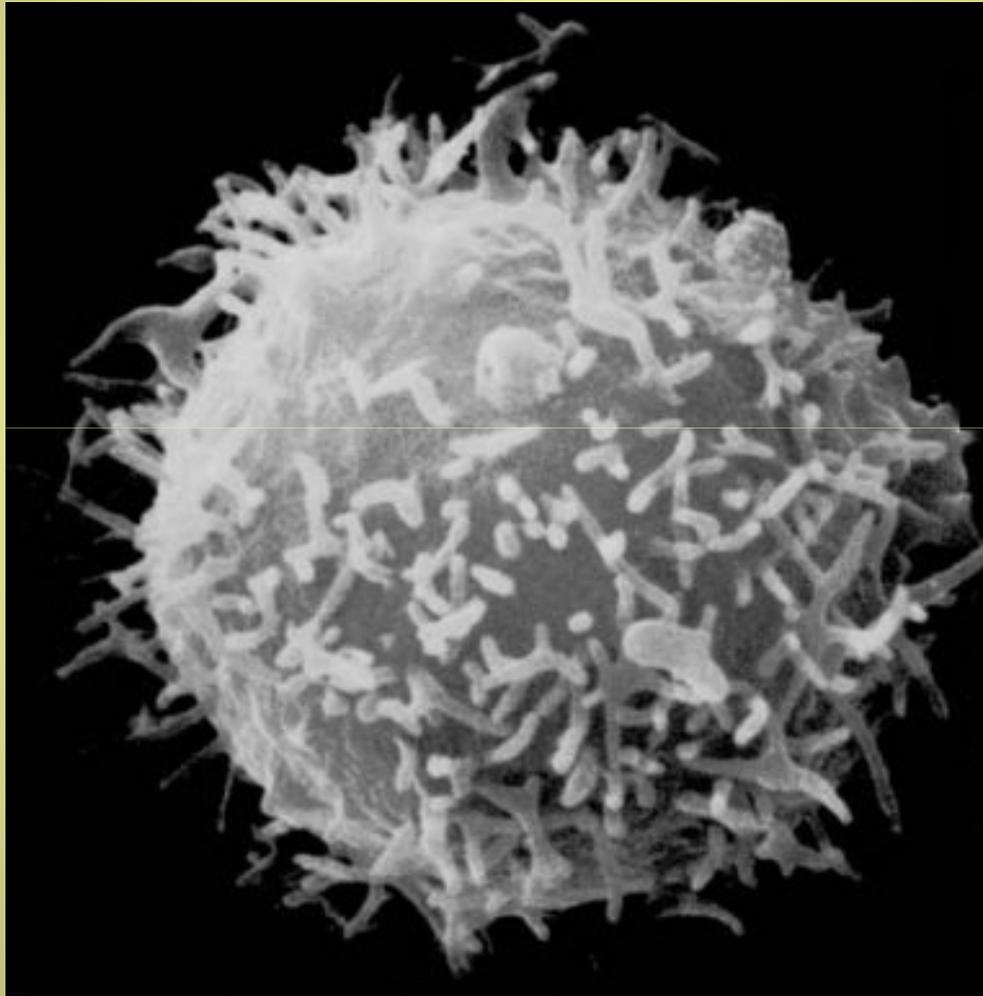


Il linfocita T: La cellula chiave della risposta immunitaria



Argomento della lezione

I linfociti T

Struttura del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Selezione timica:

acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺**

I linfociti T

● **Le cellule T hanno un ruolo cruciale nella risposta immunitaria nei confronti delle cellule neoplastiche e di tutti agenti patogeni, quali:**

- ✓ **Virus.**
- ✓ **Batteri intracellulari.**
- ✓ **Parassiti unicellulari.**

I linfociti T

- Mediano la risposta cellulo-mediata e rispondono ai frammenti peptidici degli Ag proteici assemblati alle molecole MHC di classe I/II e presentati dalle cellule APC e/o dalle cellule bersaglio
- Il recettore che riconosce il complesso MHC/Ag prende il nome di recettore dei linfociti T (TCR) e i segnali biochimici che seguono al riconoscimento dell'Ag sono trasdotti da proteine dette CD3 e ζ .
- Il linfocita T esprime altre molecole che non partecipano alla risposta agli Ag e sono dette molecole accessorie

Argomento della lezione

I linfociti T

Struttura del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Riarrangiamento genico delle catene α e β

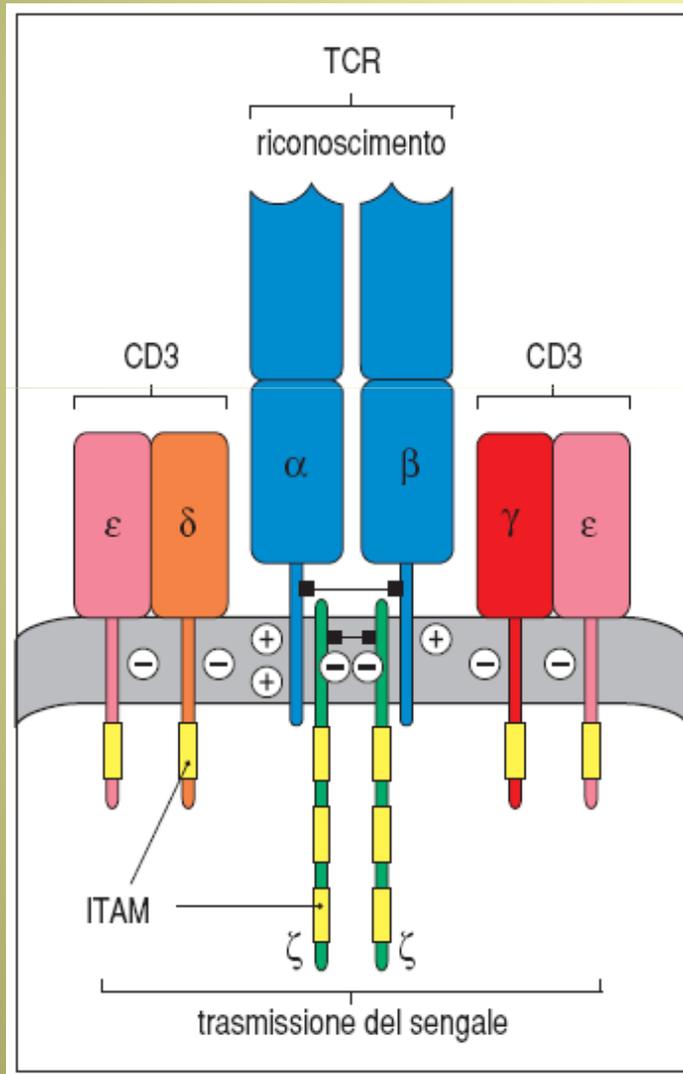
Selezione timica:

acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

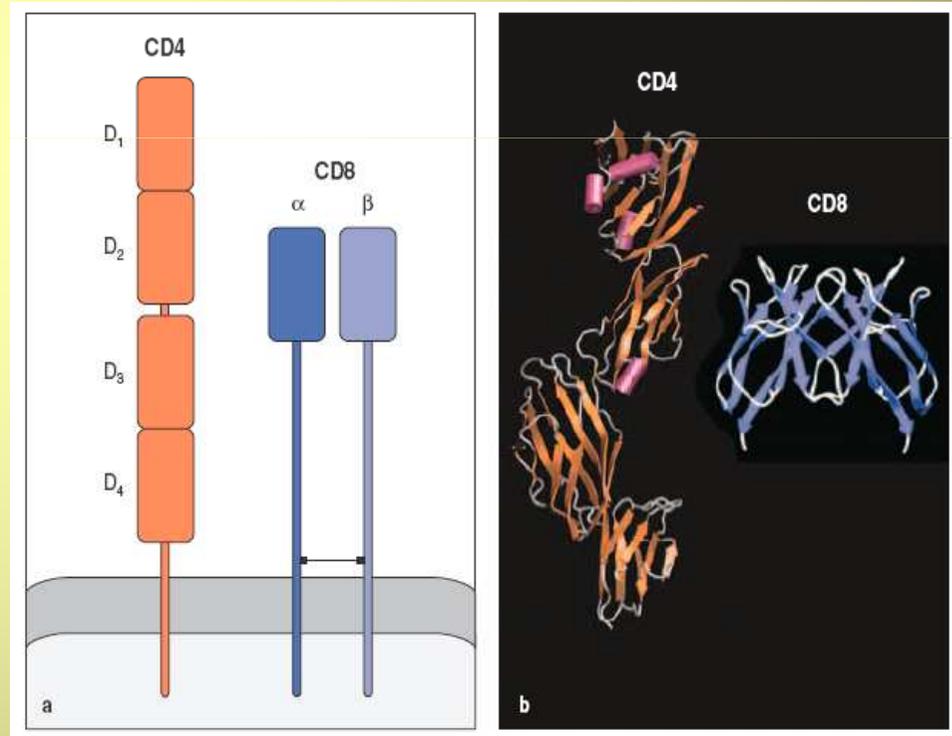
Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺

Struttura del complesso del recettore della cellula T (TCR e CD3) e dei corecettori CD4 e CD8

TCR/CD3



CD4/CD8



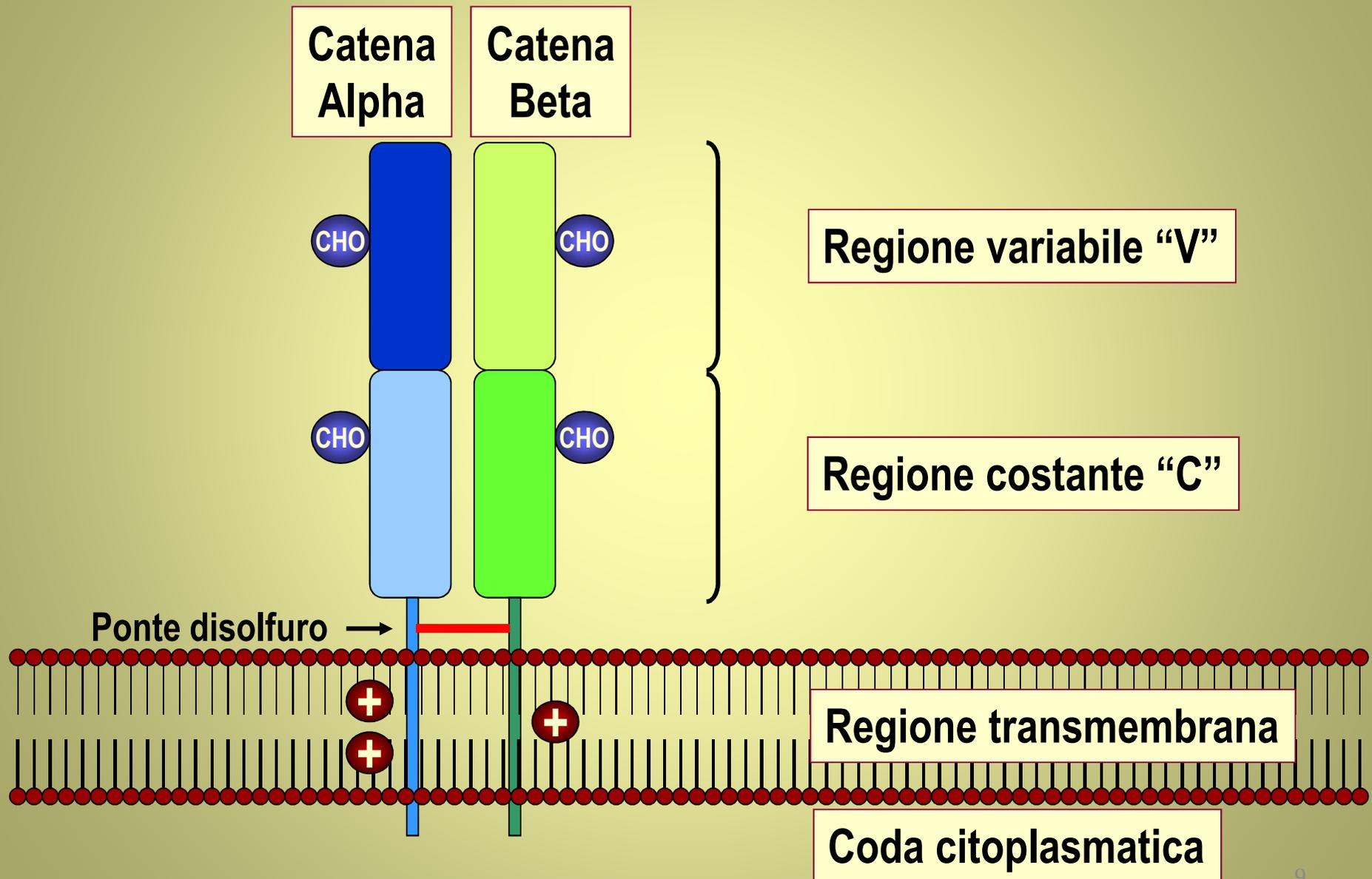
T Cell Receptor (TCR)

- Il TCR dei linfociti T helper (CD4) e citotossici (CD8) è un eterodimero, formato dalle catene α e β .
- Ogni clone di cellule T esprime un TCR con un'unica sequenza.
- Possono esserci da 10^{15} a 10^{18} cloni di cellule T con differenti TCR generati dai riarrangiamenti dei segmenti V(D)J, come per le Ig.

