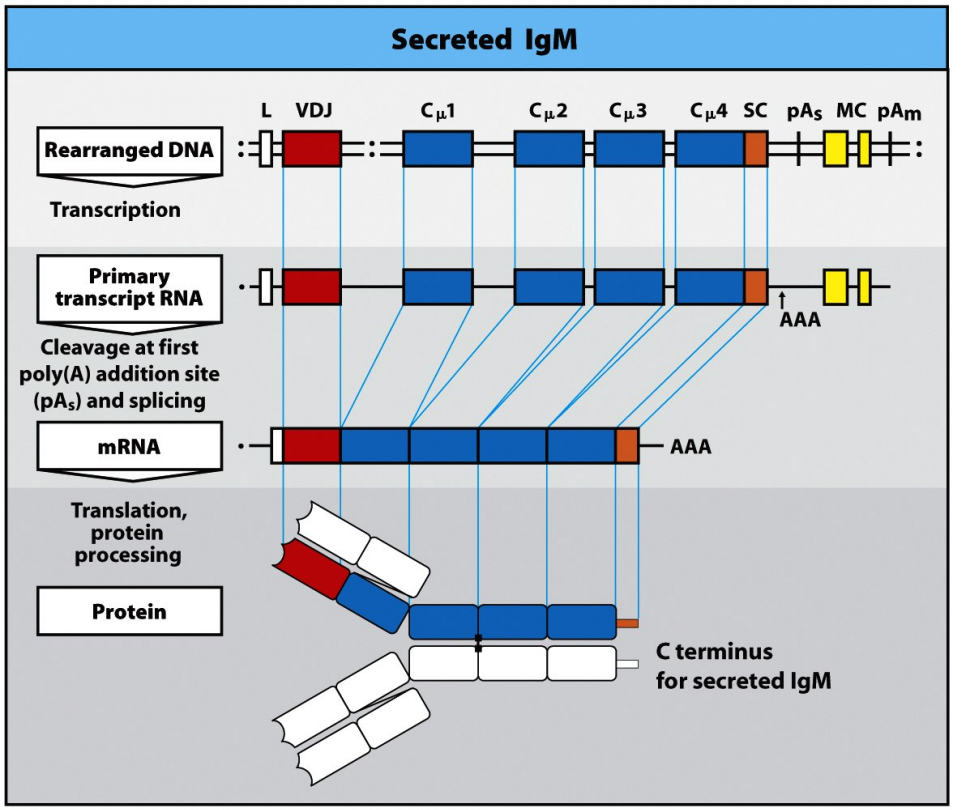


Figure 4-19 part 2 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

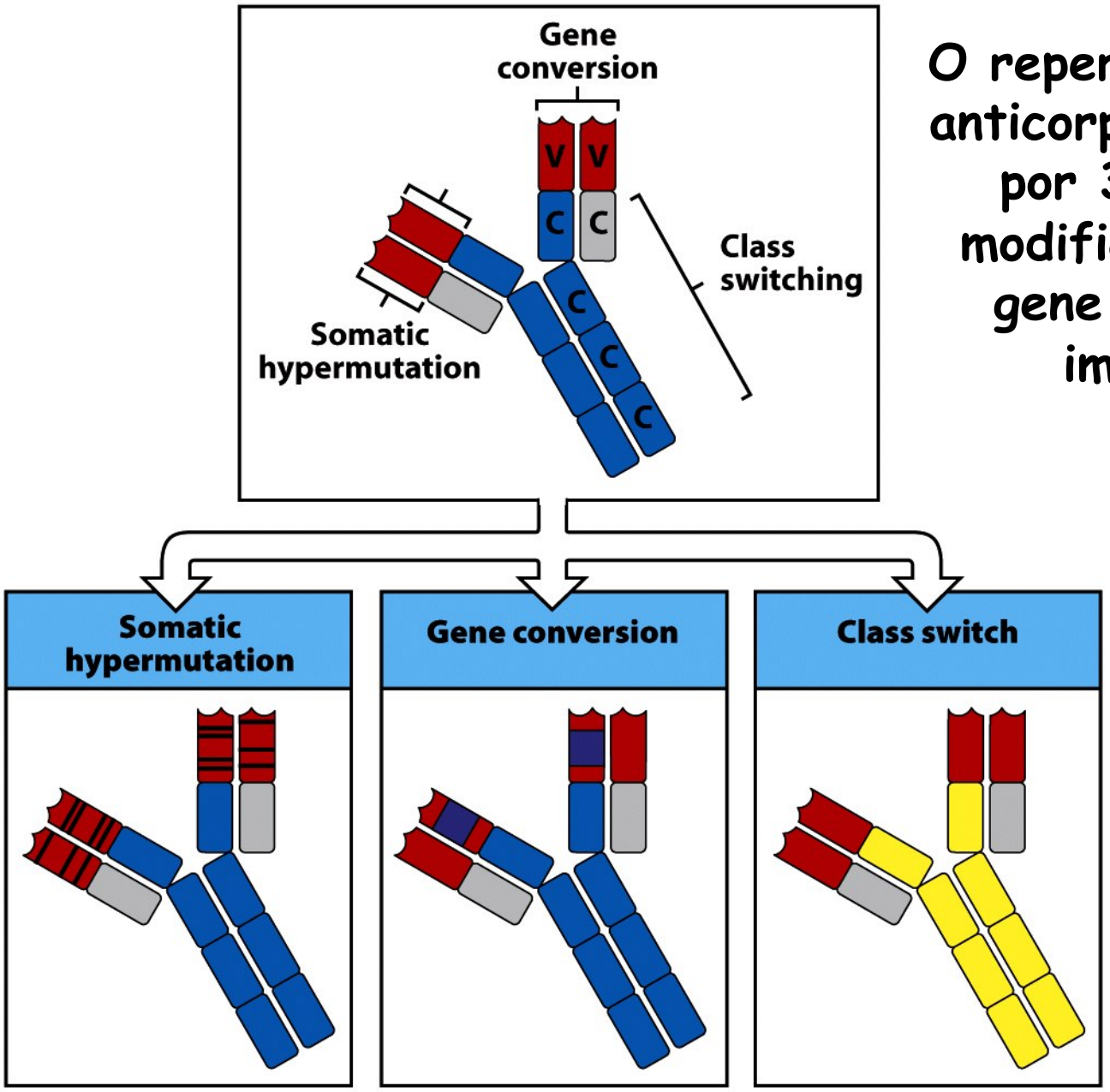


Figure 4-21 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

O repertório primário dos anticorpos é diversificado por 3 processos que modificam ainda mais o gene rearranjado da imunoglobulina.

- ✓ Hipermutação somática.
- ✓Conversão gênica.
- ✓Mudança de classe.

Geração das células B.

✓ A geração de células B inicia-se no embrião e continua por toda vida.

✓Antes do nascimento, o fígado fetal e a medula óssea são os principais sítios para geração de células B.

✓Após o nascimento, a células B passam a ser geradas no baço do neonato e posteriormente apenas na medula óssea.

✓A diferenciação na medula óssea é independente de antígeno e envolve rearranjos no DNA que codificam as imunoglobulinas para gerar diversidade.

Células B desenvolvem-se na medula óssea e migram para os órgãos linfóides secundários onde podem ser ativadas por antígenos.