Struttura del T Cell Receptor (TCR)

- Due catene α e β , di uguale lunghezza
- Le due catene consistono di una regione variabile (V) e una costante (C)
- La catena α ha i segmenti V e J
- La catena β ha i segmenti V , D e J
- Una piccola popolazione di cellule T ha un TCR con catene γ e δ . Il TCR $\gamma\delta$ ha specificità differenti dal TCR $\alpha\beta$

Struttura del TCR α/β



T Cell Receptor Complex

- Le catene α e β del TCR sono espresse sulla superficie delle cellule T insieme al complesso **CD3** e da due catene identiche ζ (zeta).
- Il CD3 e la catena ζ non legano l'Ag, ma trasducono il segnale di attivazione.

Il complesso CD3

□ Molecole:

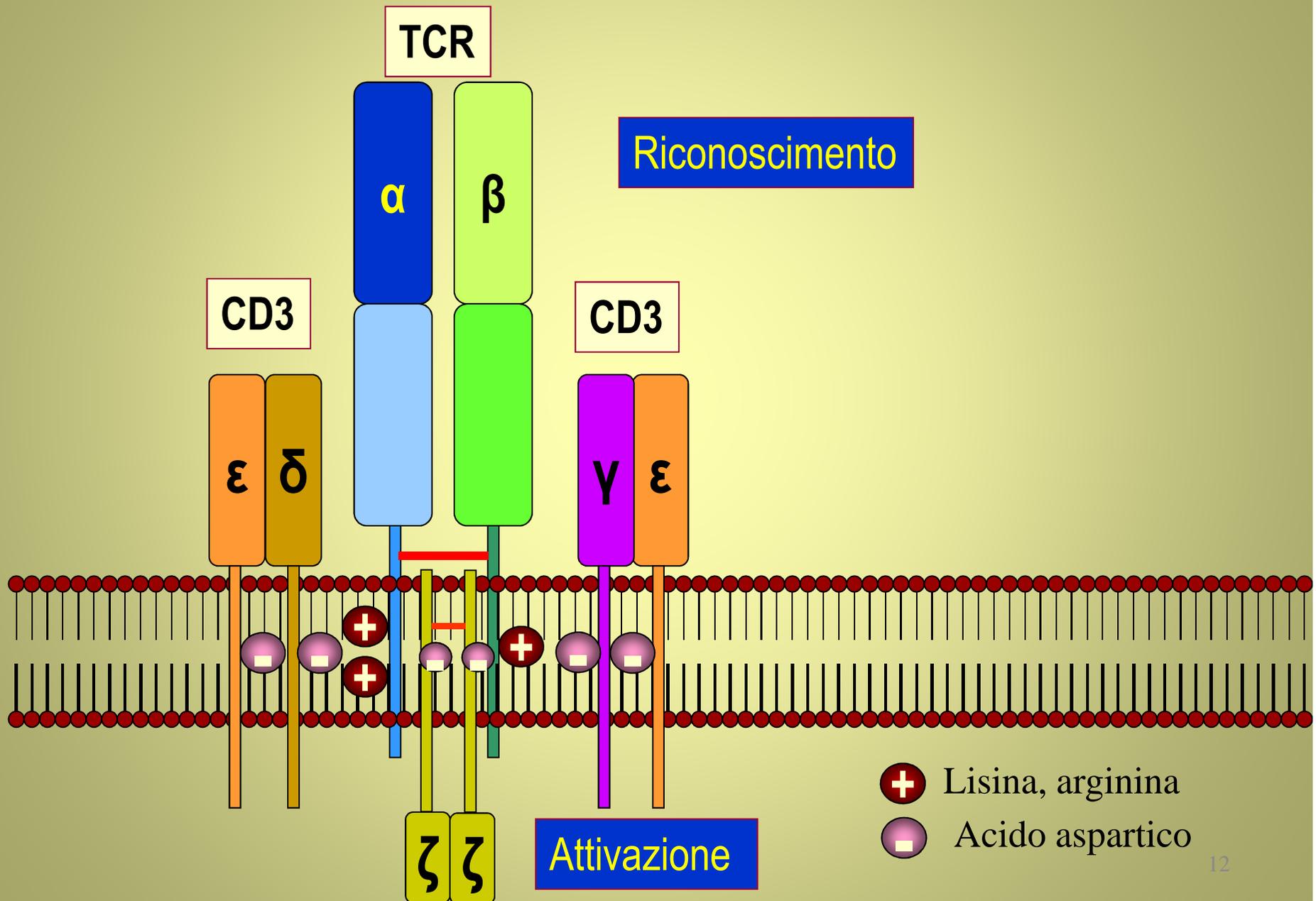
gruppo di 4 proteine (1 γ , 1 δ , 2 ϵ) e da 2 proteine ζ

□ Funzione:

❖ sono sintetizzate ed espresse insieme al TCR, necessarie per l'espressione del TCR in superficie;

❖ trasducono il segnale di attivazione quando il TCR riconosce il complesso MHC-peptide

T Cell Receptor Complex



Co-recettori

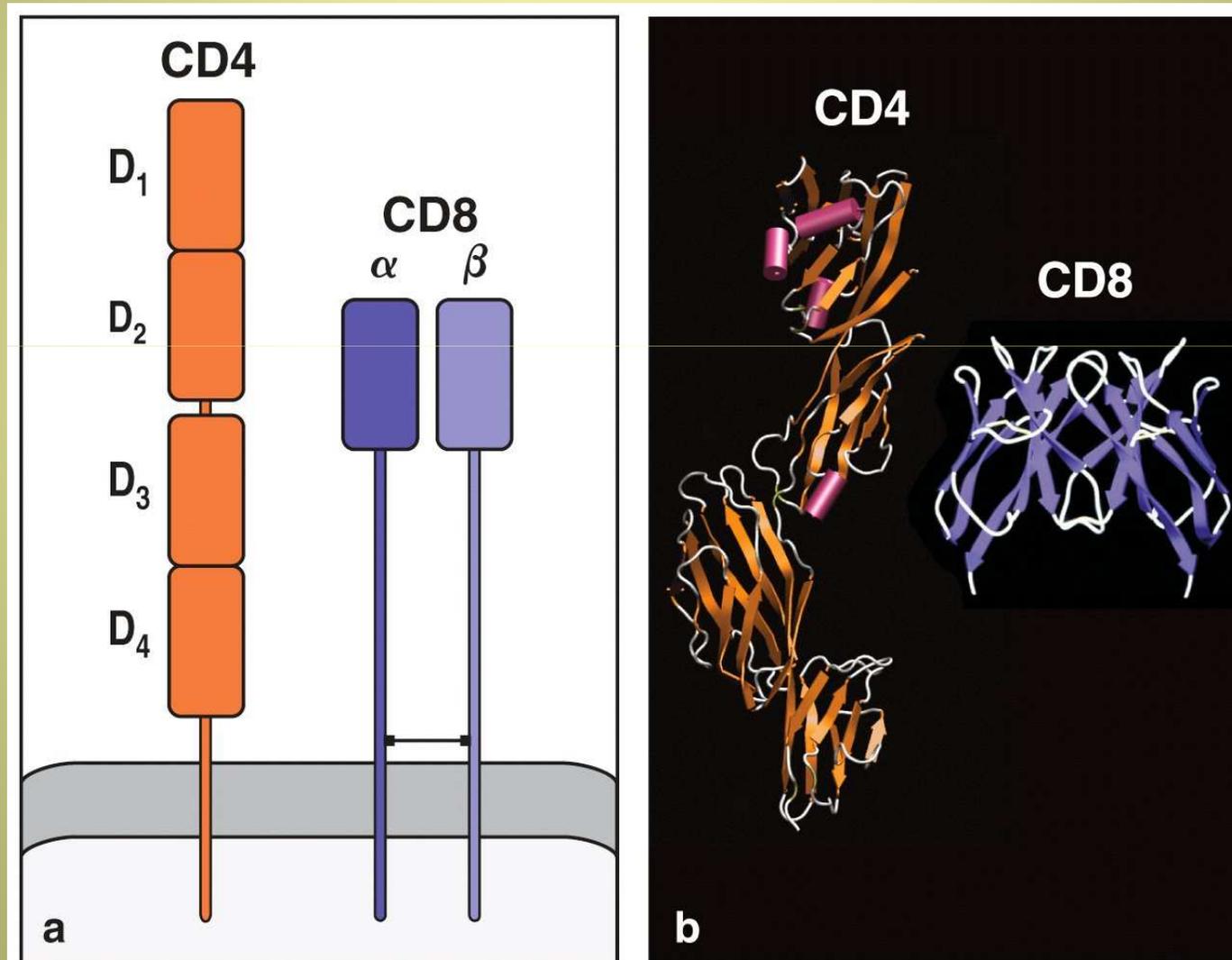


Figure 3-15 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Co-recettori o Molecole accessorie implicate nell'interazione Cellula-Cellula

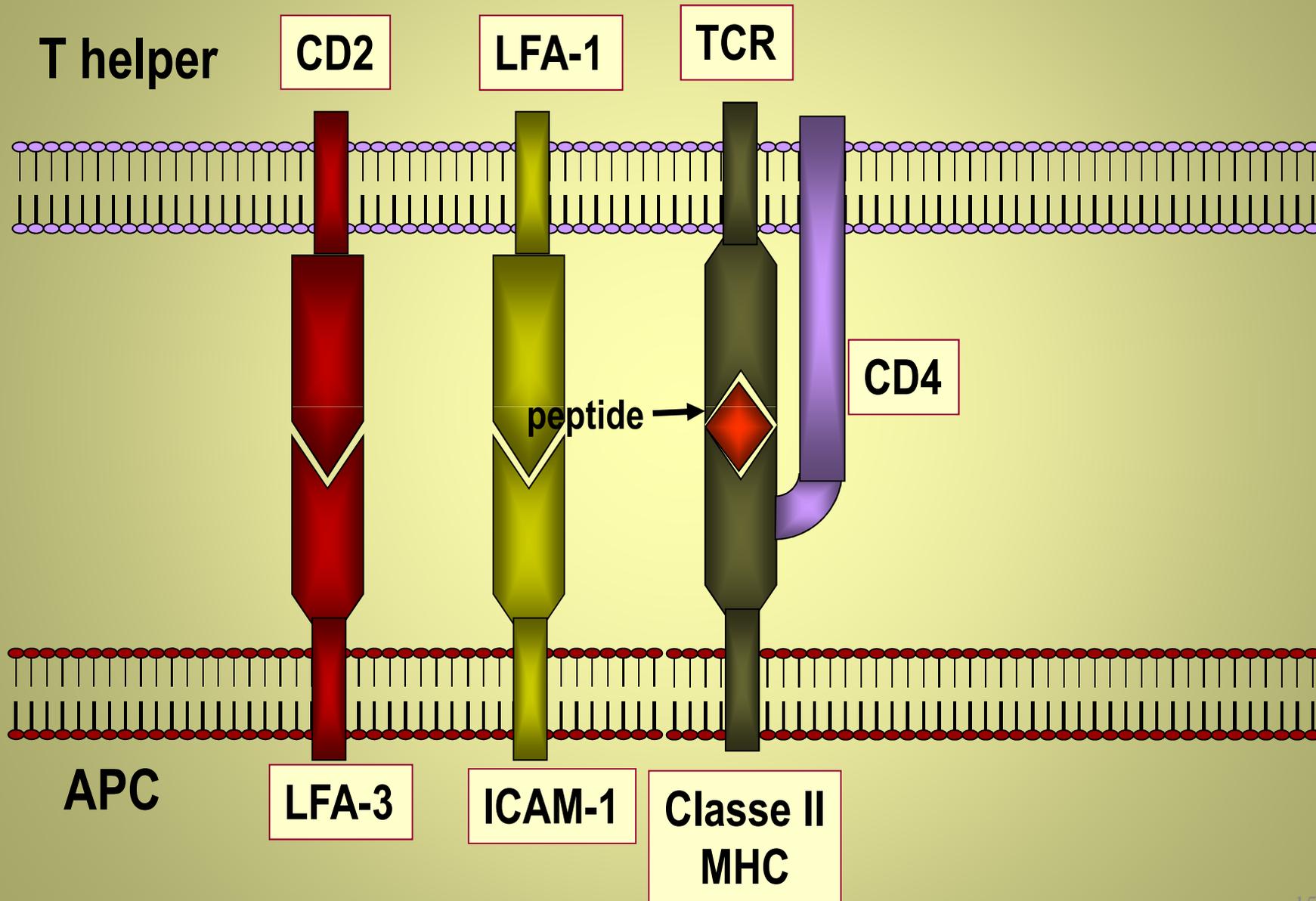
Sono molecole espresse dalla cellula T che interagiscono con i ligandi espressi dalla cellula APC/target quando il TCR riconosce il complesso MHC-peptide

- | <u>Cellula T</u> | <u>Ligandi su APC/target</u> |
|------------------|------------------------------------|
| • CD4 | classe II MHC (dominio $\beta 2$) |
| • CD8 | classe I MHC (dominio $\alpha 3$) |
| • CD2 (LFA-2) | LFA-3 (CD58) |
| • LFA-1 | ICAM-1, ICAM-2 |

LFA = Leukocyte Function-associated Antigen

ICAM = InterCellular Adhesion Molecule

Interazione tra Th ed APC



Argomento della lezione

I linfociti T

Struttura del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Riarrangiamento genico delle catene α e β

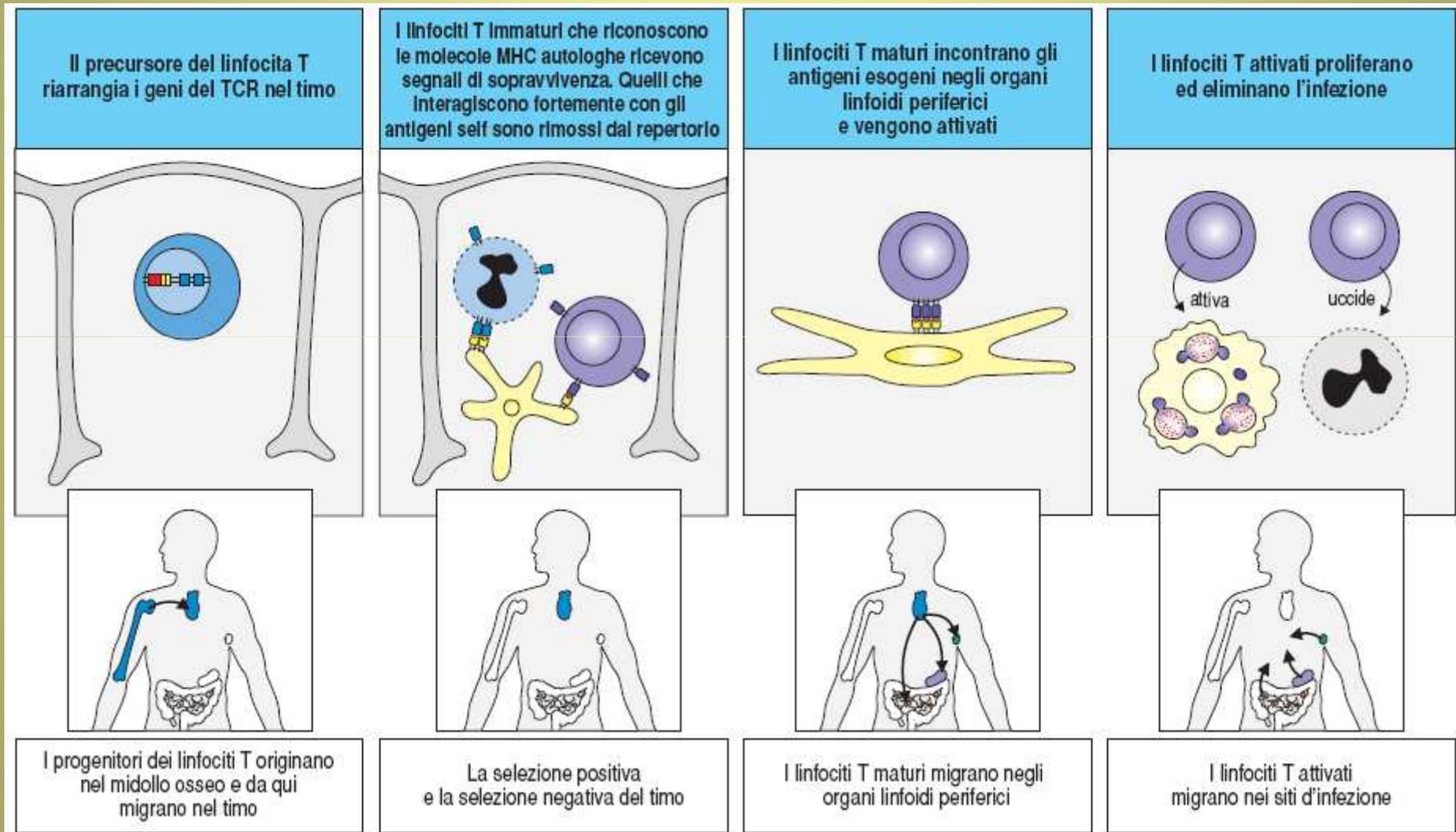
Selezione timica:

acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

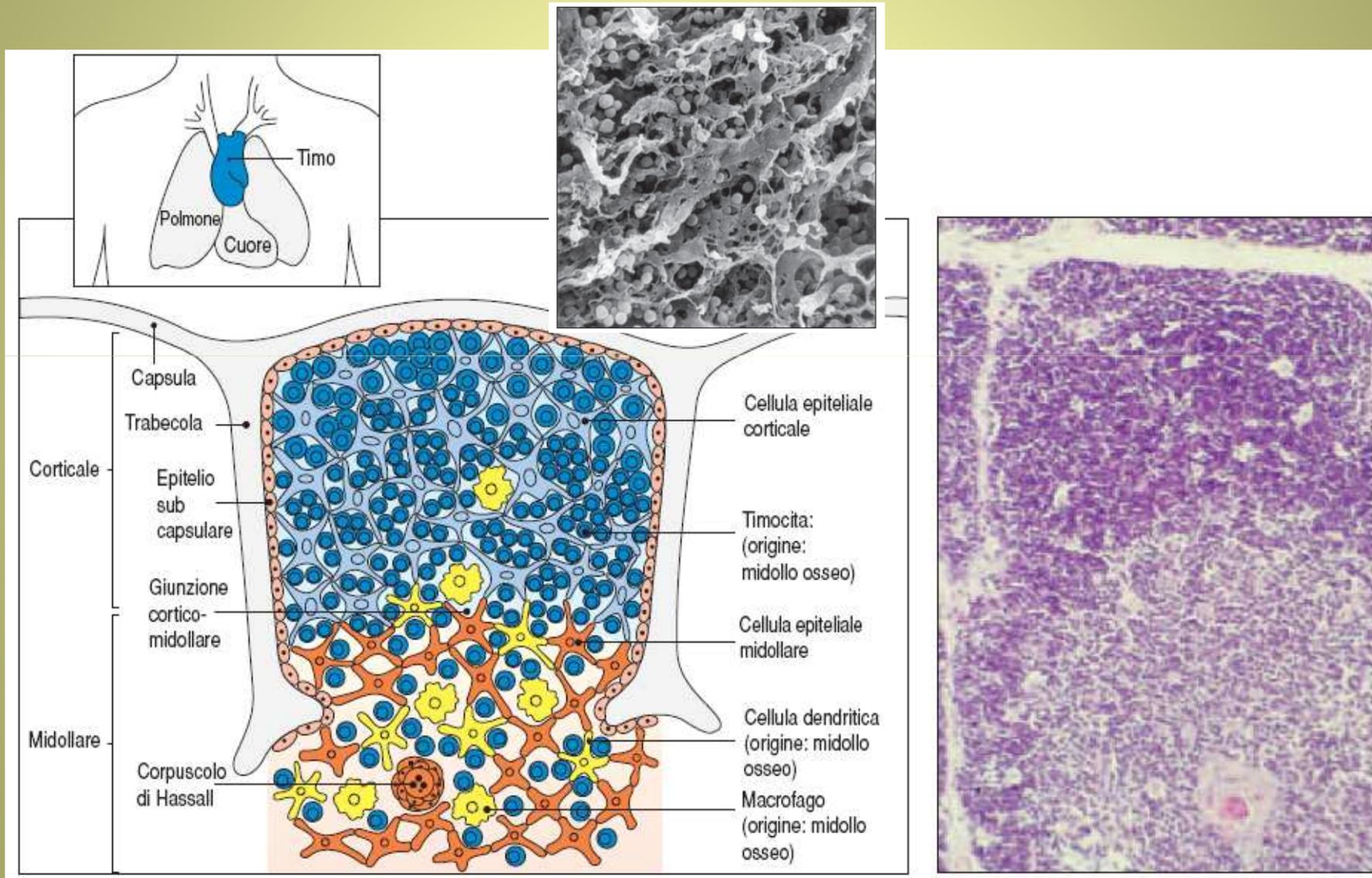
Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:

helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺

Dalla cellula staminale unipotente alla due cellule T

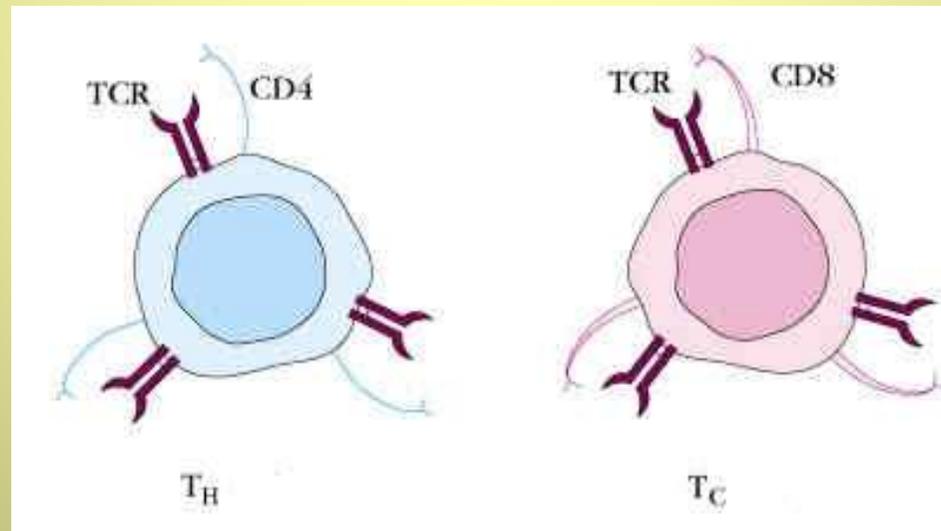


Struttura del timo: Le cellule epitelio-reticolari controllano la maturazione delle cellule T



Funzione del timo

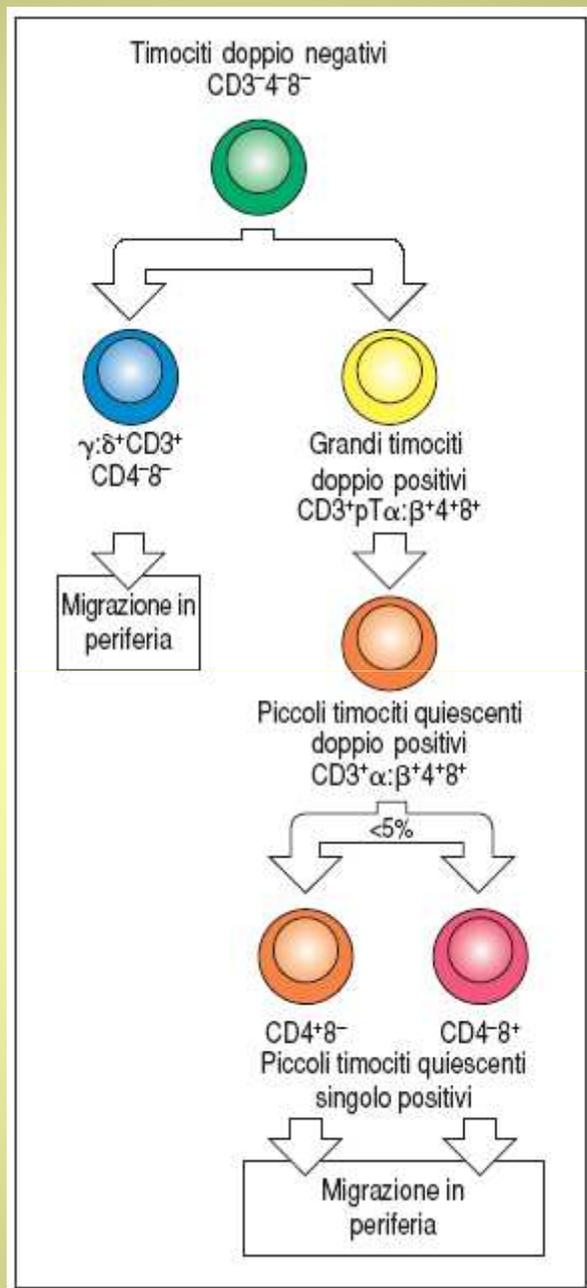
- ❖ acquisizione del recettore per l'antigene (**TCR**), **CD3** e dei due corecettori **CD4⁺** e **CD8⁺**
- ❖ acquisizione della **restrizione da MHC** e della **tolleranza al self**
- ❖ differenziazione in due sottopopolazioni specializzate: **helper (Th) CD4⁺** e **citotossici (Tc) CD8⁺**