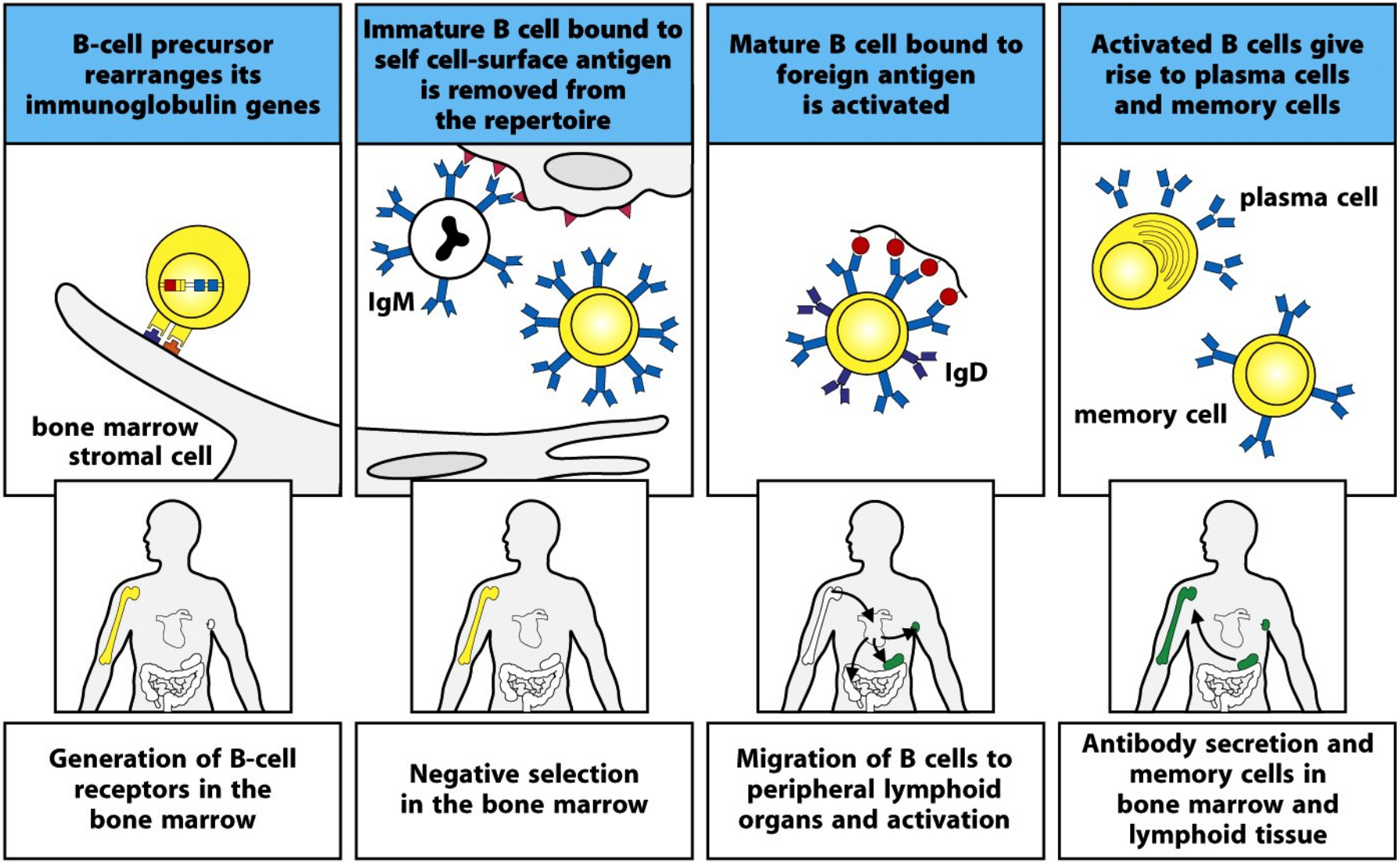


Figure 7-1 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Os primeiros estágios do desenvolvimento das células B são dependentes das células estromais presentes na medula óssea.

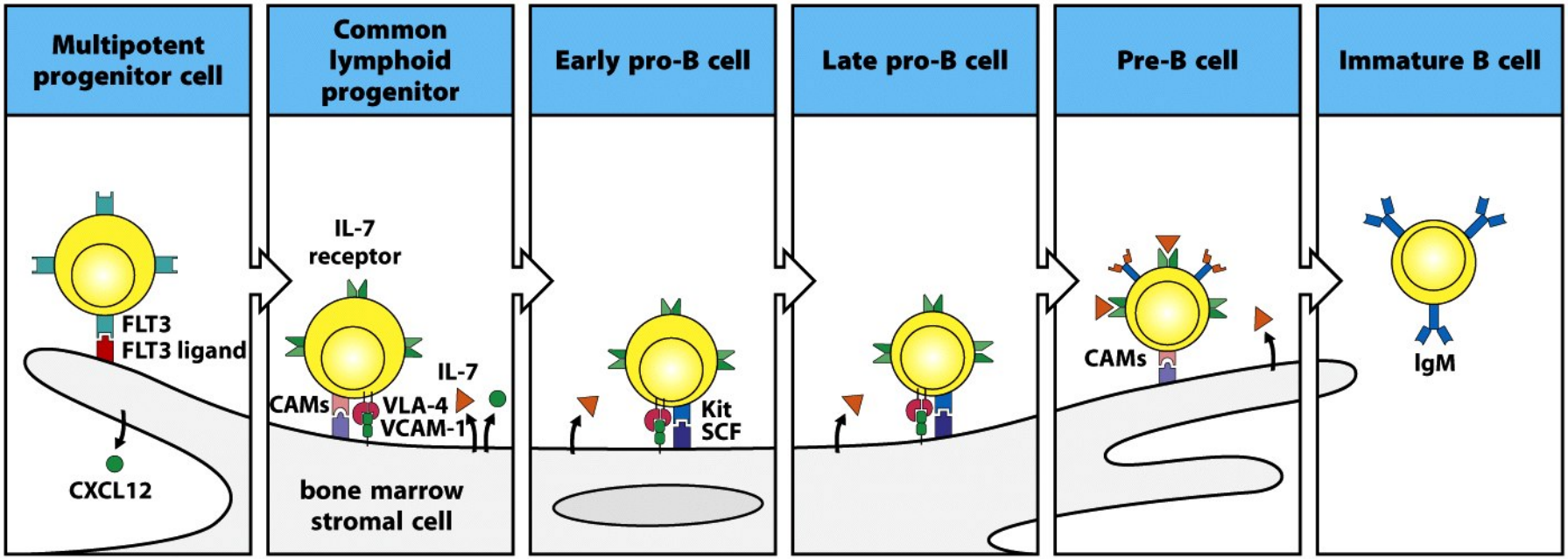


Figure 7-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ as células estromais formam contatos adesivos específicos com os linfócitos em desenvolvimento através de moléculas de adesão ligadas à membrana e os seus ligantes.

✓ são citocinas e quimiocinas ligadas à membrana ou solúveis que controlam a diferenciação e proliferação linfocitária.

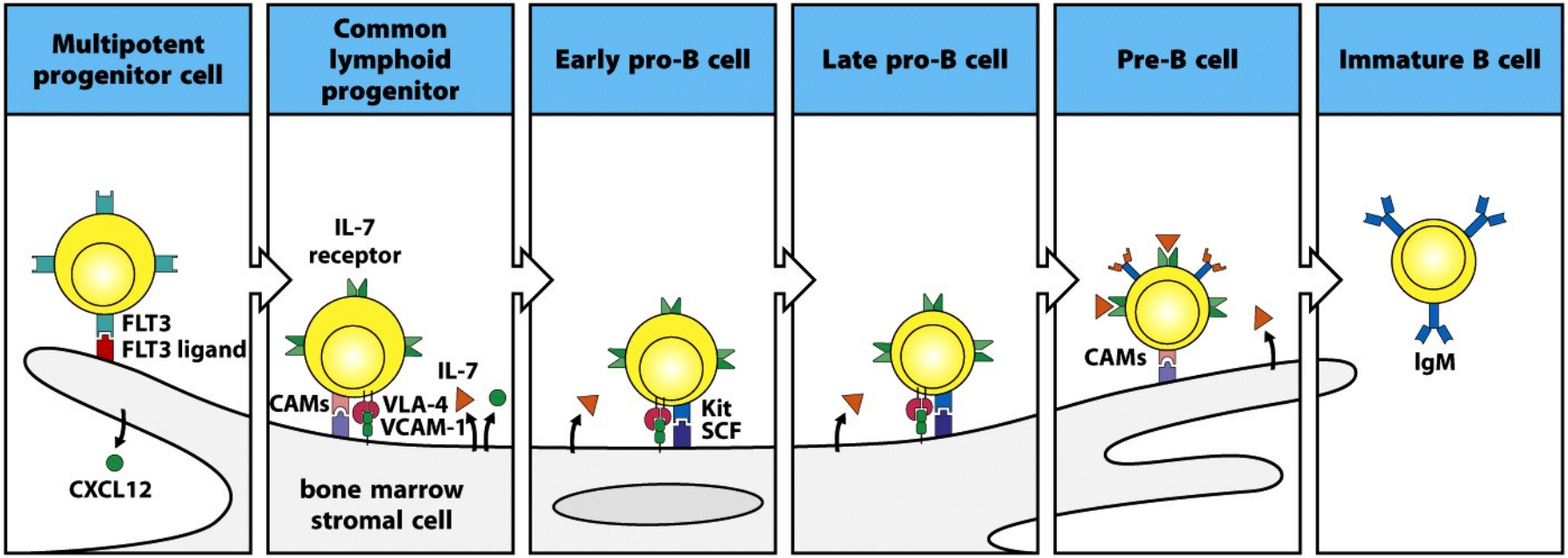


Figure 7-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ FLT3/STK: tirosina quinase que se liga a seu ligante (FLT3 ligante) na superfície das células estromais.