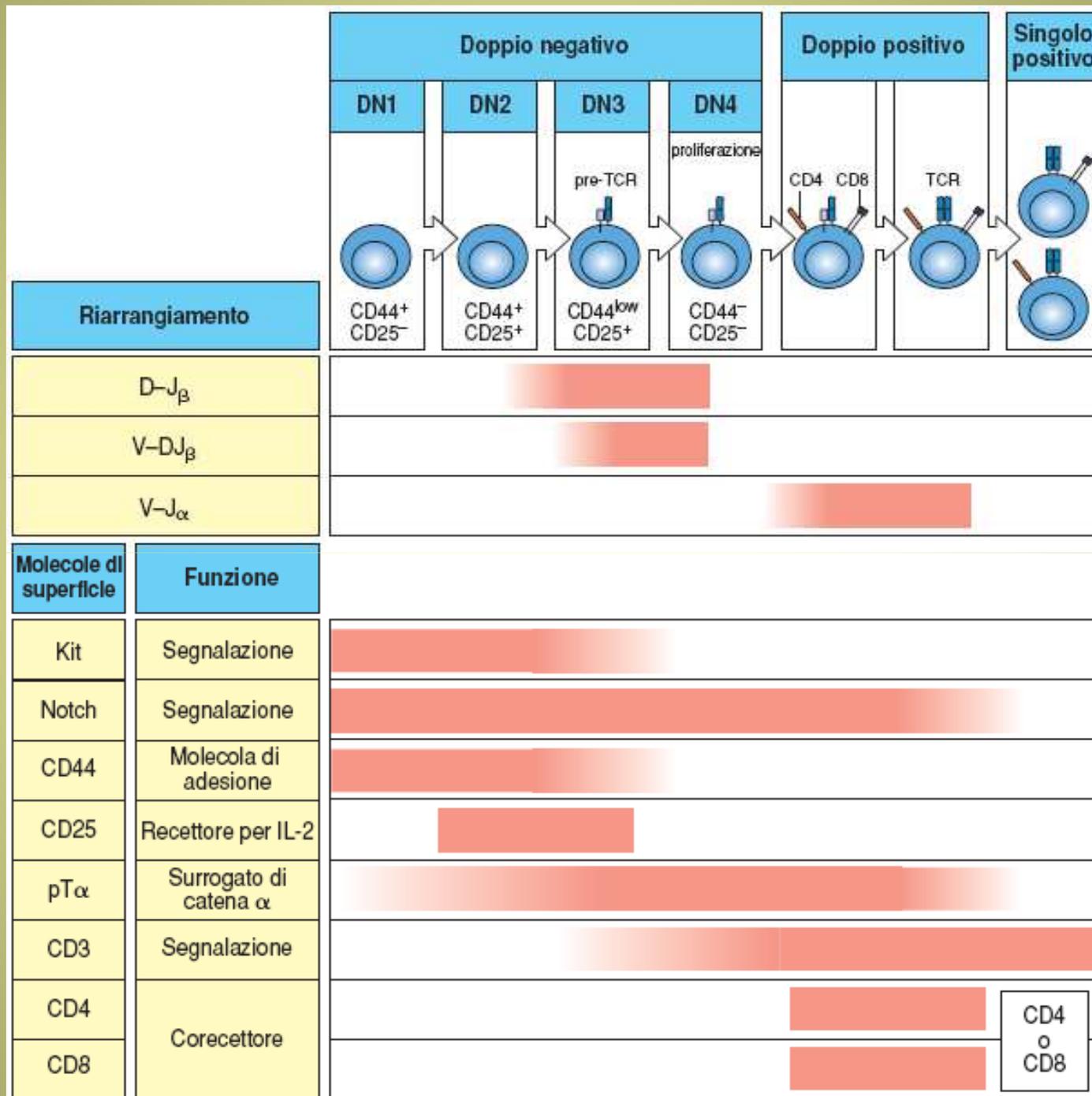


La maturazione dei linfociti T (timociti) può essere studiata analizzando le molecole CD4⁺ e CD8⁺. In base alla assenza/presenza sulla membrana di questi due marcatori fenotipici, i timociti possono essere suddivisi in quattro sottopopolazioni:

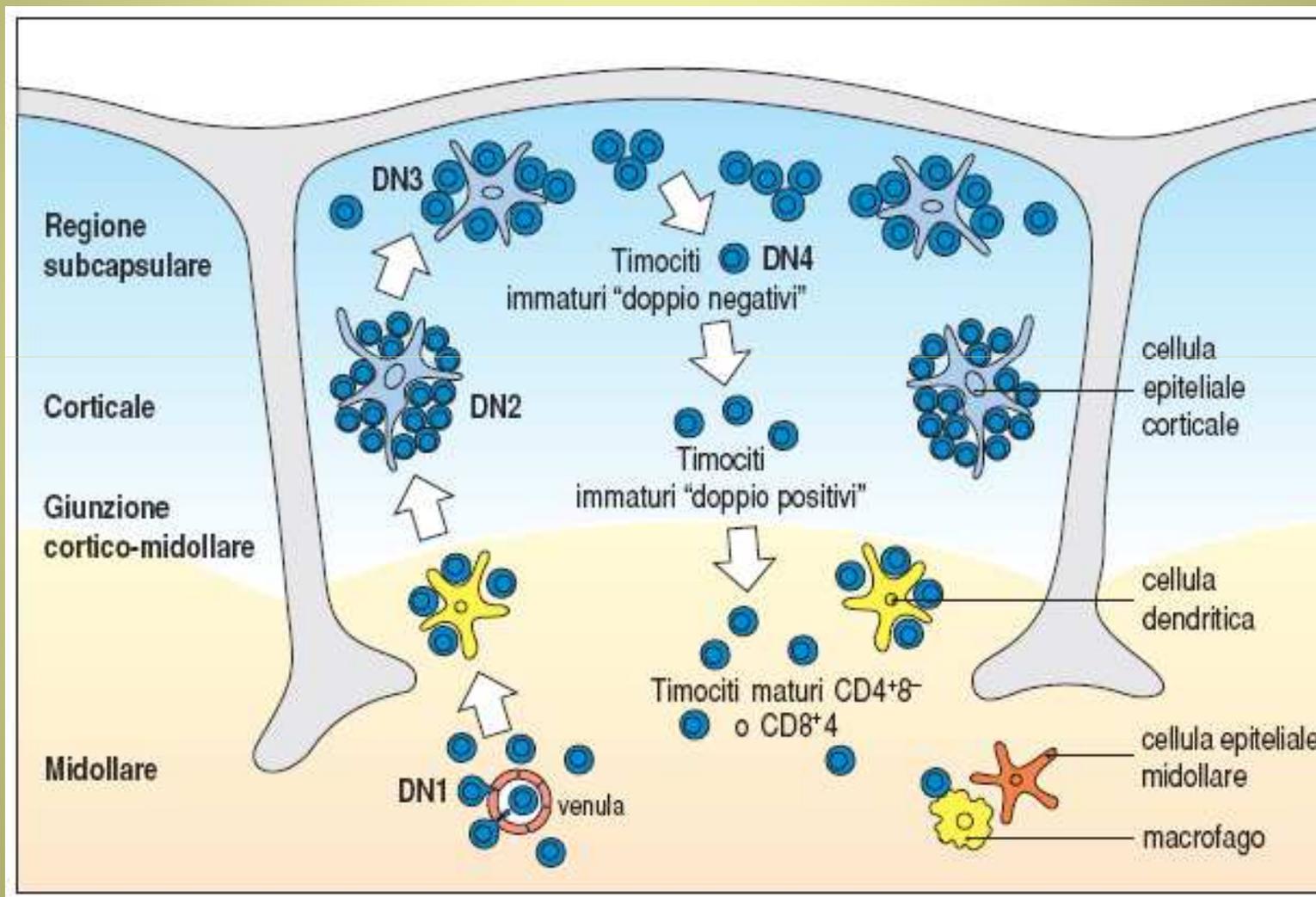
- **cellule doppio-negative, DN (assenza del CD4⁺ e CD8⁺)**
- **cellule doppio-positive, DP (espressione contemporanea del CD4⁺ e CD8⁺)**
- **cellule singolo-positive (SP) CD4⁺**
- **cellule singolo-positive (SP) CD8⁺**