✓CXCL12: produzida constitutivamente pelas células estromais. Parece ter como função a manutenção das células B em desenvolvimento na medula.

✓ IL-7: fundamental para o crescimento e sobrevivência das células B em camundongos. Produzida pelas células estromais.

✓ SCF ("stem cell factor"): citocina ligada à membrana das células estromais. Interage com kit (receptor de tirosina quinase).

✓ Células pró-B iniciam o rearranjo das imunoglobulinas.

O desenvolvimento da linhagem de células B prossegue através de vários estágios marcados pelo rearranjo dos genes das imunoglobulinas.

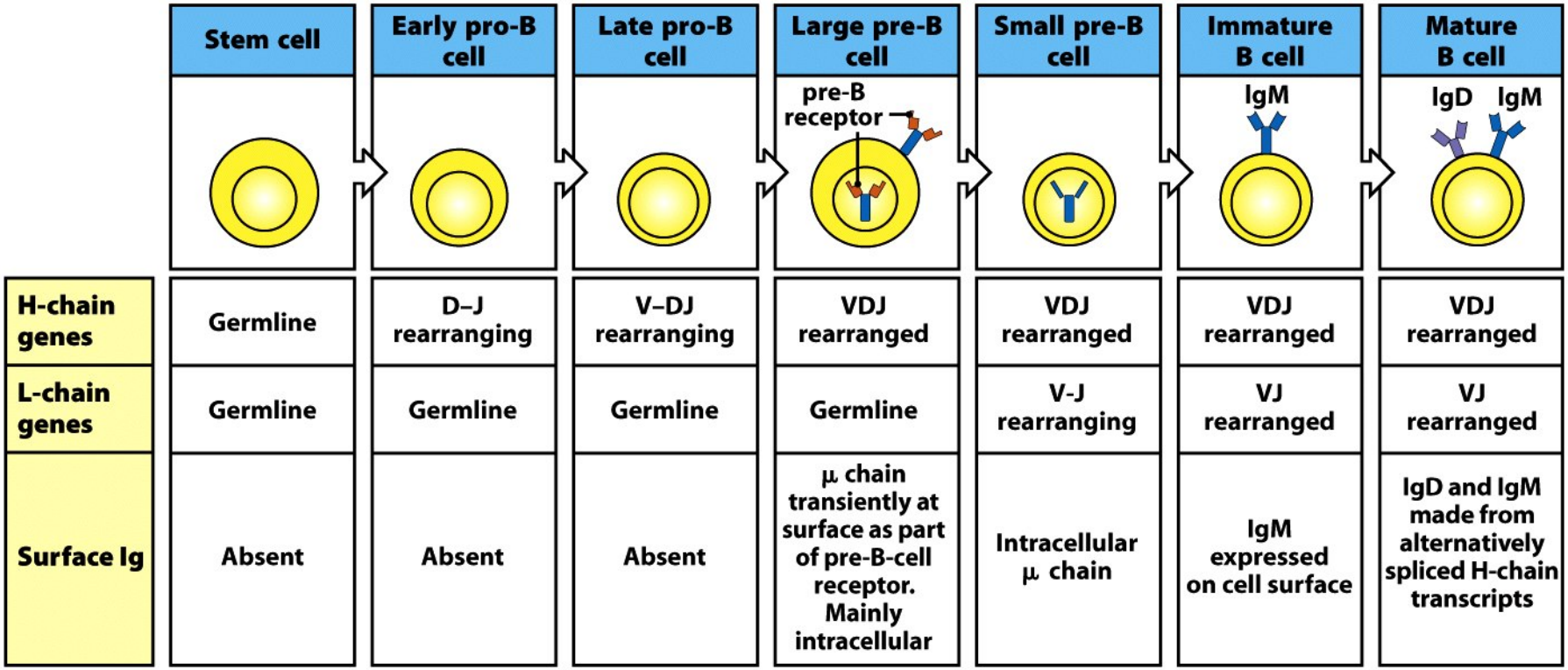


Figure 7-5 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

- ✓ o rearranjo começa pelo locus da cadeia pesada (D_H-J_H) nos dois alelos.
- ✓ dois genes importantes: E2A e EBF (early B cell factor).
- ✓ forma-se o receptor pré B (para estabilizá-lo, uma cadeia μ intacta é produzida).
- ✓ no estágio de "late pro B cell" inicia-se o rearranjo de V_H com DJ_H (somente em um alelo).

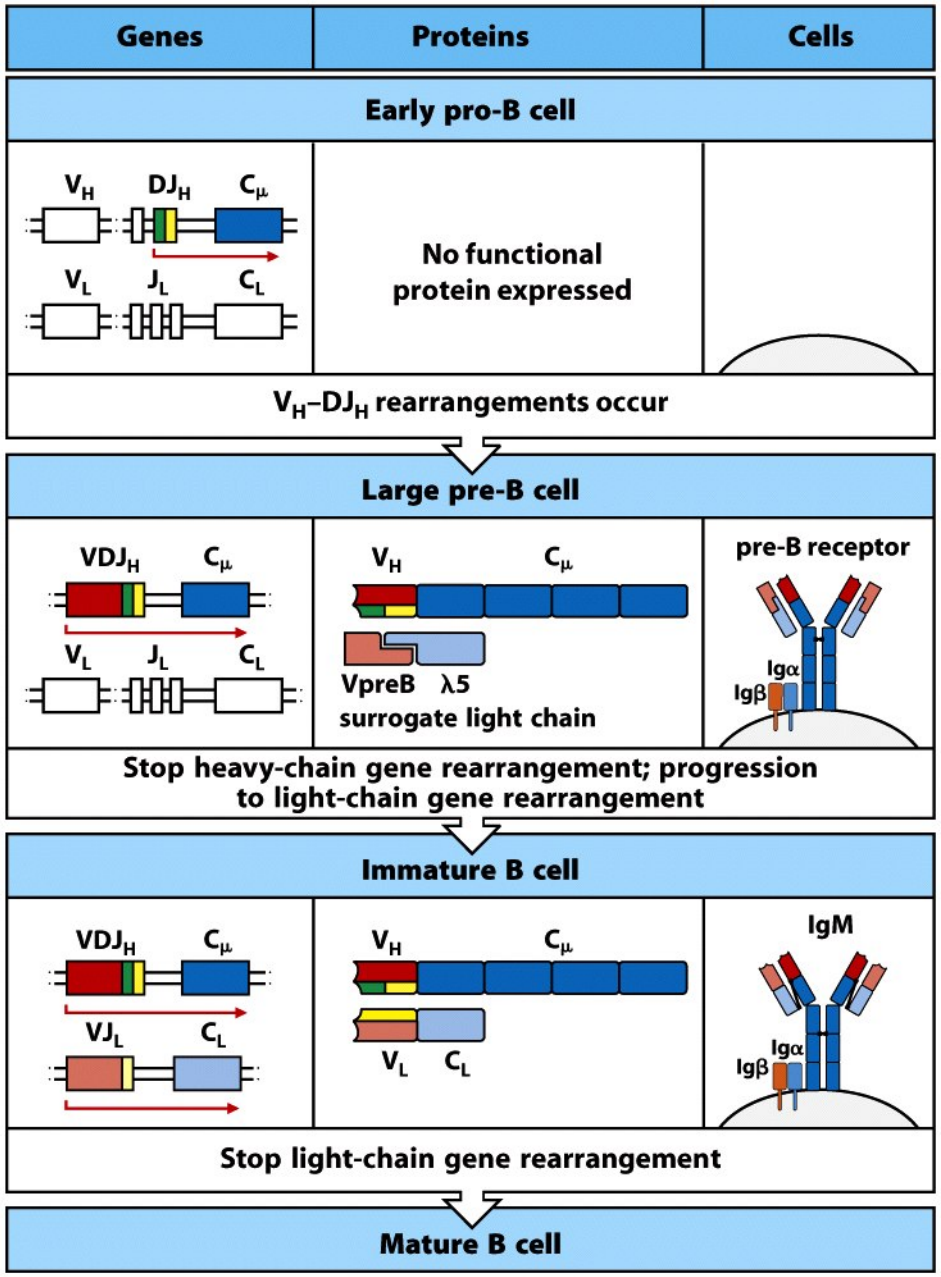


Figure 7-7 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Produção de uma imunoglobulina rearranjada.

✓ Célula Pre B: o rearranjo da cadeia pesada já ocorreu.

✓ Iniciam-se os testes para saber se será uma cadeia produtiva.

✓ Produção de duas cadeias invariantes parecidas com a cadeia leve (VpreB e λ5).

✓ VpreB e λ5 pareiam com a cadeia μ e formam o pré-receptor de células B (pré BCR).

✓ se estiver tudo bem, inicia-se o rearranjo da cadeia leve (V_L-J_L).

✓ O receptor pré-BCR é um "checkpoint" importante para o desenvolvimento das células B. Sem ele, não há formação de células B maduras.

✓ há muita proliferação neste estágio e as células progridem para "small pre-B cell".

✓ o rearranjo pára nas células B maduras.

✓ células B imaturas: alta sIgM e baixa sIgD.

✓ células B maduras: baixa sIgM e alta sIgD.

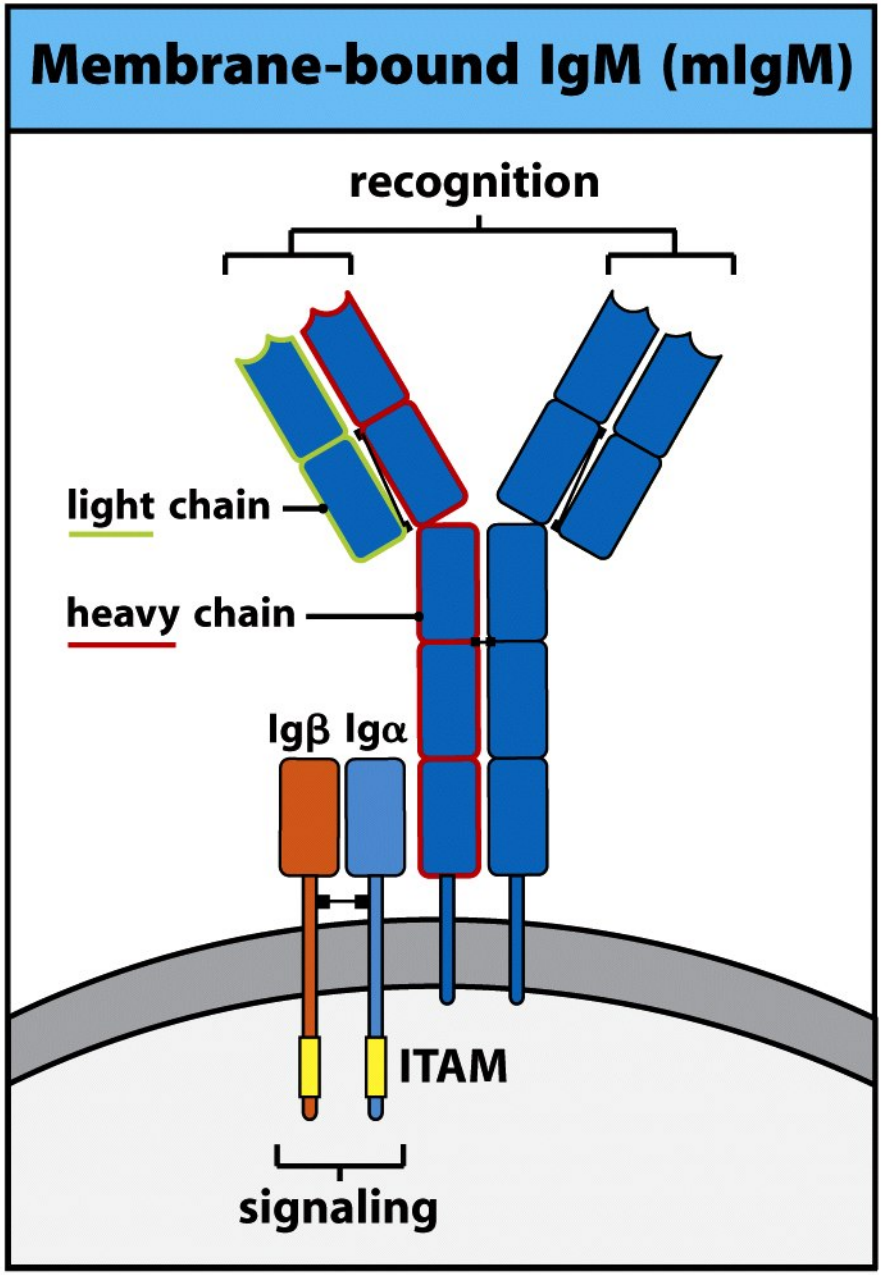


Figure 6-9 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Produção de uma imunoglobulina rearranjada

✓ Imunoglobulina de membrana mais proteínas invariantes Igα e Igβ.

✓ Igα e Igβ ajudam a transportar o anticorpo para a membrana.

✓ Igα e Igβ estão presentes no pré BCR e no BCR.

✓ Igα e Igβ possuem domínios ITAM ("immunoreceptor tyrosine-based activation motif") e são responsáveis pela transdução de sinal para o BCR.

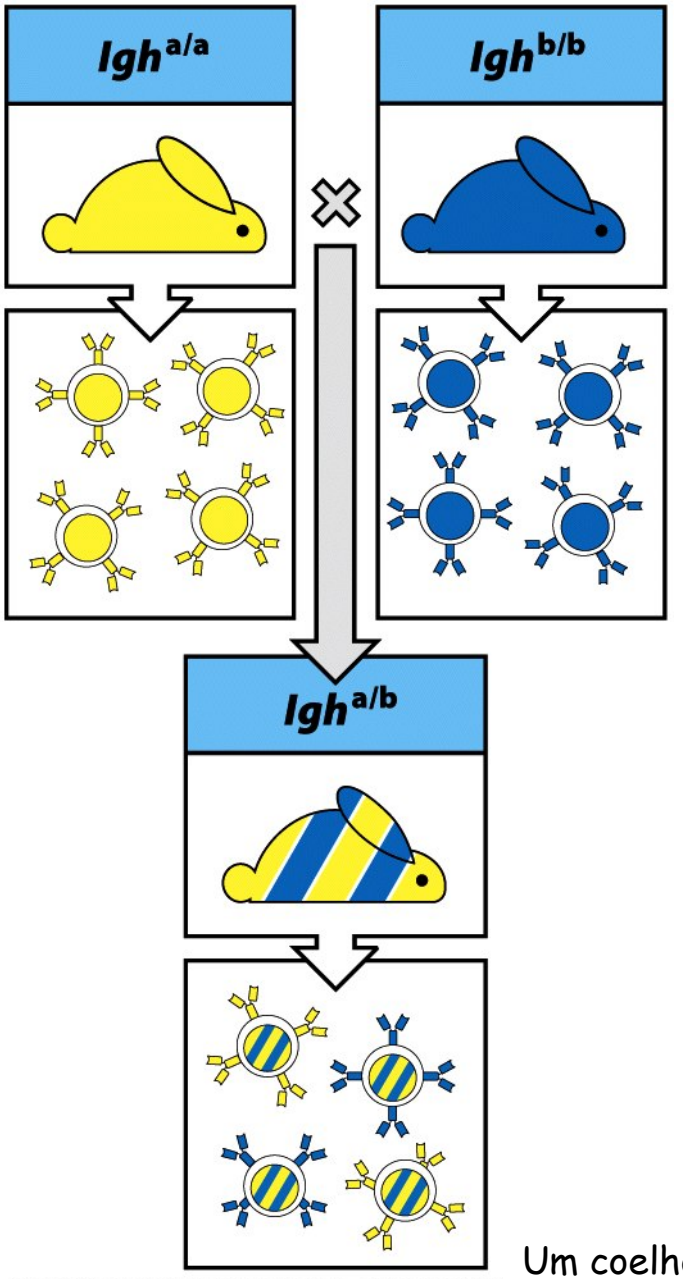


Figure 7-8 Immunobiology, 7ed. (© Garland Sci

O receptor pré-BCR é um "checkpoint" importante para o desenvolvimento das células B. Sem ele, não há formação de células B maduras. É também responsável pelo fenômeno de exclusão alélica.