Nel timo sono prodotte due linee cellulari distinte di timociti





Localizzazione nel timo delle sottopopolazione dei timociti



Argomento della lezione

Maturazione dei linfociti T

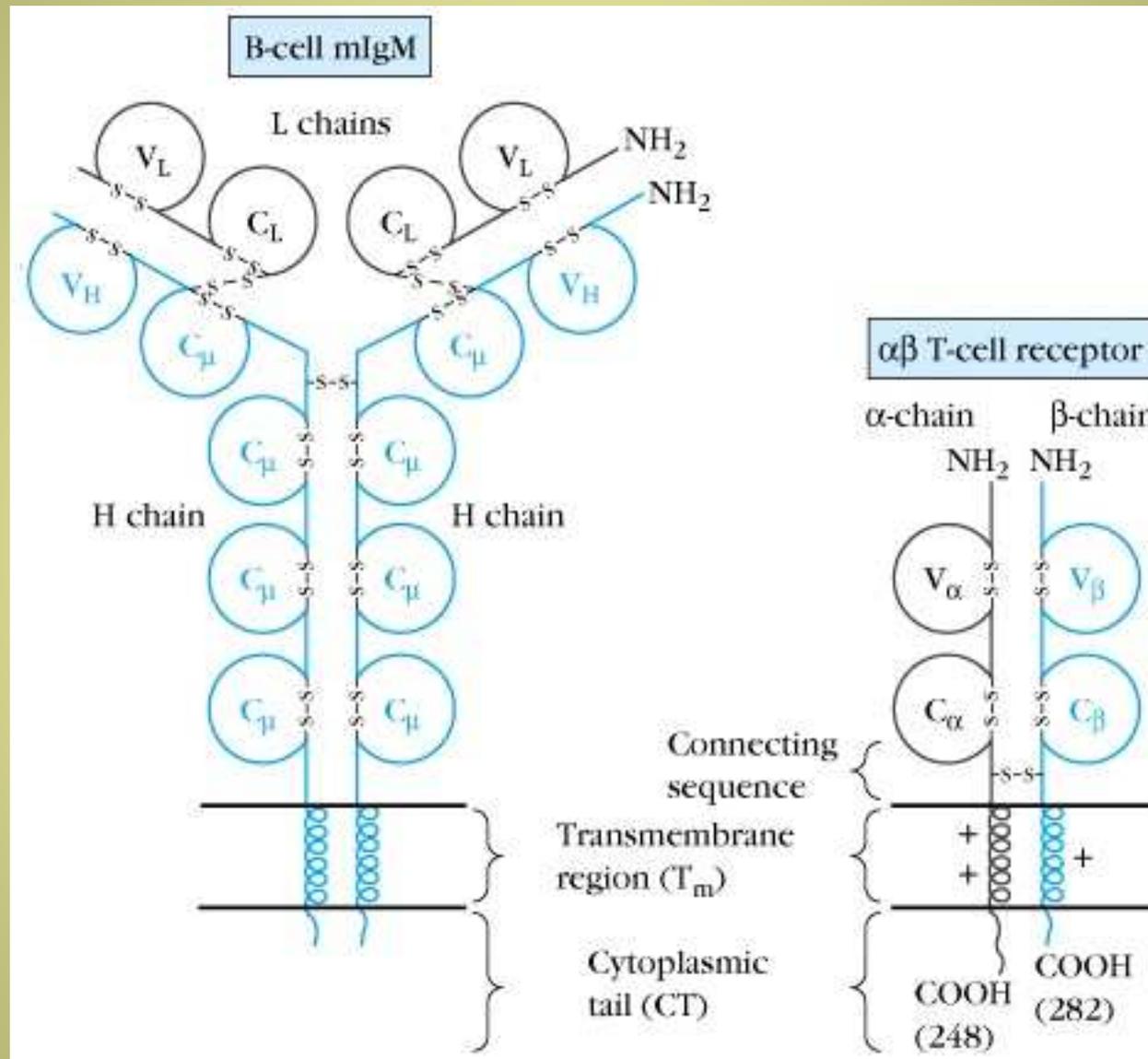
Struttura del timo

Acquisizione del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

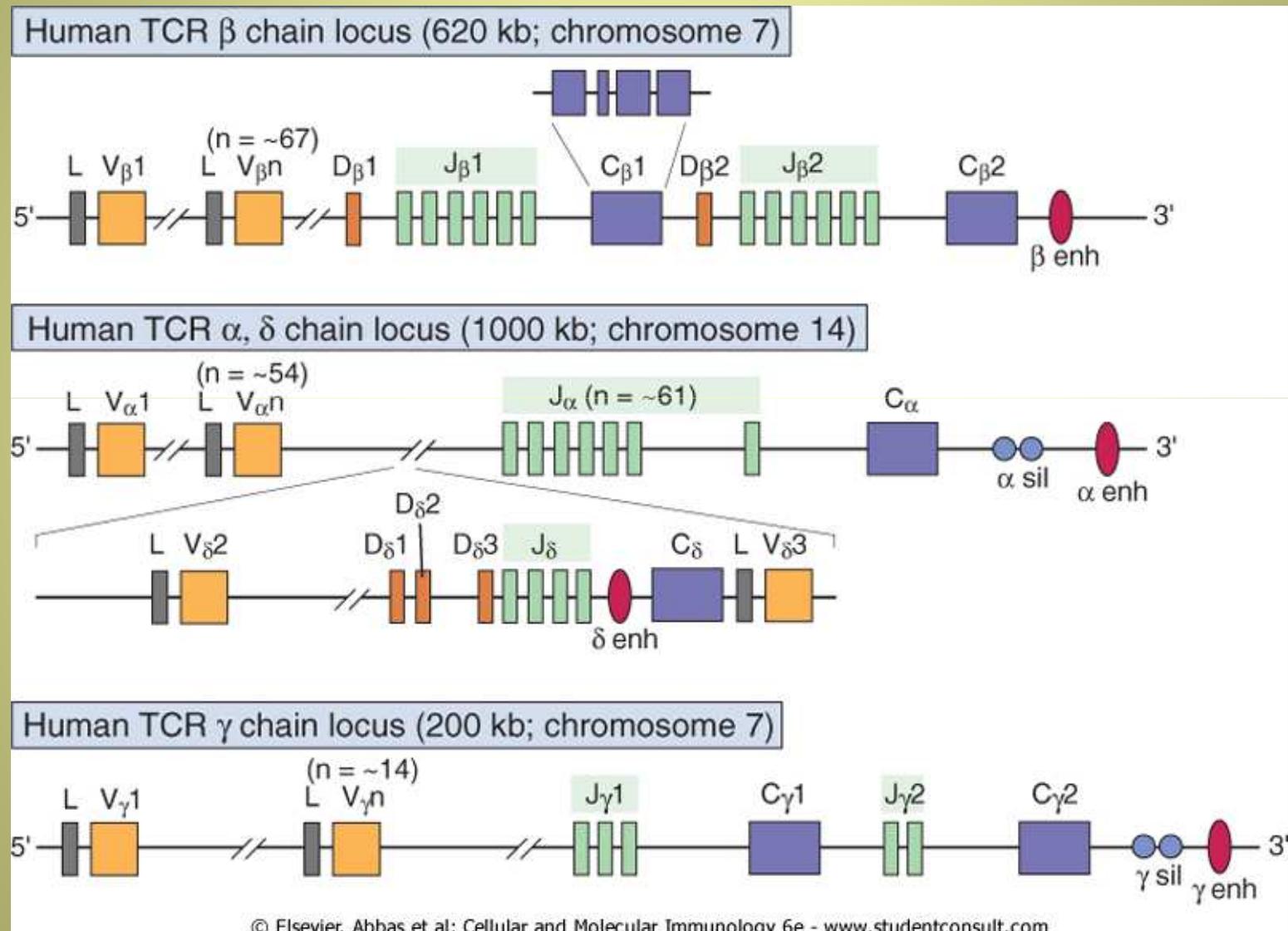
**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4+ e citotossici (Tc) CD8+**



Famiglie multigeniche del TCR nell'uomo

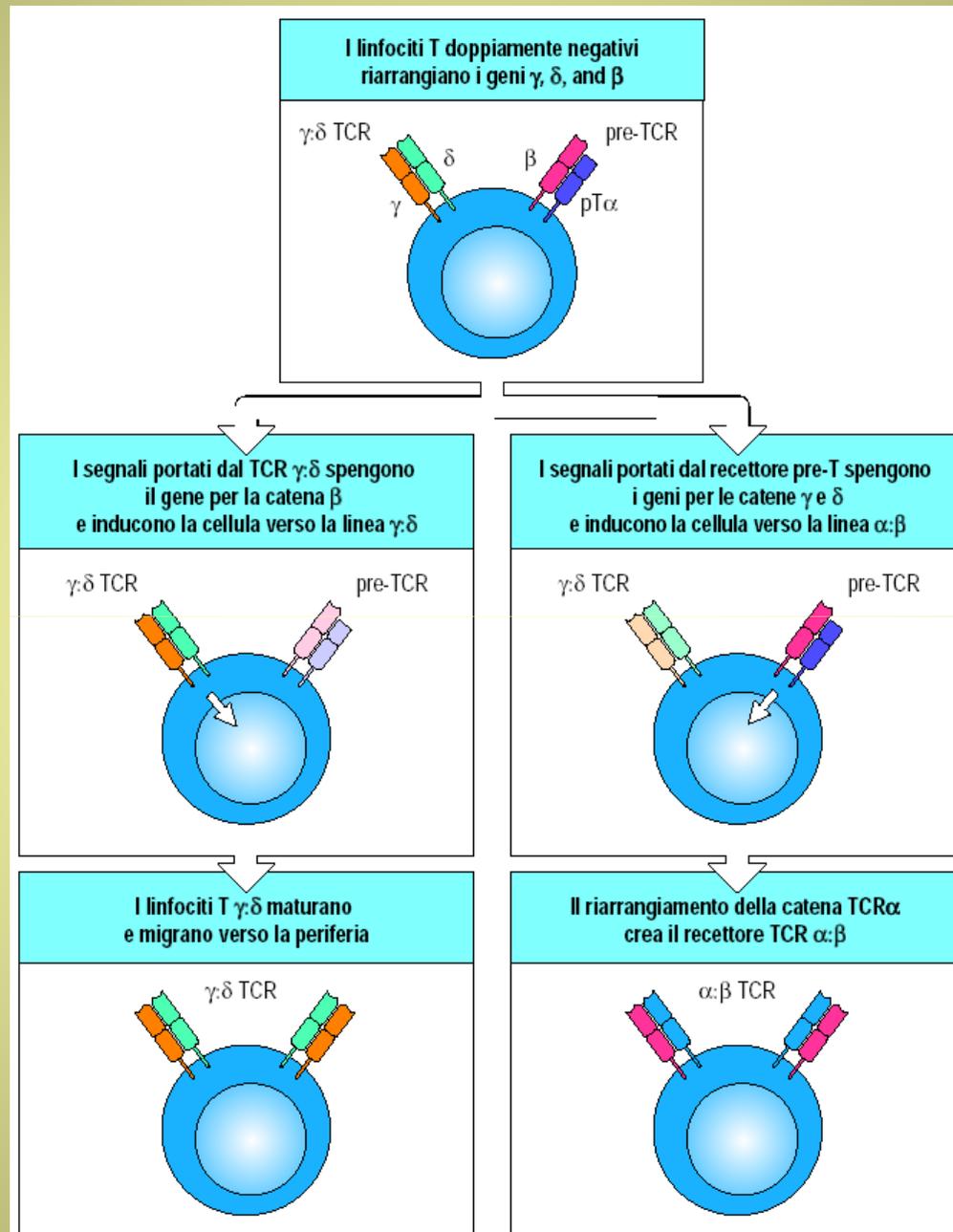
Gene	cromosomi	N° dei segmenti genici			
		V	D	J	C
α Chain	14	50		70	1
δ Chain	14	3	3	3	1
β Chain	7	57	2	13	2
γ Chain	7	14		5	2

Localizzazione dei geni α , β , γ e δ



Maturazione linfociti T

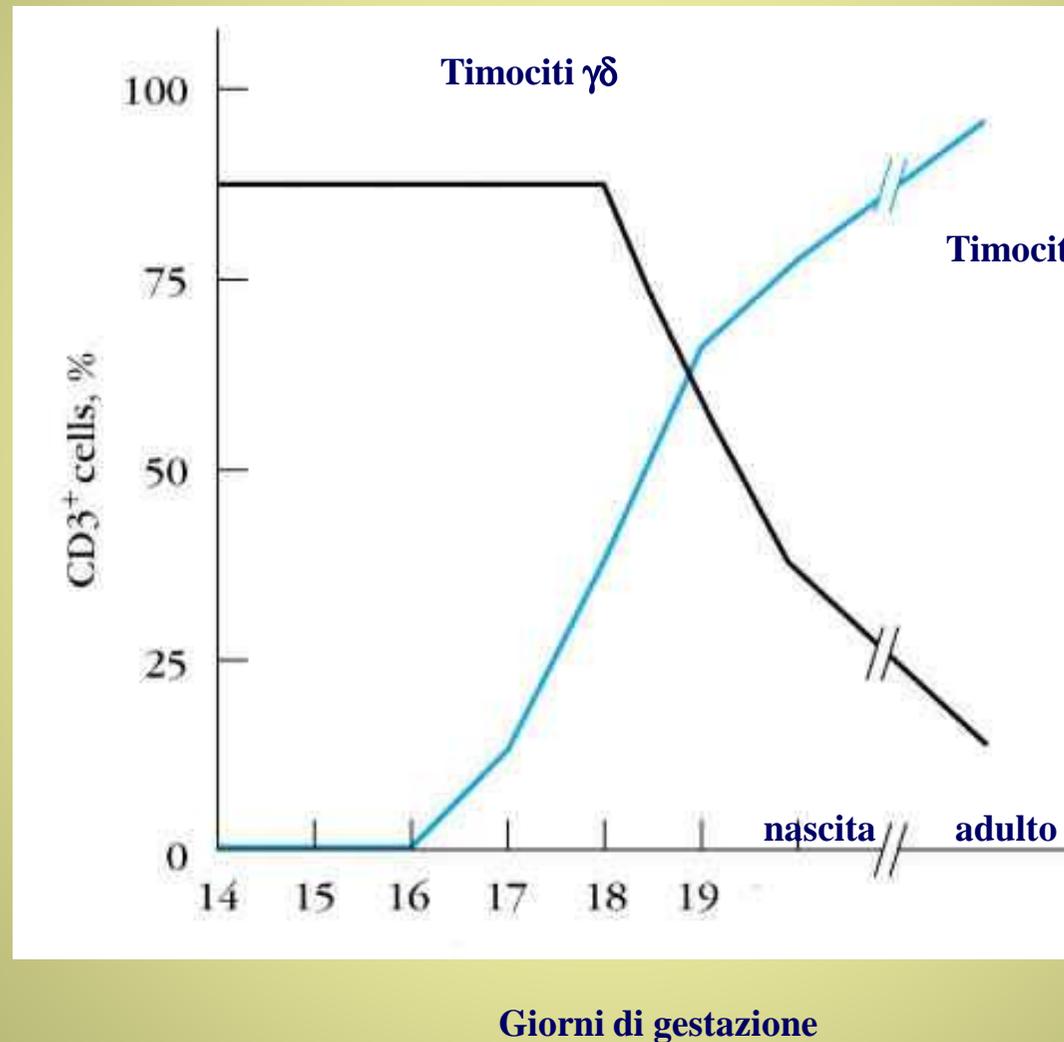
- La maturazione delle cellule T avviene attraverso due possibili vie.
 - 1. nei timociti in cui si ha il riarrangiamento delle catene $\gamma\delta$, si sviluppano le cellule T DN $CD3^+$ TCR $\gamma\delta$ (0.5-1.0% delle cellule T).
 - 2. Nella maggioranza dei timociti si riarrangia prima la catena β del TCR poi la catena α . Le cellule formatesi sono DP $CD3^+$ TCR $\alpha\beta$ ed esprimono ambedue i co-recettori CD4 e CD8
 - Il 95% dei timociti non si matura e muore per apoptosi durante i due processi di selezione timica
- I timociti DP procedono nella maturazione dando origine alle cellule SP $CD4^+$ (10%) o $CD8^+$ (5%).



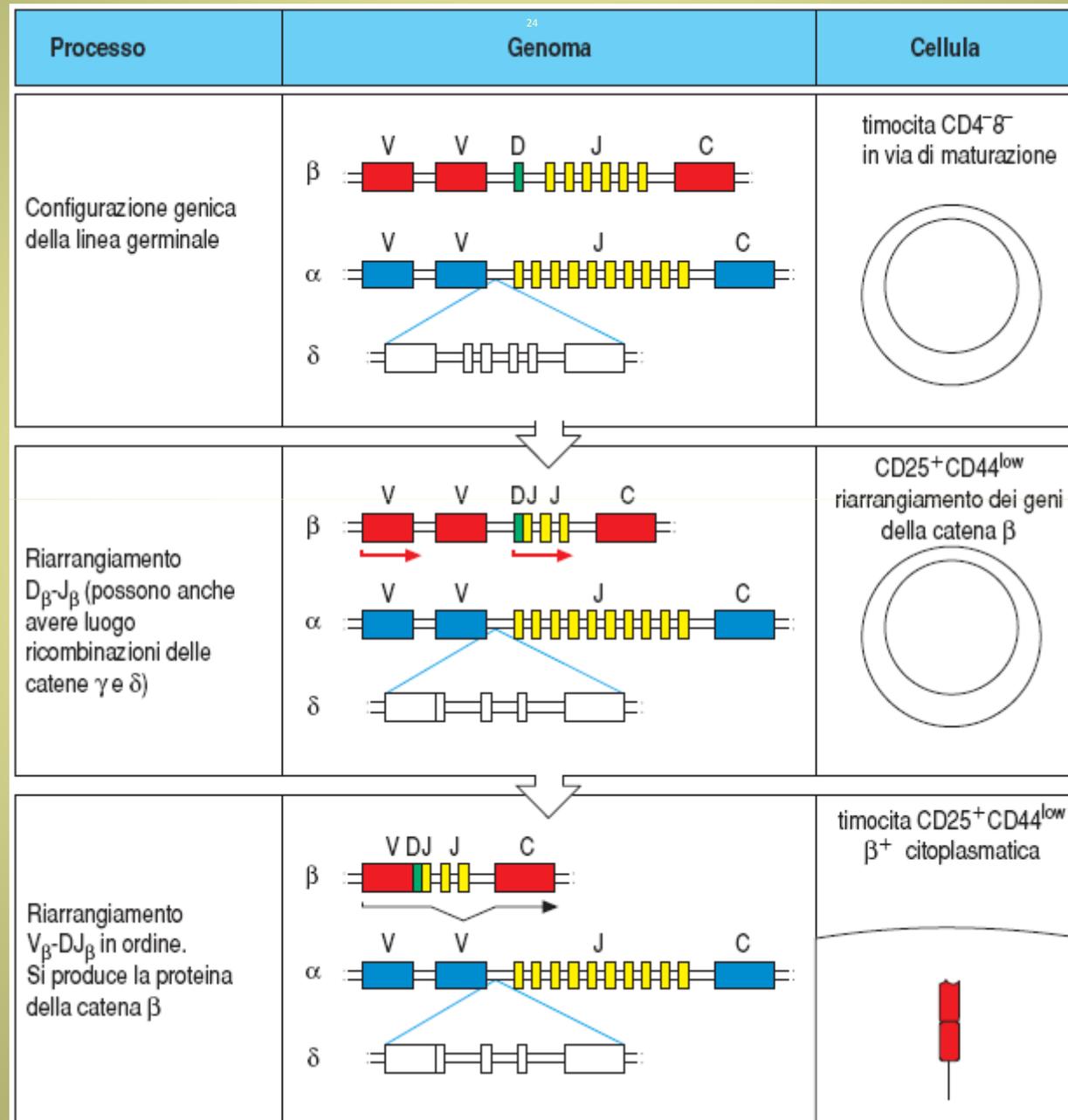
Cellule T $\gamma\delta$

- **Costituiscono la maggioranza delle cellule T dell'epidermide, “Dendritic Epidermal cells (DEC)”, dell'epitelio intestinale, “Intestinal Epithelial lymphocytes (IEL)” e dell'epitelio polmonare.**
- **Rappresentano un importante punto di transizione tra l'immunità innata e quella acquisita costituiscono una prima linea di difesa per la protezione delle superfici epiteliali contro diversi patogeni**

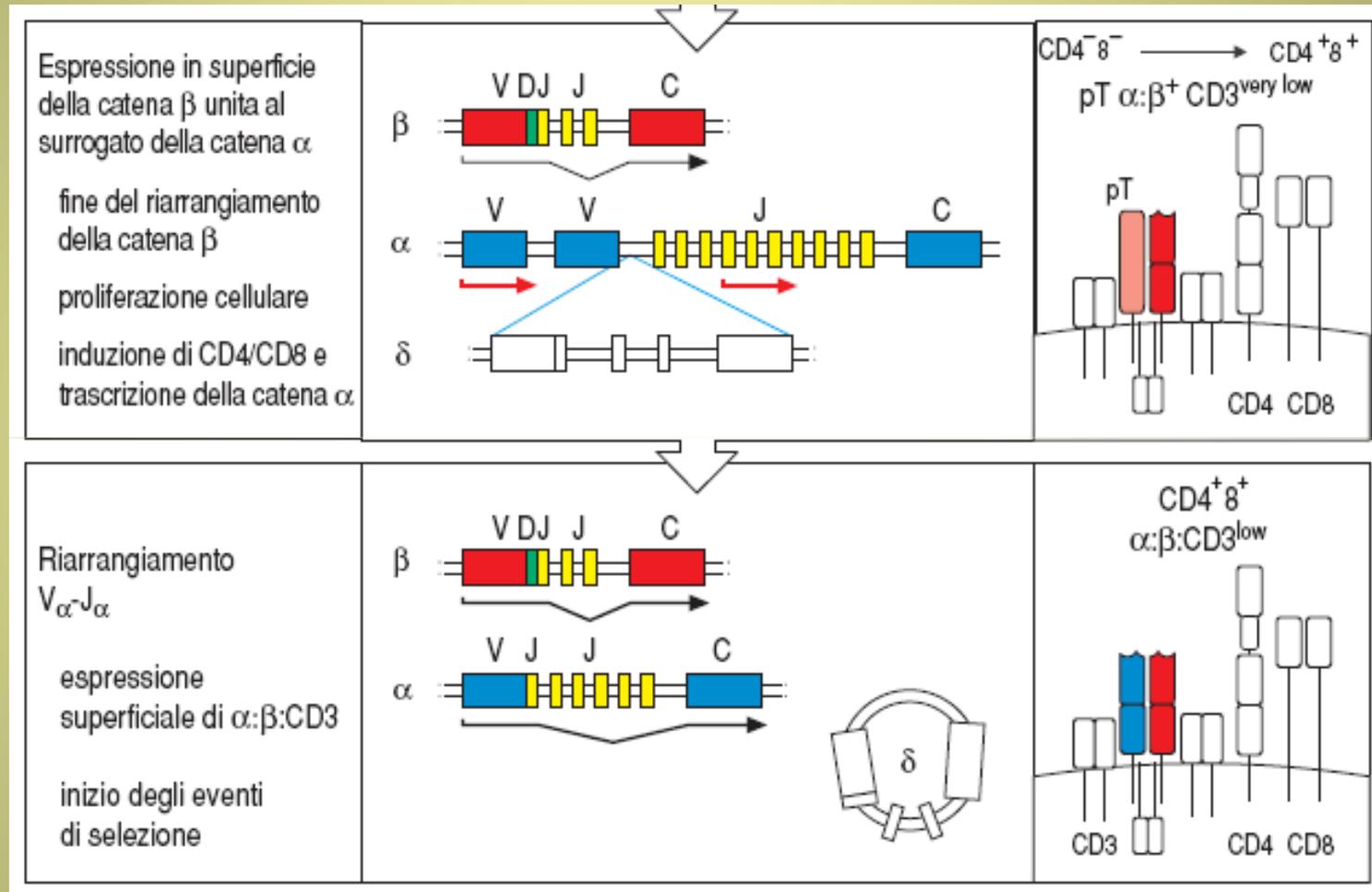
Cinetica della comparsa dei timociti $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ nel timo



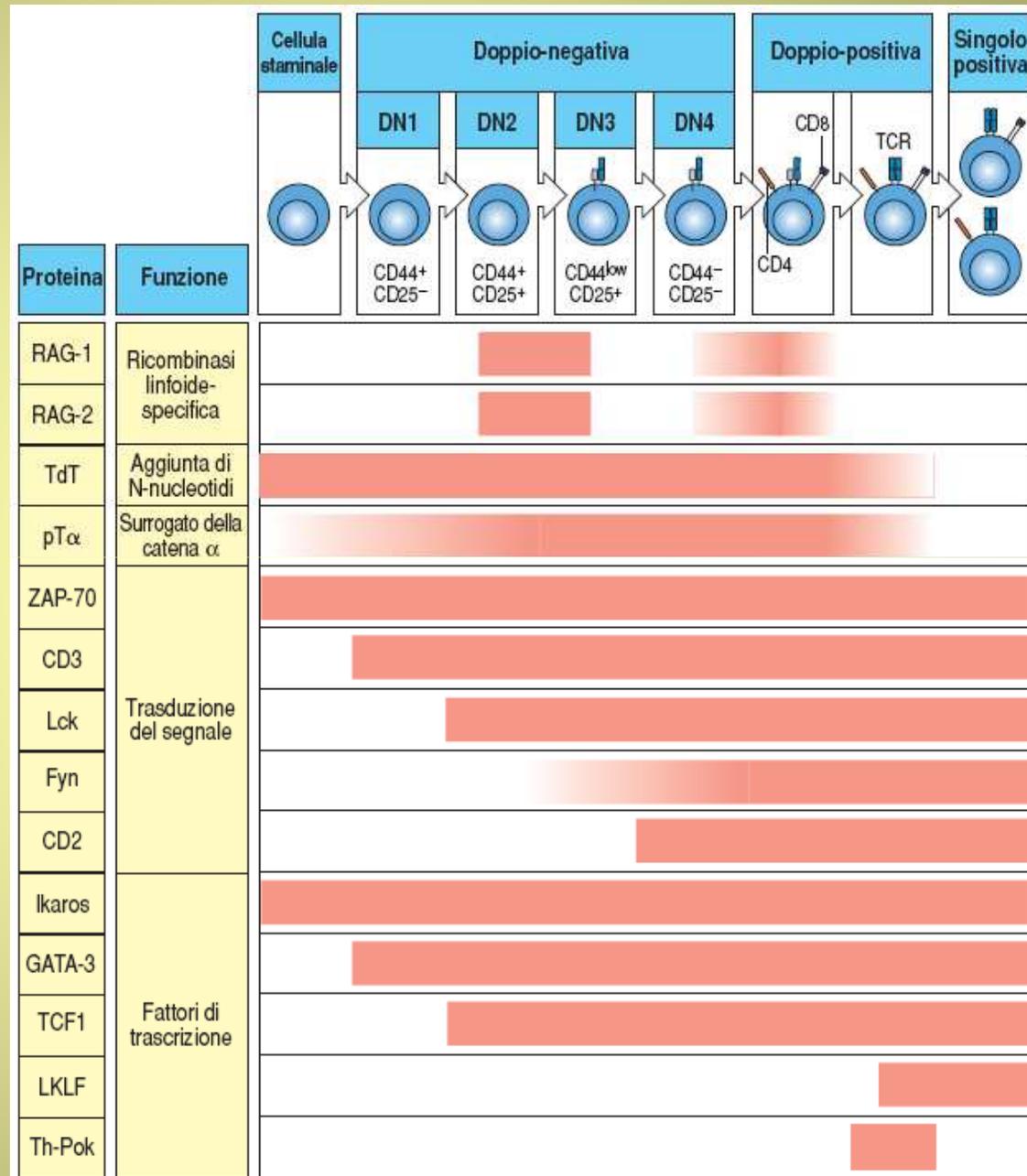
I diversi stadi del riarrangiamento genico dei linfociti $\alpha\beta$ (a)



I diversi stadi del riarrangiamento genico dei linfociti $\alpha\beta$ (b)

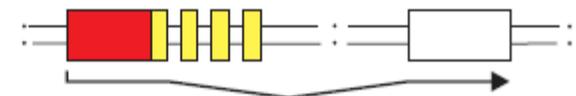
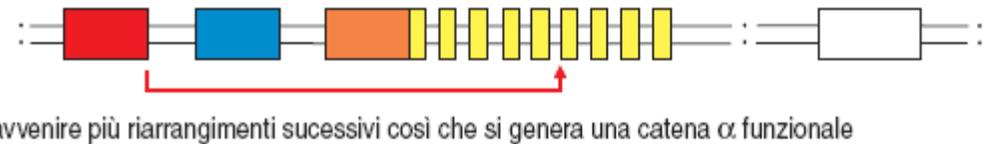
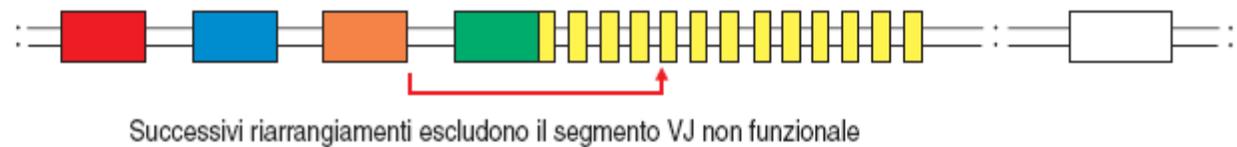
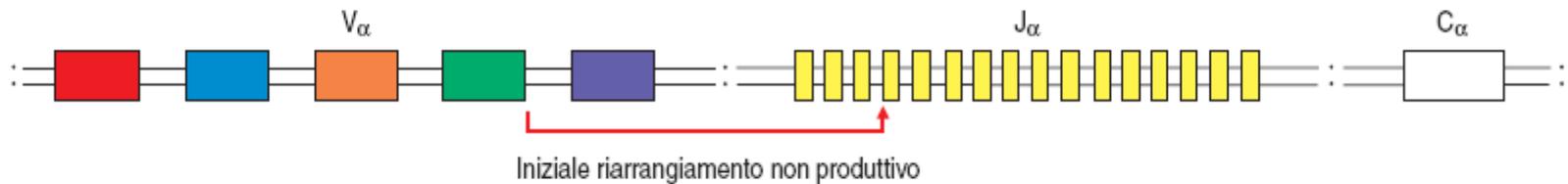