✓ Exclusão alélica: expressão de apenas um dos alelos.

✓ Há exclusão alélica. Porém, podem ocorrer vários rearranjos até a obtenção de um produtivo.

✓ Cada célula pré B pode sofrer um rearranjo diferente na cadeia leve. Aumenta-se a diversidade.

Um coelho de alótipo $Igh^{a/b}$ produz células B que expressam somente um tipo de Ig.

Múltiplos rearranjos são possíveis.
Se um for improdutivo, faz-se outro.

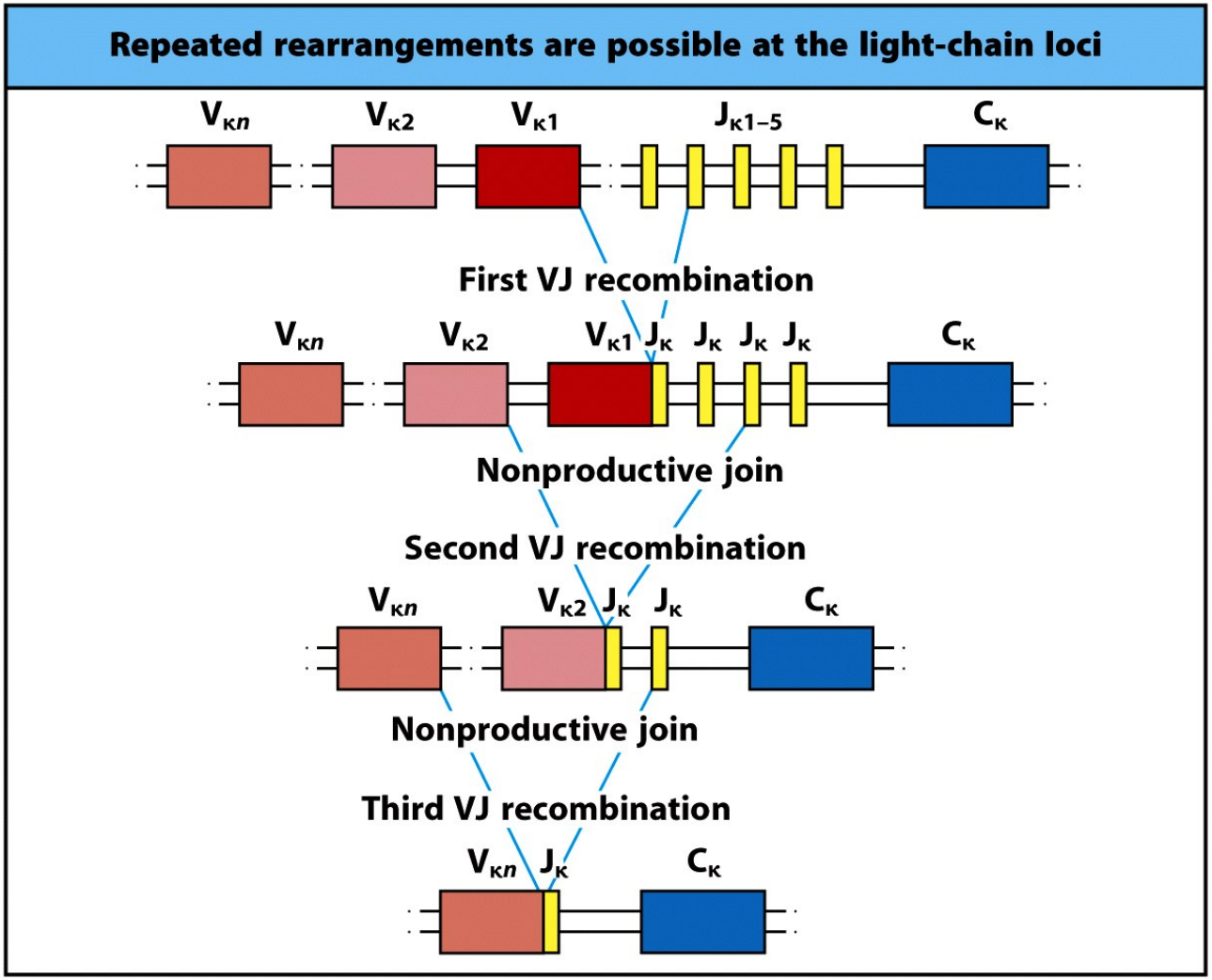


Figure 7-9 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

✓ Cada célula pré B pode sofrer um rearranjo diferente na cadeia leve. Aumenta-se a diversidade.

✓A maioria das células B pequenas dão origem a linfócitos B imaturos.

Estágios em que podem haver perdas de células B.

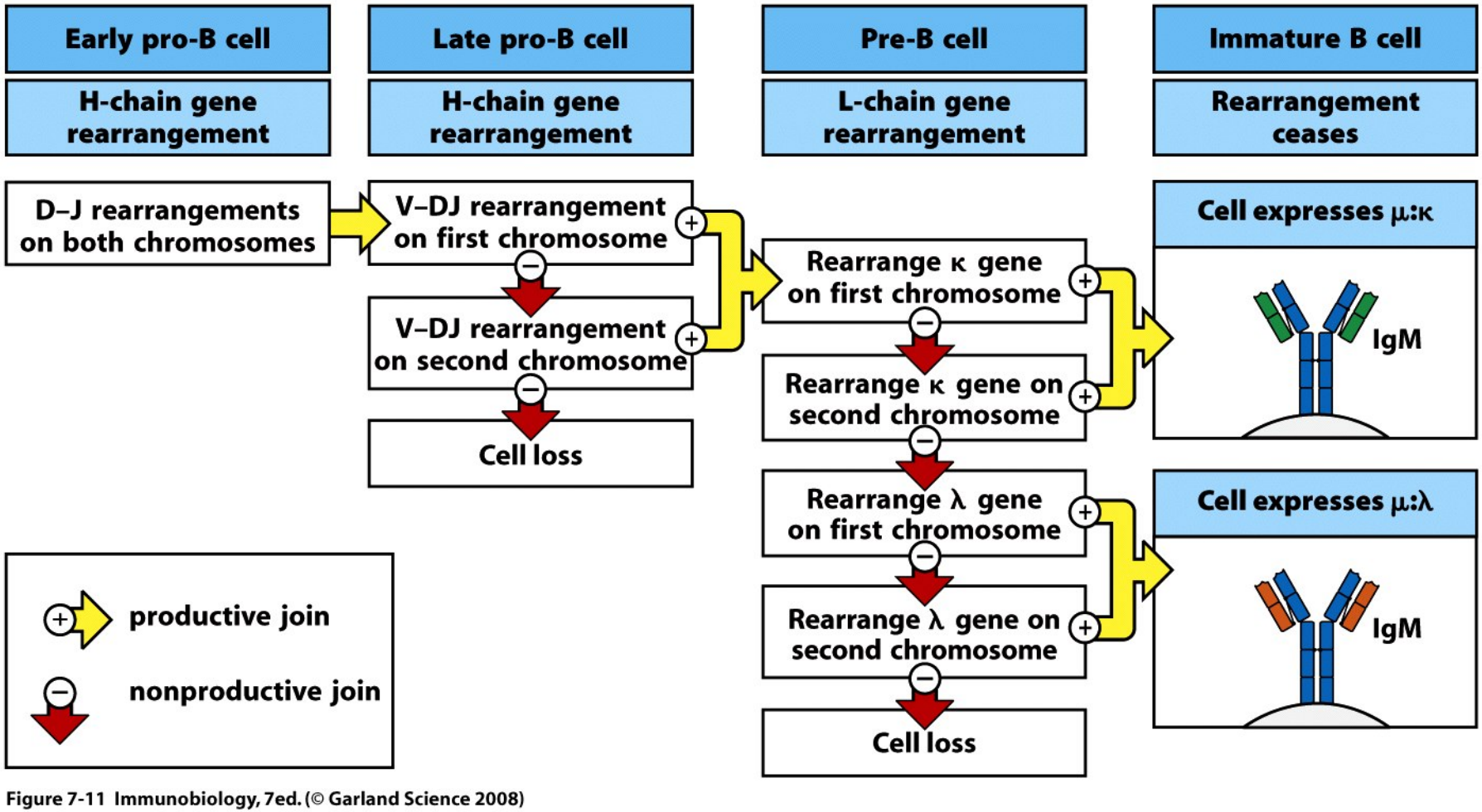


Figure 7-11 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

- ✓ Exclusão isotípica: somente um tipo de cadeia leve
- ✓ Camundongo- 95% κ e 5% λ
- ✓ Humanos – 65% κ e 35% λ
- ✓ Gatos – 5% κ e 95% λ

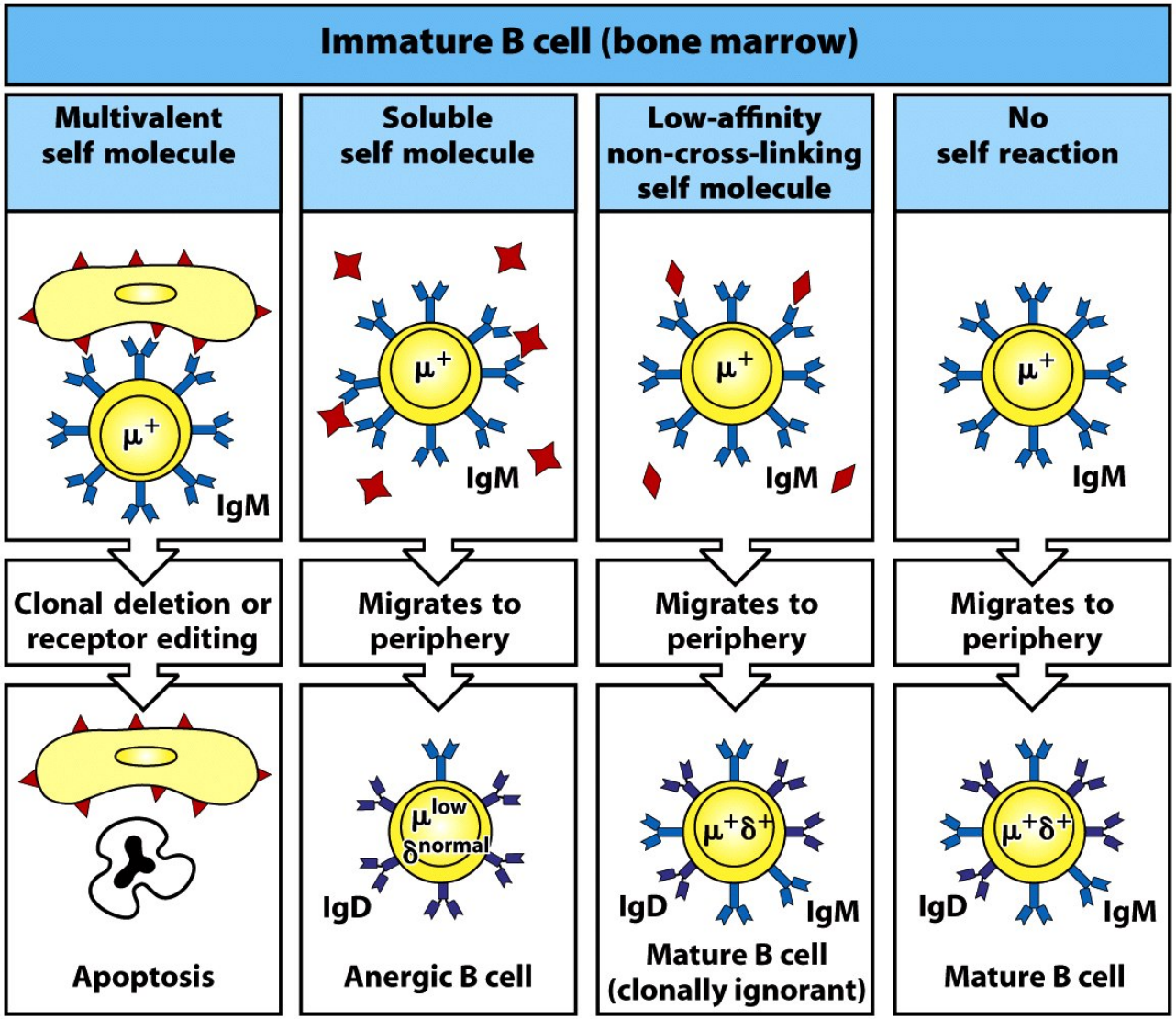


Figure 7-12 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Moléculas solúveis que fazem o crosslink do receptor.

Moléculas solúveis que são monovalentes e de baixa afinidade.

Células B imaturas que não apresentam forte reatividade contra antígenos próprios evoluem para células B maduras. Por outro lado, as que reagem contra antígenos próprios podem ser eliminadas por 4 mecanismos:

1. Apoptose ou deleção clonal;
2. Produção de um novo receptor por "edição de receptor"
3. Indução de anergia;
4. Ignorância imunológica.

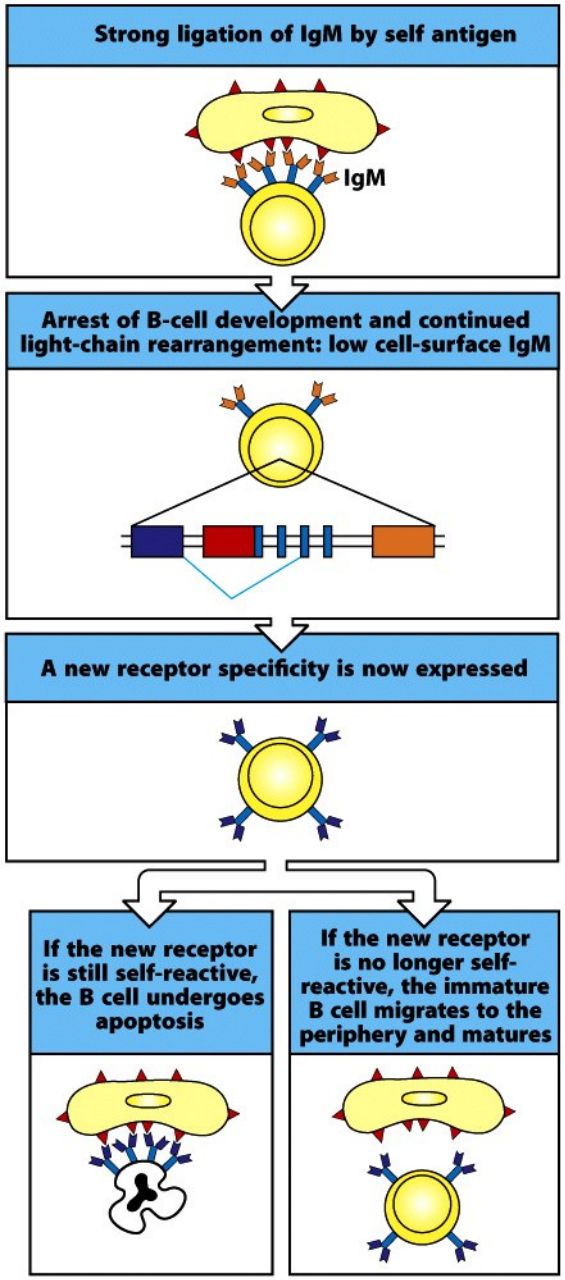


Figure 7-13 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Substituição da cadeia leve através da edição de receptores ("receptor editing") pode resgatar alguns linfócitos B auto reativos modificando sua especificidade antigênica.