Espressione delle varie proteine in relazione ai diversi stadi di maturazione

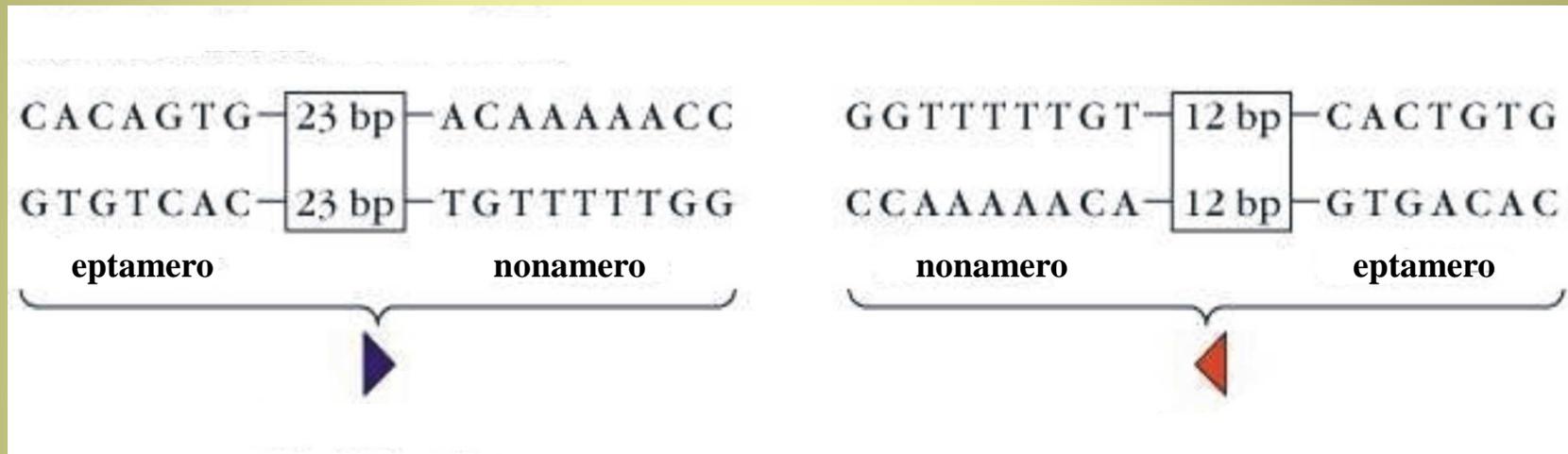


I segmenti genici α possono subire più riarrangiamenti che possono verificarsi in ambedue i cromosomi

Riarrangiamenti ripetuti possono recuperare cellule con giunzioni non produttive $V_{\alpha}J_{\alpha}$



Sequenza nucleotidica delle RSS (sequenze segnale di ricombinazione)



RSS a due giri

RSS a un giro

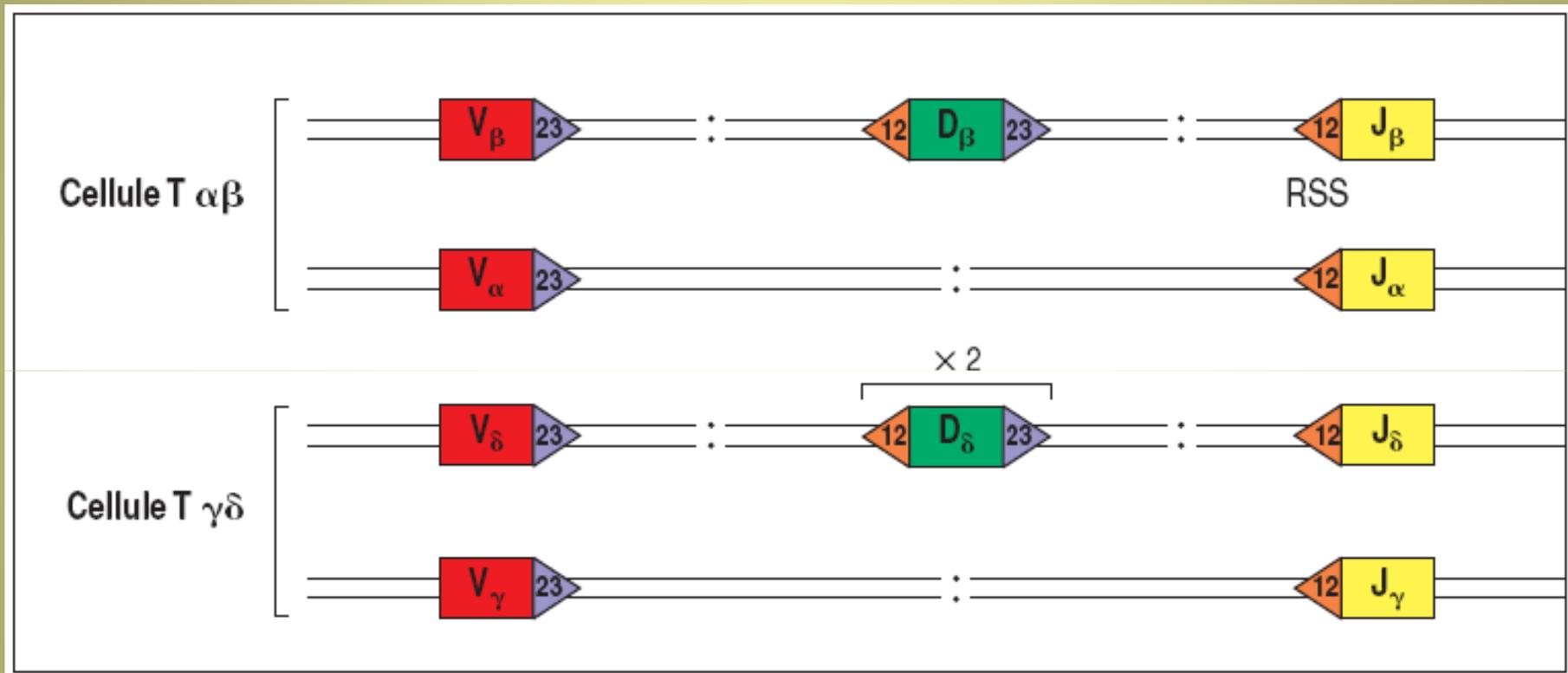
RSS= eptameri e nonameri palindromici conservati

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



Meccanismi all'origine della diversità del TCR $\alpha\beta$

- Presenza di molti **segmenti genici V, D, J** nel DNA germinale;
- Ricombinazione tra **V-J** (catena α) e **V-D-J** (catena β);
- Flessibilità giunzionale e aggiunta di nucleotidi **P** e **N**;
- Associazione tra la catena α e quella β .

Confronto tra le caratteristiche del TCR e delle Ig

	T cell receptor (TCR) 	Immunoglobulin (Ig) 
Components	a and b chains	Heavy and light chains
Number of Ig domains	One V domain and one C domain in each chain	Heavy chain; one V domain, three or four C domains Light chain; one V domain and one C domain
Number of CDRs	Three in each chain for antigen binding; fourth hypervariable region in b chain (of unknown function)	Three in each chain
Associated signaling molecules	CD3 and z	Iga and Igb
Affinity for antigen (K_d)	10^{-5} – 10^{-7} M	10^{-7} – 10^{-11} M (secreted Ig)
Changes after cellular activation		
Production of secreted form	No	Yes
Isotype switching	No	Yes
Somatic mutations	No	Yes

Abbreviations: C, constant; CDR, complementarity-determining region; K_d , dissociation constant; V, variable.

Fattori che contribuiscono alla generazione della diversificazione del repertorio del TCR $\alpha\beta$

Elemento	Immunoglobulina		Recettore $\alpha\beta$	
	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}		$\sim 10^{18}$	

Argomento della lezione

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

Acquisizione del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Selezione timica:

Acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4⁺ e citotossici (Tc) CD8⁺

Selezione timica del repertorio dei linfociti T

Allo stadio di cellule doppio positive i timociti sono sottoposti a due processi di selezione, definite, **selezione positiva e selezione negativa**, che avvengono sulla base dell'affinità del TCR per le molecole MHC-Ag self.

Durante la **SELEZIONE POSITIVA** i timociti “doppio-positivi”, il cui **TCR riconosce con media affinità il complesso “MHC-Ag self”**, espresso dalle cellule epitelio-reticolari, sono selezionate positivamente, vale a dire sono “risparmiate” dalla morte per apoptosi.

Quindi la **SELEZIONE POSITIVA** conferisce alla cellula T la **“RESTRIZIONE DA MHC”**, cioè la capacità di riconoscere l'antigene associato alle molecole MHC self.

I timociti sopravvissuti alla selezione positiva vanno incontro alla **SELEZIONE NEGATIVA**, durante la quale i timociti con **TCR ad elevata affinità per il complesso “MHC-Ag self”**, espresso dai macrofagi e dalle cellule dendritiche, sono eliminati per apoptosi.

La **SELEZIONE NEGATIVA** assicura la **TOLLERANZA AGLI ANTIGENI SELF** associati alle molecole MHC self.

Durante questi due processi le cellule T acquisiscono il **fenotipo e la maturità funzionale**, cioè si formano **cellule T mature singolo-positivo** con capacità funzionali helper o citotossiche.

SELEZIONE POSITIVA E NEGATIVA

CORTECCIA

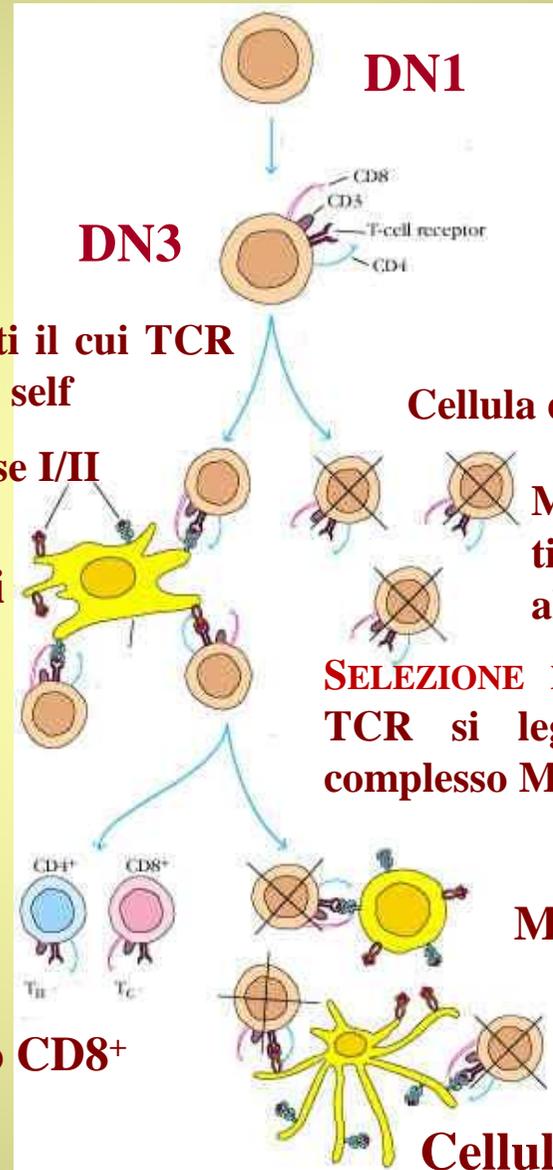
SELEZIONE POSITIVA dei timociti il cui TCR riconosce il complesso MHC-Ag self