Sobrevivência e maturação dos linfócitos B nos órgãos linfóides secundários.

Linfonodo.

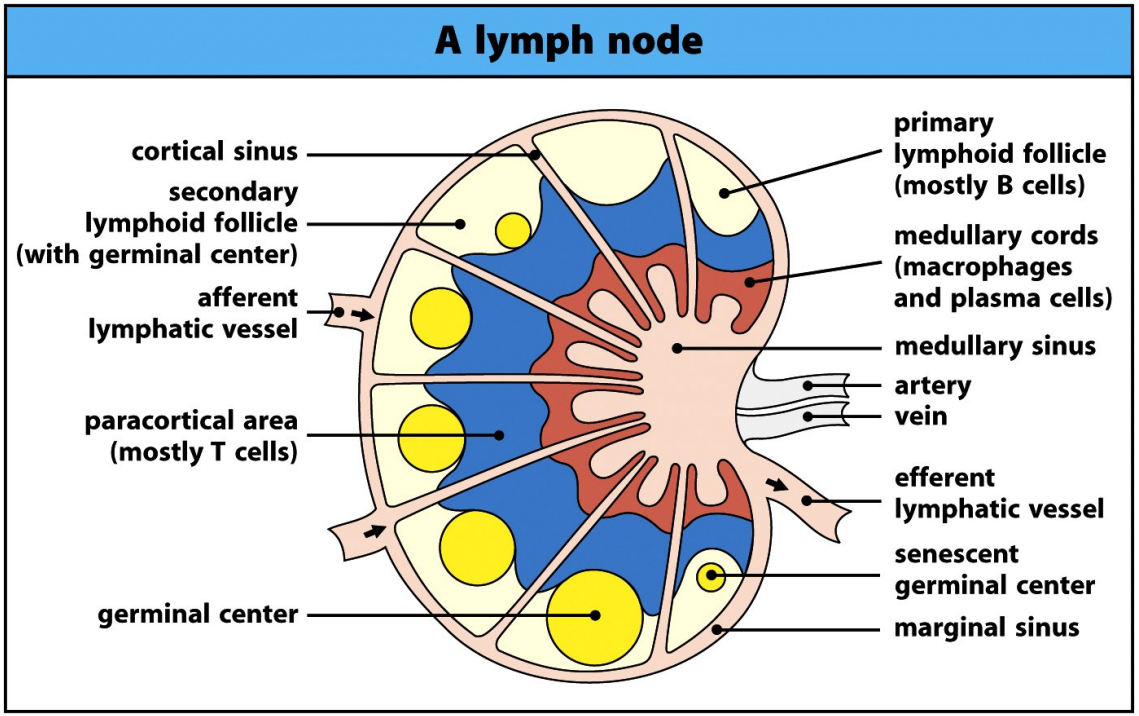


Figure 1-18 part 1 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Placas de Peyer (intestino).

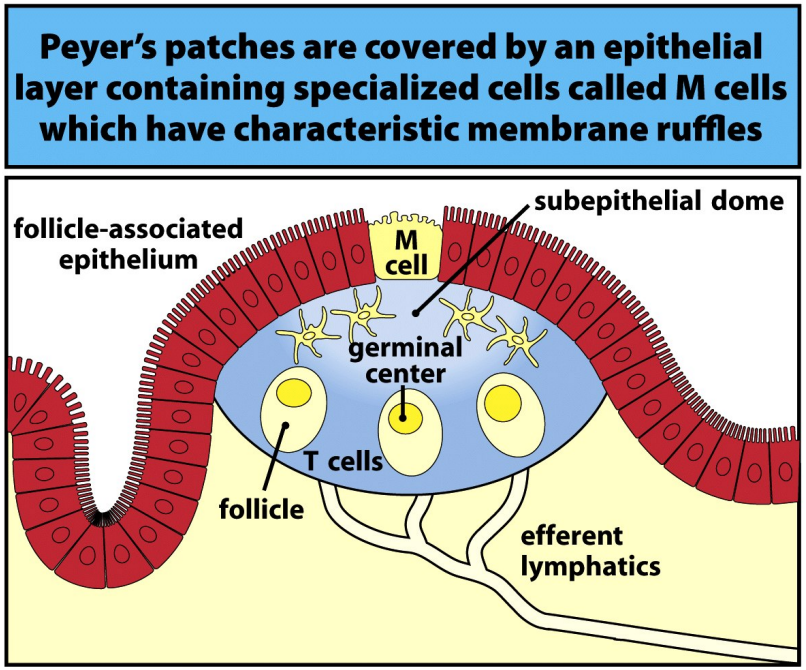


Figure 1-20 part 1 of 2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

The spleen

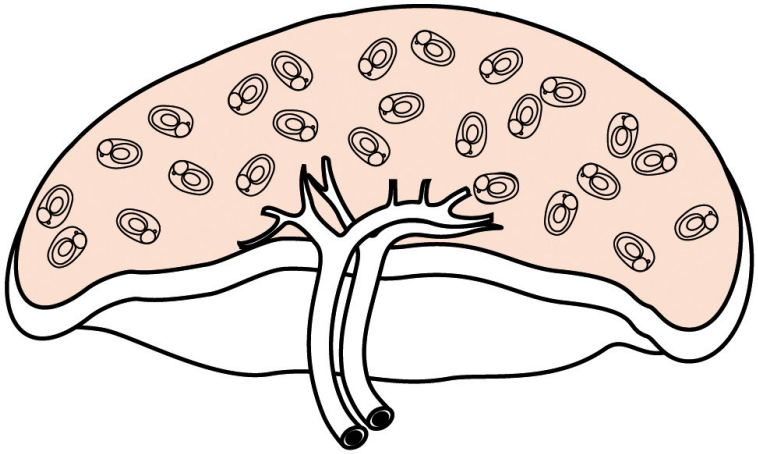


Figure 1-19 part 1 of 3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Baço

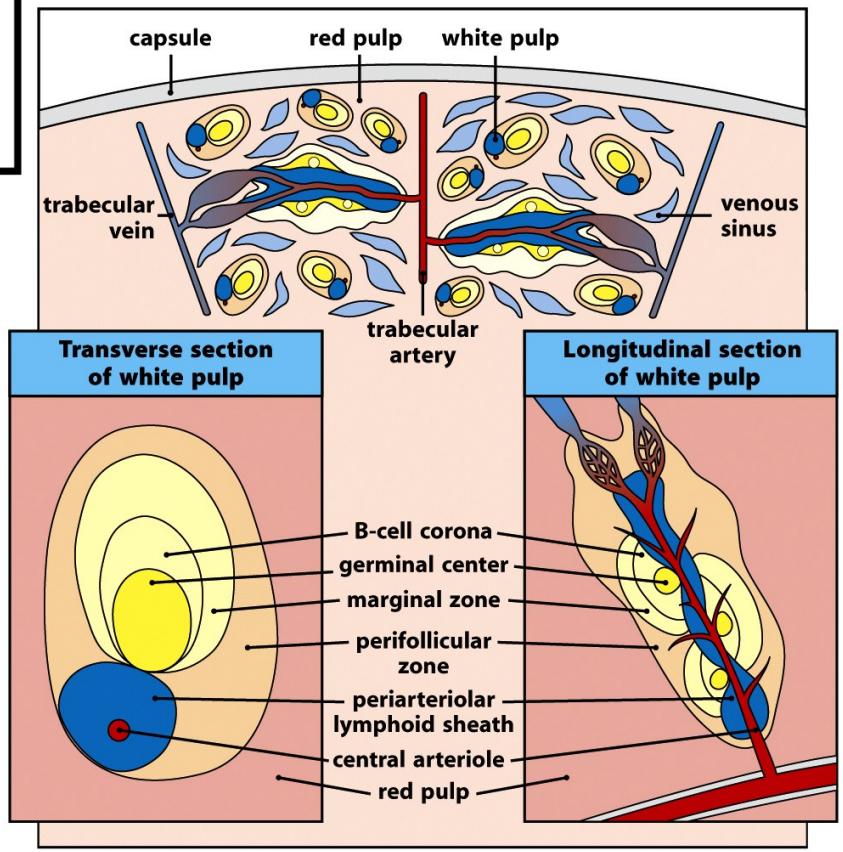


Figure 1-19 part 2 of 3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Os linfócitos B são atraídos para os órgãos linfóides secundários (neste caso um linfonodo) através da secreção de quimiocinas.

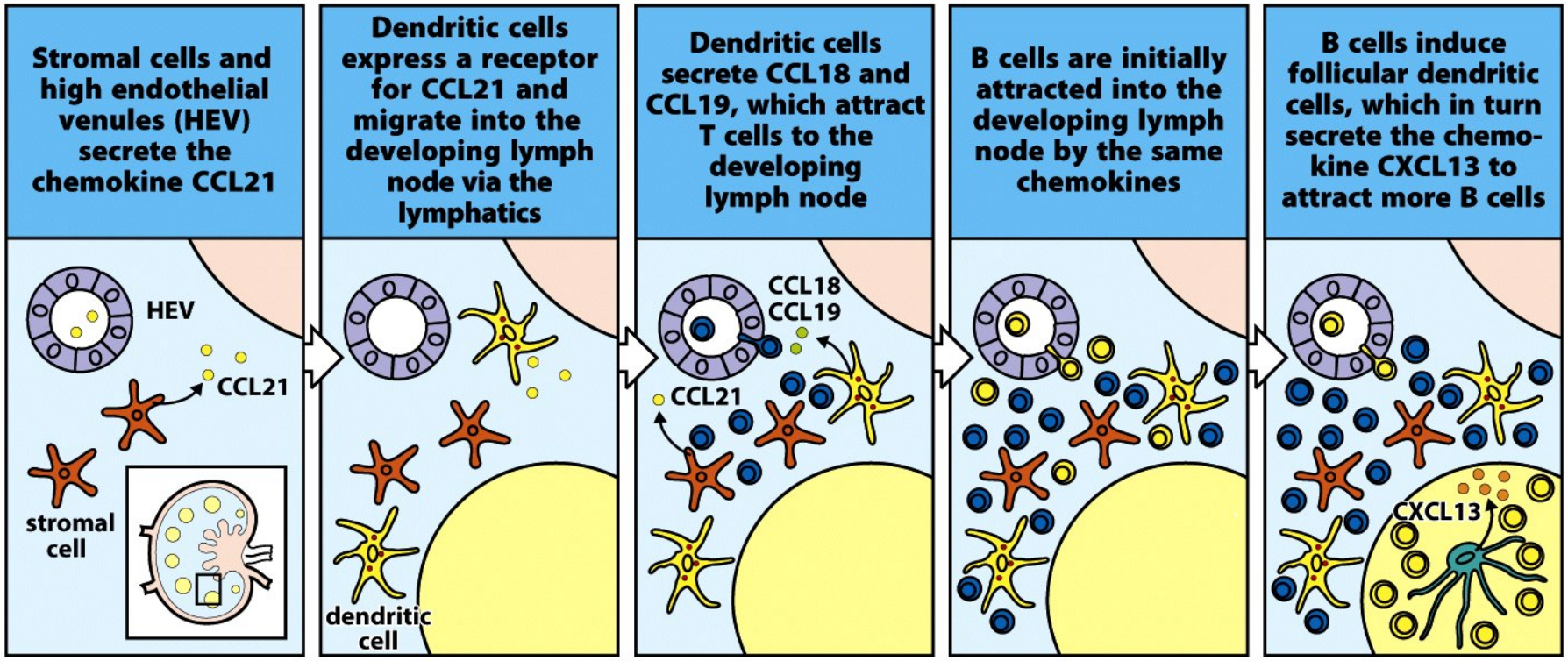


Figure 7-38 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Dinâmica populacional das células B convencionais.

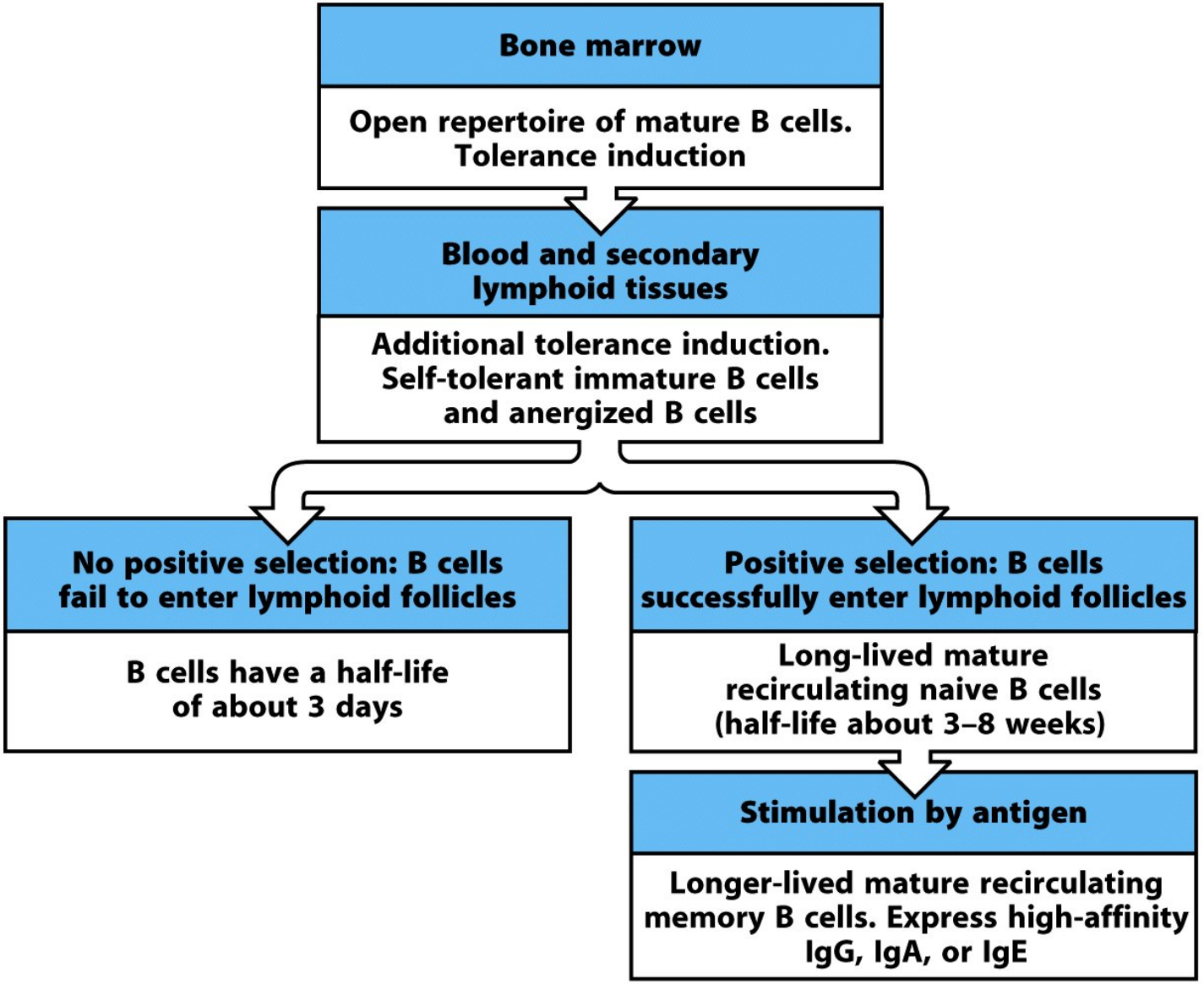


Figure 7-39 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Comparação das propriedades das células B-1 e das células B convencionais (B-2).

Property	B-1 cells	Conventional B-2 cells
When first produced	Fetus	After birth
N-regions in VDJ junctions	Few	Extensive
V-region repertoire	Restricted	Diverse
Primary location	Body cavities (peritoneal, pleural)	Secondary lymphoid organs
Mode of renewal	Self-renewing	Replaced from bone marrow
Spontaneous production of immunoglobulin	High	Low
Isotypes secreted	IgM >> IgG	IgG > IgM
Response to carbohydrate antigen	Yes	Maybe
Response to protein antigen	Maybe	Yes
Requirement for T-cell help	No	Yes
Somatic hypermutation	Low to none	High
Memory development	Little or none	Yes

Figure 7-40 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)