DP
Cellule epitelio-reticolari

MEDULLA

SP

Cellule CD4⁺ o CD8⁺



Cellula doppio positiva

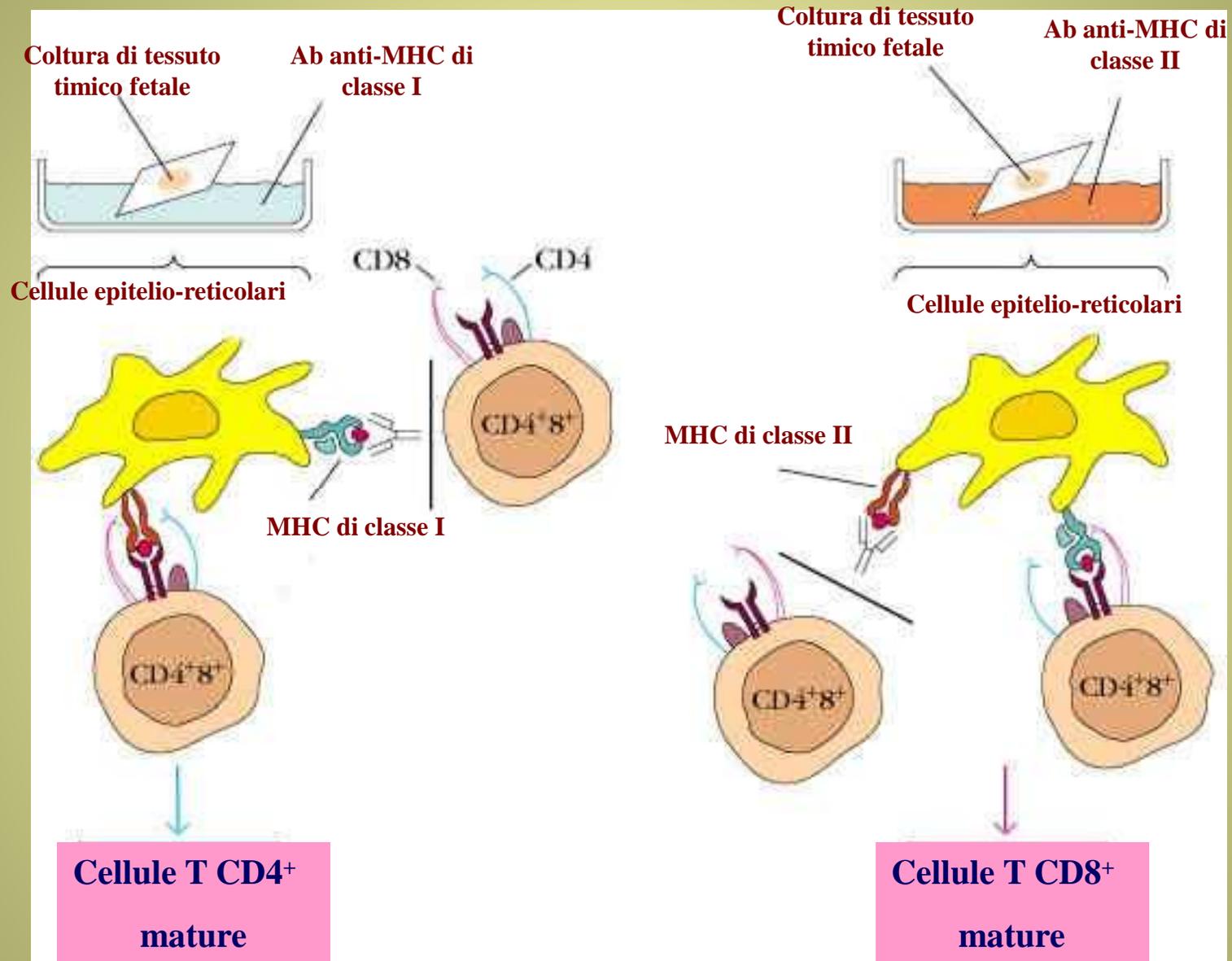
Morte per apoptosi dei timociti il cui TCR non si lega al complesso MHC-Ag self

SELEZIONE NEGATIVA dei timociti il cui TCR si lega con elevata affinità al complesso MHC-Ag self

Macrofagi

Cellula dendritica

Dimostrazione in “vitro” dei processi di selezione



Argomento della lezione

Maturazione dei linfociti T

Struttura del timo

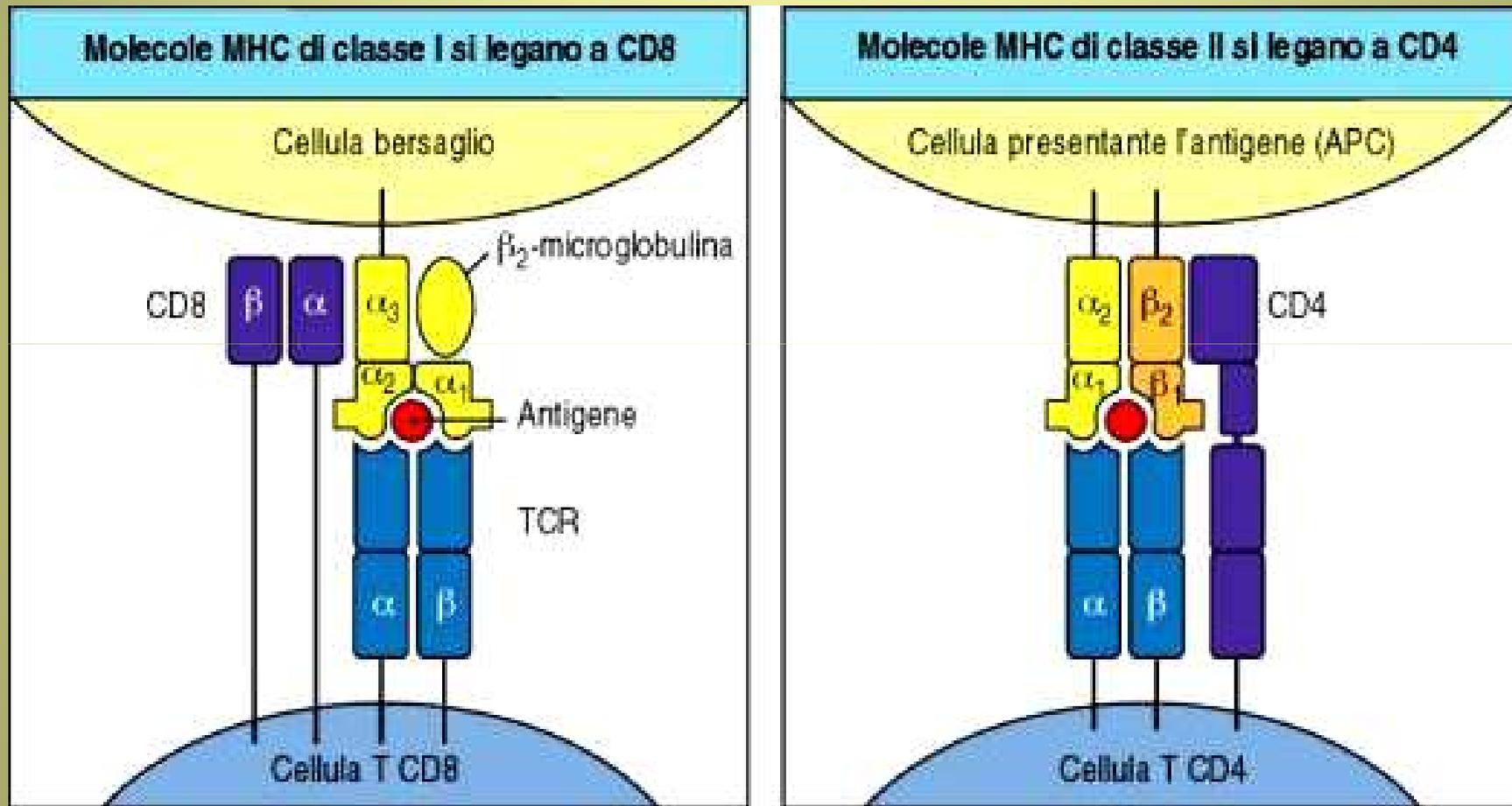
Acquisizione del TCR e dei corecettori CD3, CD4 e CD8

Riarrangiamento genico delle catene α e β

Acquisizione della restrizione da MHC e della tolleranza al self

**Differenziazione in due sottopopolazioni specializzate:
helper (Th) CD4+ e citotossici (Tc) CD8+**

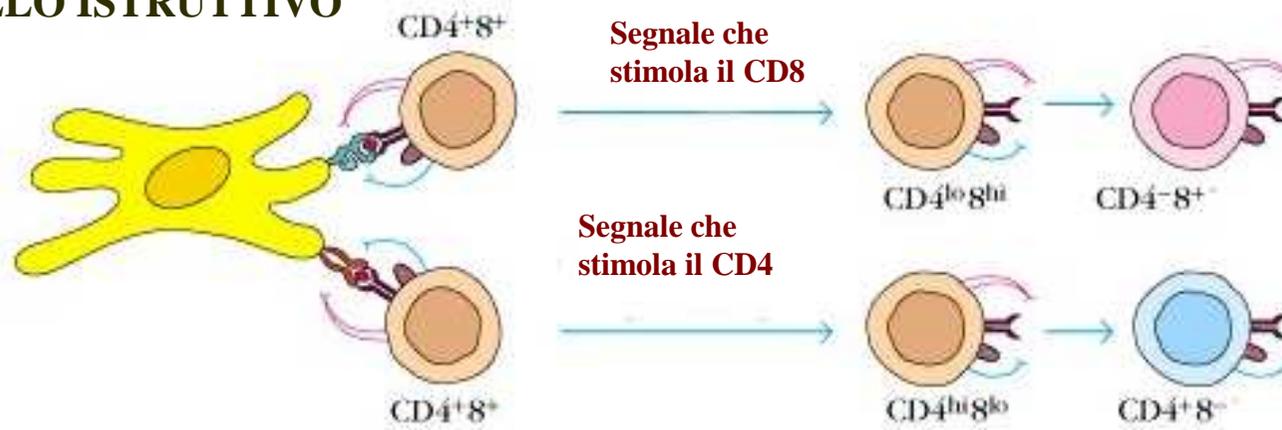
Alla fine della maturazione si ottengono due tipi di cellule T mature, ristrette per l'MHC e tolleranti al self



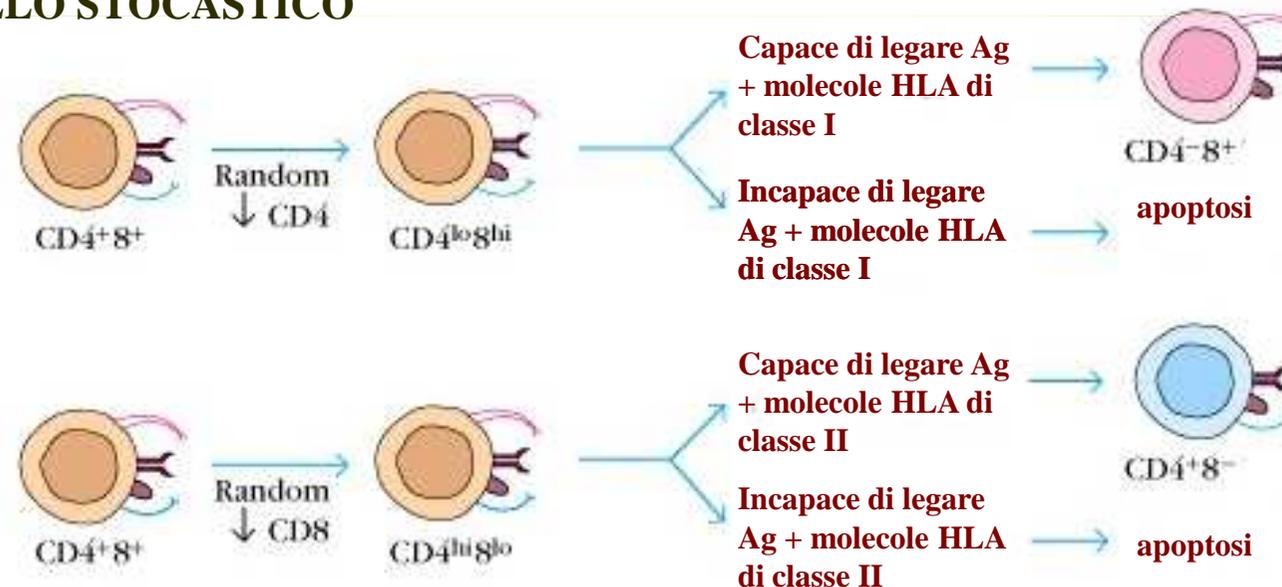
Cellula T citotossica

Cellula T helper

MODELLO ISTRUTTIVO



MODELLO STOCASTICO



Sommario

I linfociti T maturano nel timo

Durante la maturazione i linfociti acquisiscono il TCR, CD3, CD4 e il CD8

Durante la maturazione i linfociti T passano attraverso diversi stadi di maturazione:

- **Doppio negativi**
- **Doppio positivi**
- **Singolo positivi (CD4 e CD8)**

Durante il passaggio da doppi positivi a singolo positivi acquisiscono la restrizione da MHC (selezione positiva) e la tolleranza al self (selezione negativa)